

SÉBASTIEN BERGERON

**LA RÉGULATION DU MÉTABOLISME DU GLUCOSE PAR LA  
PROTÉINE TYROSINE PHOSPHATASE SHP-1**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en physiologie-endocrinologie  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT D'ANATOMIE ET DE PHYSIOLOGIE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

## Résumé

Lorsque l'insuline se lie à son récepteur, elle induit une cascade de réactions indispensables à l'utilisation du glucose. La résistance à l'insuline et le diabète de type 2 qui affectent une fraction croissante de la population résultent d'un défaut de signalisation de l'insuline. La voie de signalisation PI3K qu'emprunte l'insuline pour promouvoir l'utilisation du glucose est d'abord décrite en introduction de cette thèse. Aussi, il existe plusieurs mécanismes de désensibilisation qui sont essentiels pour limiter l'ampleur du signal à la réponse métabolique requise. Cependant, ces mécanismes sont altérables et de faibles dérèglements peuvent devenir responsables d'une propagation défailante du signal insulinaire.

Les souris *viable motheaten* (*me<sup>v</sup>*), déficientes en activité SHP-1, nous ont permis au premier chapitre de démontrer que SHP-1 constitue un de ces mécanismes de désensibilisation. Ces souris montrent une plus grande tolérance au glucose et une meilleure sensibilité à l'insuline que les souris non-déficientes en SHP-1, ainsi qu'une meilleure signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique. De plus, nous avons pu démontrer que SHP-1 contrôle aussi la clairance hépatique de l'insuline, importante pour réguler la concentration et la sensibilité systémique de l'insuline. Cette première étude a donc permis d'établir un nouveau rôle pour SHP-1 dans la régulation de l'action de l'insuline.

Par la suite, il devenait primordial de décrire les mécanismes impliqués dans la sensibilisation à l'insuline par la déficience en SHP-1 dans le muscle et le foie. À l'aide d'adénovirus codant pour un mutant catalytiquement inerte de SHP-1 (DNSHP-1), nous rapportons au deuxième chapitre, par l'expression de DNSHP-1 dans les hépatocytes Fao, que la diminution de la production hépatique de glucose observée chez les souris *me<sup>v</sup>* résulte d'une augmentation de la glycogénèse plutôt que d'une diminution de la gluconéogenèse. Enfin, au dernier chapitre, DNSHP-1 exprimé dans les myocytes L6 favorise la signalisation via Akt, et accroît l'expression de GLUT4, le principal transporteur de glucose sensible à l'insuline.

Ensemble, nos résultats suggèrent clairement que SHP-1 est un nouveau modulateur de l'action de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique. SHP-1 pourrait donc représenter une nouvelle cible thérapeutique pour traiter le diabète de type 2.

## Abstract

After binding to its receptor, insulin induces a reaction cascade that is essential for glucose utilization. Insulin resistance and type 2 diabetes are affecting an increasing portion of the population and result from insulin signaling impairment. Insulin signaling pathways promoting glucose utilization are reviewed in the introduction of the thesis, as well the desensitization mechanisms which are crucial to limit insulin signal duration and intensity.

Viable motheaten (*me<sup>v</sup>*) mice, harboring a spontaneous mutation leading to SHP-1 activity deficiency, allowed us to demonstrate in chapter I that SHP-1 constitutes one of these desensitization mechanisms. Indeed, *me<sup>v</sup>* mice showed an increased glucose tolerance and insulin sensitivity as compared to wild type littermates, resulting from increased insulin signaling in liver and skeletal muscle. Moreover, we show that SHP-1 controls hepatic insulin clearance, which is important to control systemic insulin concentration and sensitivity. This first study thus establishes a novel role for SHP-1 in the regulation of insulin action and glucose homeostasis.

Thereafter, it became primordial to describe cell autonomous mechanisms by which SHP-1 enhances insulin sensitivity in liver and muscle. In the second chapter, expression of DNSHP-1 using adenoviral gene transfer into Fao rat hepatoma cells indicates that decreased hepatic glucose production observed in *me<sup>v</sup>* mice is likely the result of enhanced glycogenesis rather than reduced gluconeogenesis. Finally, I show in the last chapter that DNSHP-1 expression in myocytes increased insulin signaling to Akt, and increased GLUT4 expression, the main insulin responsive glucose transporter.

Together, our results clearly establish that SHP-1 is a new modulator of insulin action in liver and skeletal muscle. SHP-1 may represent a novel therapeutic target to combat type 2 diabetes.

## Avant-propos

En introduction de cette thèse, je fais une revue de la littérature abordant le diabète et la signalisation intracellulaire induite par l'insuline pour situer le lecteur vis-à-vis nos objectifs expérimentaux. Ensuite, je présente un article publié (chapitre I), un manuscrit à parachever (chapitre II) et un manuscrit qui est sur le point d'être soumis pour publication (chapitre III). L'insertion des articles soumis et/ou acceptés s'est faite sans leur apporter de modification.

Je suis co-premier auteur, avec Marie-Julie Dubois, de l'article présenté au premier chapitre et publié dans la revue *Nature Medicine* en 2006. Lors de cette étude, j'ai construit les adénovirus (lacZ, GFP, DNSHP-1 et shRNA-SHP-1) et les protéines de fusion-GST nécessaire et puis j'ai mené la majorité des expériences *in vitro* (figures 4 à 6 et information supplémentaire en ligne (figures 3 à 5 et table 2)). J'ai aussi été impliqué dans la rédaction du manuscrit.

Je suis l'auteur principal du second et troisième article présenté. Dans ces études, j'ai effectué la presque totalité des manipulations, à l'exception d'une figure dans le troisième article basée sur un modèle *in vivo*, où Marie-Julie m'a généreusement porté assistance. Les souris transgéniques CAR ont été générées par des collaborateurs de l'université McGill (Dr Joséphine Nalbantoglu et Dr Nancy Larochelle). J'ai produit les figures et écrit la première ébauche des manuscrits.

# Remerciements

Avant toute chose, il m'importe de remercier mon directeur de recherche, le Dr André Marette, pour son temps et ses conseils. Je suis reconnaissant pour la confiance et la latitude scientifique qu'il m'a accordées. Son incomparable optimisme m'a assurément aidé à garder le cap sur mes objectifs.

Bien sûr, il m'est impossible d'imaginer mes études sans l'équipe qui m'entourait. Je remercie donc sincèrement tous ceux qui m'ont entre autre initié au travail de laboratoire : Mylène, Kathleen, Frédéric, Geneviève, Patrice et Luce. Merci à Bruno, qui par son expertise et son dévouement, rend le travail plus facile et plus agréable. Merci aux autres étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer. Merci à Kerstin pour la prélecture des manuscrits et de ma thèse. Enfin, un merci plus particulier à Marie-Julie, avec qui j'ai partagé mon intérêt (et bien des discussions) pour SHP-1.

J'ai beaucoup de reconnaissance envers le Dr Claude Côté, pour le temps qu'il prend pour partager ses connaissances. Que ce soit pour une question scientifique, pour lui demander une lettre de référence ou même pour choisir un premier vélo, il suffit de cogner à sa porte pour avoir toute son attention.

Un merci un peu plus spécial à David, du lab « d'à côté ». T'auras assurément agrémente mes années au CHUL. J'ai hâte de te revoir... j'ai hâte à la prochaine randonnée!

Merci à ma famille pour tout le support qu'ils ont pu m'offrir. Seulement que de vous sentir présents et de vous savoir fiers m'a été tellement réconfortant. Enfin, je remercie chaleureusement ma compagne Lysa, pour m'avoir encouragé et enduré pendant les derniers milles.

Merci à l'association Diabète Québec et l'association canadienne du diabète (ACD) pour le support financier qu'ils m'ont offert pendant mes études graduées. Un second merci à l'ACD pour la subvention qui a supporté le projet SHP-1.



*...à mes parents, qui m'ont continuellement  
encouragé*



*La science naît du jour où des erreurs, des échecs, des surprises désagréables nous poussent à regarder le réel de plus près.*

René Thom

# Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
ABSTRACT .....	IV
AVANT-PROPOS .....	V
REMERCIEMENTS.....	VI
TABLE DES MATIÈRES .....	1
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTES DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	9
<b>1. PHYSIOLOGIE ET MÉTABOLISME DU GLUCOSE .....</b>	<b>9</b>
1.1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	9
1.2. LE FOIE .....	10
1.3. LE TISSU ADIPEUX.....	11
<b>2. SIGNALISATION DE L'INSULINE.....</b>	<b>12</b>
2.1. LE RÉCEPTEUR DE L'INSULINE.....	13
2.1.1. <i>Structure et fonction</i> .....	14
2.1.2. <i>Internalisation, recyclage et dégradation</i> .....	16
2.1.3. <i>Clairance de l'insuline par le foie</i> .....	17
2.1.3.1. CEACAM1 .....	18
2.1.4. <i>Invalidation génétique du récepteur de l'insuline</i> .....	19
2.1.5. <i>Invalidation génétique du récepteur de l'insuline dans le muscle</i> .....	20
2.1.6. <i>Invalidation génétique du récepteur de l'insuline dans le tissu adipeux</i> .....	21
2.1.7. <i>Invalidation génétique du récepteur de l'insuline dans le foie</i> .....	21
2.2. LES PROTÉINES IRS.....	21
2.2.1. <i>Structure et fonction</i> .....	21
2.2.2. <i>Invalidation génétique des IRSs</i> .....	24
2.3. LA PI3K.....	25
2.3.1. <i>Structure et fonction</i> .....	25
2.3.2. <i>Invalidation génétique de la PI3K</i> .....	27
2.3.2.1. <i>Invalidation des sous-unités régulatrices</i> .....	28
2.3.2.2. <i>Invalidation des sous-unités catalytiques</i> .....	29
2.3.3. <i>Lipide phosphatase</i> .....	30
2.3.3.1. SHIP2 .....	30
2.3.3.1.1. <i>Structure et fonction</i> .....	30
2.3.3.1.2. <i>Invalidation génétique de SHIP2</i> .....	32
2.3.3.2. PTEN .....	32
2.3.3.2.1. <i>Structure et fonction</i> .....	32
2.3.3.2.2. <i>Invalidation génétique de PTEN</i> .....	33
2.3.3.3. SKIP .....	34
2.4. LA PROTÉINE KINASE B.....	35

2.4.1.	<i>Structure et fonction</i> .....	35
2.4.2.	<i>Invalidation génétique d'Akt</i> .....	39
2.5.	LA PROTÉINE CBL ET LA GTPASE TC10.....	40
2.5.1.	<i>Structure et fonction</i> .....	40
<b>3.</b>	<b>LES TRANSPORTEURS DE GLUCOSE</b> .....	<b>41</b>
3.1.	RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE GLUT4 .....	44
3.2.	LA TRANSLOCATION DE GLUT4 .....	46
3.2.1.	<i>Fusion des membranes</i> .....	47
3.3.	L'ACTIVITÉ INTRINSÈQUE .....	48
3.4.	INVALIDATION GÉNÉTIQUE DE GLUT4 .....	48
<b>4.</b>	<b>DÉSENSIBILISATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION INSULINIQUE</b> .....	<b>50</b>
4.1.	RÉSISTANCE À L'INSULINE ET DIABÈTE SUCRÉ .....	50
4.1.1.	<i>Physiopathologie du diabète de type 2</i> .....	51
4.2.	DÉFAUT DE SIGNALISATION DANS L'OBÉSITÉ.....	52
4.2.1.	<i>Sérine phosphorylation d'IRS-1</i> .....	53
4.2.1.1.	Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par les acides gras .....	54
4.2.1.2.	Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par le TNF- $\alpha$ .....	54
4.2.1.3.	Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par mTOR .....	55
4.2.1.4.	Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par d'autres médiateurs .....	55
4.2.2.	<i>Les Protéine Tyrosine Phosphatases</i> .....	56
4.2.2.1.	Structure et fonction des PTPs .....	58
4.2.2.2.	LAR.....	59
4.2.2.2.1.	Structure et fonction .....	59
4.2.2.2.2.	Invalidation génétique de LAR .....	60
4.2.2.3.	PTP-1B .....	61
4.2.2.3.1.	Structure et fonction .....	61
4.2.2.3.2.	Invalidation génétique de PTP-1B.....	62
4.2.2.4.	LMW-PTP .....	63
4.2.2.4.1.	Structure et fonction .....	63
4.2.2.4.2.	Invalidation génétique de LMW-PTP.....	64
<b>5.</b>	<b>SHP-1 AU CENTRE DES OBJECTIFS DE LA THÈSE</b> .....	<b>64</b>
5.1.	STRUCTURE ET FONCTION.....	65
5.2.	RÉGULATION DE SON ACTIVITÉ.....	65
5.2.1.	<i>Les domaines SH2</i> .....	65
5.2.2.	<i>La queue C-terminale</i> .....	66
5.2.2.1.	Phosphorylation de résidus tyrosine .....	66
5.2.2.2.	Phosphorylation de résidus sérine .....	67
5.2.2.3.	Signal de localisation nucléaire (SLN) .....	67
5.2.2.4.	Interaction avec les lipides .....	67
5.2.3.	<i>Isoforme et variant d'épissage</i> .....	68
5.3.	INVALIDATION GÉNÉTIQUE DE SHP-1 .....	69
5.4.	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET APPROCHE EXPÉRIMENTALE .....	70
<b>CHAPITRE I</b> .....	<b>72</b>	
<i>RÉSUMÉ</i> .....	73	
<i>ABSTRACT</i> .....	75	
<i>INTRODUCTION</i> .....	76	
<i>RESULTS</i> .....	77	

<i>DISCUSSION</i> .....	82
<i>METHODS</i> .....	85
<i>ACKNOWLEDGEMENTS</i> .....	88
<i>REFERENCES</i> .....	89
<i>FIGURES</i> .....	93
<i>LEGENDS TO FIGURES</i> .....	99
<i>SUPPLEMENTARY INFORMATION</i> .....	103
<b>CHAPITRE II</b> .....	<b>113</b>
<i>RÉSUMÉ</i> .....	114
<i>ABSTRACT</i> .....	116
<i>INTRODUCTION</i> .....	117
<i>RESULTS</i> .....	118
<i>DISCUSSION</i> .....	119
<i>METHODS</i> .....	121
<i>ACKNOWLEDGMENTS</i> .....	123
<i>REFERENCES</i> .....	124
<i>FIGURES</i> .....	126
<i>LEGENDS TO FIGURES</i> .....	131
<b>CHAPITRE III</b> .....	<b>133</b>
<i>RÉSUMÉ</i> .....	134
<i>ABSTRACT</i> .....	136
<i>INTRODUCTION</i> .....	137
<i>RESULTS</i> .....	138
<i>DISCUSSION</i> .....	139
<i>METHODS</i> .....	142
<i>ACKNOWLEDGMENTS</i> .....	145
<i>REFERENCES</i> .....	146
<i>FIGURES</i> .....	149
<i>LEGENDS TO FIGURES</i> .....	155
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>167</b>

# Liste des figures

## **Introduction et conclusion générale :**

Figure 1. Représentation schématique de la signalisation intracellulaire de l'insuline .....	13
Figure 2. Représentation du gène et de la structure du récepteur de l'insuline .....	14
Figure 3. Structure des quatre isoformes d'IRS .....	23
Figure 4. Classification des PI3K .....	26
Figure 5. Représentation schématique des lipides phosphatases PTEN, SHIP1 et SHIP2 .....	31
Figure 6. Les transporteurs de glucose .....	42
Figure 7. Représentation schématique du transport du glucose facilité .....	43
Figure 8. Représentation schématique des PTPs classiques .....	57
Figure 9. Expression de CEACAM1 analysée par immunobuvardage dans les Fao .....	160
Figure 10. Action de l'insuline sur la production hépatique de glucose .....	161
Figure 11. Dégradation de SHP-1 .....	163
Figure 12. Sensibilité à l'insuline de souris <i>me<sup>v</sup></i> soumise à un régime riche en gras .....	165

## **Chapitre I :**

Figure 1. SHP-1 is expressed in skeletal muscle and liver .....	93
Figure 2. Metabolic phenotyping of wild-type and SHP-1 deficient <i>me<sup>v</sup></i> mice .....	94
Figure 3. Insulin signaling to PI3K/Akt in muscle and liver of WT and <i>me<sup>v</sup></i> mice .....	95
Figure 4. Effects of liver-specific DNSHP-1 overexpression and knockdown of SHP-1 by shRNA-mediated gene silencing on glucose metabolism and insulin signaling .....	96
Figure 5. SHP-1 regulates CEACAM1 phosphorylation in liver and modulates hepatic insulin clearance .....	97
Figure 6. SHP-1 binds to and dephosphorylates the insulin receptor, CEACAM1 and p85-PI3K in liver .....	98
Supplementary figure 1. SHP-1 immunoreactivity in liver and skeletal muscle .....	104
Supplementary figure 2. Effect of wortmannin on 2-DG uptake by soleus and EDL muscles .....	105
Supplementary figure 3. Insulin signaling in muscle dans liver .....	106
Supplementary figure 4. PTEN tyrosine phosphorylation in liver of animal models of SHP-1 deficiency .....	107
Supplementary figure 5. <i>In vivo</i> transduction of liver after systemic delivery of AdV GFP .....	108

**Chapitre II :**

Figure 1. Expression of SHP-1 in Fao cells.....	115
Figure 2. Effect of SHP-1 on CEACAM1 phosphorylation.....	127
Figure 3. Effect of SHP-1 on insulin signaling.....	128
Figure 4. Effect of SHP-1 on glycogen synthase.....	129
Figure 5. Lack of gluconeogenic modulation by SHP-1.....	130

**Chapitre III :**

Figure 1. Expression of DNSHP-1 in L6 cells.....	149
Figure 2. Effect of DNSHP-1 on insulin signaling.....	150
Figure 3. Effect of DNSHP-1 on glucose transport and glycogen synthesis.....	151
Figure 4. Regulation of GLUT4 expression by DNSHP-1.....	152
Figure 5. Expression of DNSHP-1 in skeletal muscle of CAR-mice.....	153
Figure 6. Regulation of GLUT4 expression <i>in vivo</i> .....	154

**Listes des tableaux****Introduction**

Tableau 1. Distribution des réserves d'énergie (kilojoules) .....	10
Tableau 2. Profil d'expression des isoformes d'Akt .....	36
Tableau 3. Biodistribution et fonction des GLUTs de la classe I .....	44

**Chapitre I :**

Supplementary table 1. Physiological parameters of wild-type (WT) and SHP-1-deficient (me <sup>v</sup> ) mice .....	109
Supplementary table 2. Quantification of changes in insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin signaling proteins.....	110

## Liste des abréviations

<b>AdV:</b>	Adénovirus
<b>Akt:</b>	Protéine kinase B (PKB)
<b>APS:</b>	<i>Adaptor protein containing PH and SH3 domains</i>
<b>AS160:</b>	<i>Akt substrate of 160 kDa</i>
<b>CAP:</b>	<i>Cbl-associated protein</i>
<b>CAR:</b>	Récepteur du coxsackie/adénovirus
<b>Cbl:</b>	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
<b>CEACAM1:</b>	<i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1</i>
<b>ERK:</b>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>FAS:</b>	Synthase d'acides gras
<b>G6P:</b>	Glucose-6-phosphatase
<b>GAP:</b>	Protéine activatrice de GTPases
<b>GEF:</b>	Facteur d'échange de guanine
<b>GLUT:</b>	<i>Glucose Transporter</i>
<b>GSK3:</b>	Glycogène synthase kinase-3
<b>IGF-1:</b>	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
<b>IKK:</b>	<i>Inhibitor kappaB kinase</i>
<b>IRS:</b>	<i>Insulin receptor substrate</i>
<b>JIP1:</b>	<i>JNK-interacting protein 1</i>
<b>JNK:</b>	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
<b>LAR:</b>	<i>Leukocyte common antigen-related</i>
<b>LL:</b>	Dileucine
<b>LMW-PTP:</b>	<i>Low molecular weight-PTP</i>
<b>MAPK:</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>me:</b>	<i>Motheaten</i>
<b>me<sup>v</sup>:</b>	<i>Viable motheaten</i>
<b>mTOR:</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>PDGF:</b>	<i>Platelet derived growth factor</i>
<b>PDK1:</b>	<i>PI-dependant kinase-1</i>
<b>PEPCK:</b>	Phosphoénol-pyruvate carboxykinase
<b>PH:</b>	<i>Pleckstrin Homology</i>
<b>PHIP:</b>	<i>PH domain-interacting protein</i>

<b>PI:</b>	Phosphatidylinositol
<b>PI-3,4-P<sub>2</sub>:</b>	Phosphatidylinositol-3,4-biphosphate
<b>PI3K:</b>	Phosphatidylinositol-3 Kinase
<b>PI-3-P:</b>	Phosphatidylinositol-3-phosphate
<b>PI-4,5-P<sub>2</sub>:</b>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
<b>PIKfyve:</b>	<i>FYVE domain-containing PI-3-P 5-kinase</i>
<b>PIP<sub>3</sub>:</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
<b>PKA:</b>	Protéine kinase A
<b>PKB:</b>	Protéine kinase B (Akt)
<b>PKC:</b>	Protéine kinase C
<b>PKCa:</b>	PKC atypique
<b>PRAS40:</b>	<i>Proline-rich Akt substrate 40</i>
<b>PTB:</b>	<i>PhosphoTyrosine Binding</i>
<b>PTEN:</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
<b>PTK:</b>	Protéine tyrosine kinase
<b>PTP:</b>	Protéine tyrosine phosphatase
<b>RAPTOR:</b>	<i>Regulatory associated protein of mTOR</i>
<b>RICTOR:</b>	<i>Rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
<b>ROS:</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RTK:</b>	récepteur tyrosine kinase
<b>S6K1:</b>	p70/S6 kinase
<b>SAM:</b>	<i>Sterile <math>\alpha</math>-motif</i>
<b>SH2:</b>	<i>Src-Homology-2</i>
<b>SH2<sub>C</sub>:</b>	Domaine SH2 C-terminal
<b>SH2<sub>N</sub>:</b>	Domaine SH2 N-terminal
<b>SH3:</b>	<i>Src-Homology-3</i>
<b>SHIP-2:</b>	<i>Src-homology-2-domain containing inositol 5' phosphatase-2</i>
<b>SHIP-1 :</b>	<i>SH2 domain-containing protein-1</i>
<b>SKIP:</b>	<i>Skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase</i>
<b>SLN:</b>	Signal de localisation nucléaire
<b>SNARE:</b>	<i>SNAP receptor</i>
<b>SREBP-1c:</b>	<i>Steroid regulatory element-binding protein-1c</i>
<b>STAT-3:</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
<b>STZ:</b>	Streptozotocine



**Synip:** *Syntaxine-4-interacting protein*  
**TC10:** Clone 10 d'une librairie d'ADNc de tératocarcinomes  
**TNF- $\alpha$ :** *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*   
**t-tubules:** Tubules transversaux

# Introduction

## 1. Physiologie et métabolisme du glucose

L'insuline est la principale hormone qui régule l'homéostasie du glucose. Certains tissus sont bien sûr interpellés plus que d'autres lors des variations de la glycémie et de l'insulinémie. Pendant les périodes de repos et de jeûne, le cerveau consomme près de 60% du glucose<sup>1</sup>. Dans ces conditions, 90% du glucose circulant provient d'une production hépatique qui assure une glycémie stable malgré la consommation glucidique périphérique et centrale. Par contre, après un repas, où le glucose et l'insuline circulant abondent, le muscle squelettique absorbe de 80 à 90% du glucose sanguin, et près de 10% sont trappés par le tissu adipeux<sup>2</sup>. L'insuline agira aussi sur le foie pour supprimer la production hépatique de glucose de manière à rétablir la glycémie le plus rapidement possible, et du même coup, renflouer les réserves hépatiques de glycogènes. En bref, les trois principaux tissus cibles de l'insuline sont le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie.

### 1.1. Le muscle squelettique

À l'état basal, la contribution du muscle squelettique sur la captation total du glucose est d'environ 30%, et de plus de 80% après un repas. Ce tissu est donc très important pour limiter l'ampleur et la durée des hyperglycémies postprandiales. Le transport du glucose par GLUT4, le principal transporteur sensible à l'insuline (discuté en détail à la section 3), y est donc très important. Le glucose qui entre dans le muscle devient une source d'énergie immédiate en accédant à la voie glycolytique. La contraction musculaire, qui est très énergivore, stimule d'elle-même le transport du glucose (revue dans <sup>3</sup>), indépendamment de l'insuline. Lorsque les ressources le permettent, le glucose est emmagasiné sous forme de glycogène musculaire qui compte pour près de 70% des réserves glucidiques de tout l'organisme (voir tableau 1). Contrairement au foie, le muscle entrepose égoïstement toute cette énergie en attendant la prochaine séance d'exercice qui requerra une grande quantité d'énergie.

	Glucose / Glycogène	Triglycéride	Protéine mobilisable
<b>Sang</b>	250	200	0
<b>Foie</b>	1700	2000	1700
<b>Cerveau</b>	30	0	0
<b>Muscle</b>	5000	2000	100000
<b>Tissu adipeux</b>	330	560000	170

**Tableau 1.** Distribution des réserves d'énergie (kilojoules) dans les organes d'un homme typique de 70 kg. Tiré et traduit de Cahill, 1976.<sup>4</sup>

## 1.2. Le foie

Le foie est un organe très important dans l'homéostasie du glucose. Alors que le muscle squelettique limite les hyperglycémies postprandiales, le foie permet d'éviter les hypoglycémies interprandiales en assurant près de 85% de la production endogène de glucose, le reste étant d'origine rénal<sup>5</sup>. Pour des sujets en santé, la production hépatique de glucose nette provient, à part sensiblement égale, de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse<sup>6</sup>.

La glycogénolyse est la production de glucose à partir du glycogène. C'est en favorisant la production de glycogène que l'insuline inhibe la glycogénolyse. L'hyperglycémie va aussi promouvoir d'elle-même la glycogénolyse en inhibant la glycogène phosphorylase, l'enzyme qui convertit le glycogène en glucose<sup>7</sup>.

La production de glucose à partir de précurseurs non glucidiques définit ce qu'est la gluconéogenèse. Ces précurseurs sont le lactate, le pyruvate, le glycérol et les acides aminés. Le lactate, transformé en pyruvate par le foie, peut provenir de la contraction musculaire ou des érythrocytes qui ne possèdent pas de mitochondries nécessaires à l'oxydation complète du glucose. Le glycérol résulte de l'hydrolyse des triglycérides et les acides aminés, en cas de nécessité, sont fournis par le muscle squelettique.

La progression de ces substrats vers la production de glucose suivra, en partie et à contresens, le sentier enzymatique de la glycolyse. Pour éviter l'activation simultanée de ces deux sentiers qui conduirait à un bilan nul de consommation et de production de glucose, ceux-ci sont réciproquement régulés de façon allostérique. Par exemple, une forte concentration d'AMP marquant une baisse du niveau d'énergie intracellulaire activera la phosphofructokinase, une enzyme unique au sentier de la glycolyse, et inhibera la fructose 1,6-biphosphatase de la gluconéogénèse. À l'inverse, des marqueurs de grandes réserves d'énergie comme l'ATP et le citrate favoriseront la production de glucose de novo tout en freinant la glycolyse.

L'insuline inhibe aussi énergiquement la gluconéogénèse, de façon directe et indirecte. L'insuline agit directement sur le foie pour réduire l'expression de PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)<sup>8</sup> et de G6P (glucose-6-phosphatase)<sup>9,10</sup>, les deux enzymes limitantes de la gluconéogénèse<sup>11,12</sup>. Ces enzymes favorisent un cheminement à contre-sens des substrats de la glycolyse, où PEPCCK produit du phosphoenol pyruvate comme précurseur du glucose à partir de l'oxaloacétate, et où G6Pase produit la molécule convoitée à partir du glucose-6-phosphate. Son effet indirect se traduit par sa capacité à limiter l'apport des précurseurs non glucidiques par une action périphérique mais aussi et par une influence centrale<sup>12</sup>.

### 1.3. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux emmagasine de l'énergie principalement sous forme de triglycérides. Ce gras occupe plus de 95% du volume total des adipocytes et représente plus de 80% des réserves d'énergie pour l'organisme (voir tableau 1). L'insuline augmente l'entrée de glucose dans les adipocytes qu'ils pourront transformer en pyruvate puis en acide gras. L'insuline stimule aussi l'activation d'enzymes lipogéniques comme la pyruvate déshydrogénase, FAS (Synthase d'acides gras) et l'acetyl-CoA carboxylase. Ces enzymes sont sous le contrôle du facteur de transcription SREBP-1c (*steroid regulatory element-binding protein-1c*)<sup>13</sup> et l'insuline est un important régulateur de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c<sup>14</sup>. Toutefois, chez l'humain, cette voie de synthèse semble de moindre importance comparée à la captation et à l'estérification d'acides gras libres provenant des lipoprotéines sanguines<sup>15</sup>. C'est en activant le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ <sup>16</sup> que

l'insuline augmente l'adipogenèse par cette voie<sup>17</sup>. L'activation de PPAR $\gamma$  semble aussi augmenter l'expression de GLUT4<sup>18</sup>, ce qui permettrait en plus d'augmenter la synthèse d'acide gras à partir du glucose.

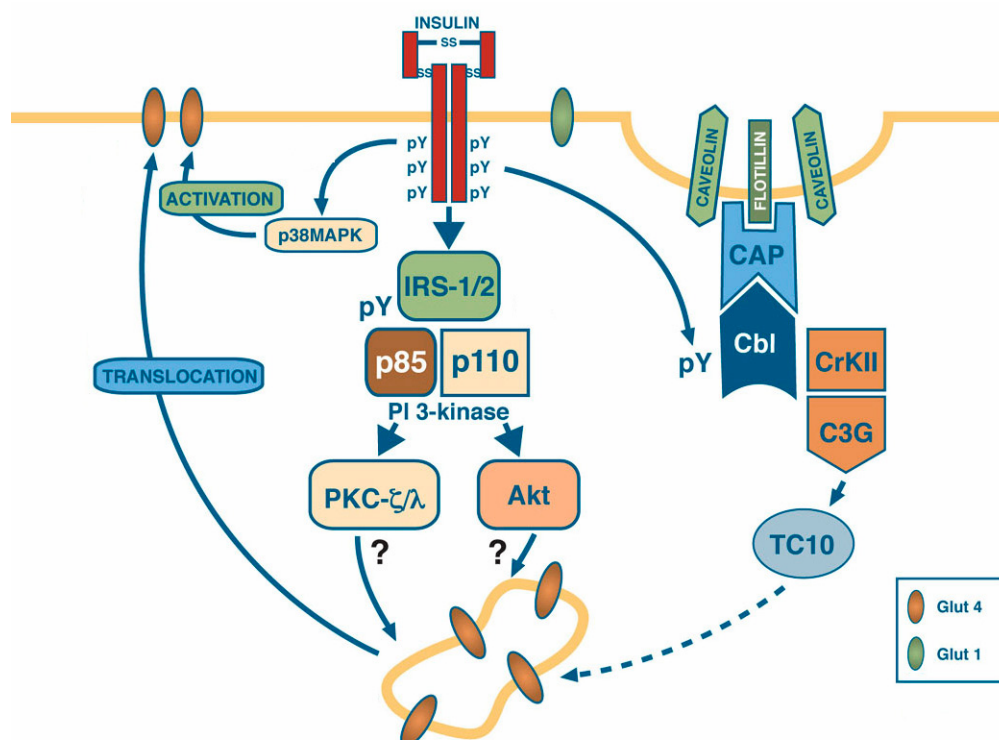
L'insuline est un puissant inhibiteur de la lipolyse, ce qui favorise aussi l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes. Elle inhibe la lipase HSL (*hormon-sensitive lipase*), l'enzyme limitante de la lipolyse, et la seule lipase sujette à une régulation hormonale<sup>19</sup>. Les acides gras libérés dans la circulation par la lipolyse forment entre autre un substrat pour la production d'énergie ailleurs dans l'organisme. Il y a d'ailleurs une forte corrélation entre le taux d'acides gras plasmatiques et la production hépatique de glucose<sup>20</sup>.

## 2. Signalisation de l'insuline

Les travaux qui font l'objet de la présente thèse se soucient plus particulièrement de l'action périphérique et hépatique de l'insuline en ayant pour intérêt de mieux comprendre les défauts présents durant la résistance à l'insuline qui mènent à l'apparition du diabète de type 2 (voir section 4). Plusieurs événements de signalisation intracellulaire ont lieu depuis la liaison de l'insuline à son récepteur jusqu'à la concrétisation en une réponse physiologique appropriée. Ce long parcours enzymatique est toutefois susceptible à l'apparition d'irrégularités. Il est donc important de connaître chacune de ces étapes pour éventuellement être en mesure d'élucider et de contrer les défauts de signalisation.

Lorsque l'insuline se lie à son récepteur vis-à-vis la sous-unité  $\alpha$  extracellulaire, elle active son activité kinase et, dans un premier temps, l'autophosphorylation de sa sous-unité  $\beta$  transmembranaire. Cette première étape permet la liaison de partenaires au récepteur de l'insuline, dont trois molécules importantes qui initient divers sentiers de signalisation : Shc, les protéines IRSs (*insulin receptor substrate*) et la protéine adaptatrice APS (*Adaptor protein containing PH and SH3 domains*). Deux sentiers de signalisation favorisent conjointement le transport et l'utilisation du glucose. On les nomme généralement d'après un important acteur de la cascade, soit le **sentier PI3K** (Phosphatidylinositol-3 Kinase) et le **sentier TC10** (clone 10 d'une librairie d'ADNc de

tératocarcinomes<sup>21</sup>) initiés par les protéines IRSs et APS, respectivement. Parallèlement, l'activation de la p38/MAP-kinase serait aussi indispensable à l'augmentation du transport du glucose (section 3.1.2.). Ces trois axes sont brièvement représentés à la figure 1, et sont analysés plus en détail dans les sections suivantes, du récepteur jusqu'aux aboutissements physiologiques. Le sentier TC10 sera rapidement survolé puisqu'il est moins étudié et fait toujours sujet de controverses, et puisque Shc est un médiateur des fonctions plutôt mitogéniques de l'insuline, les sentiers de signalisation empruntés par cette protéine ne seront pas abordés.

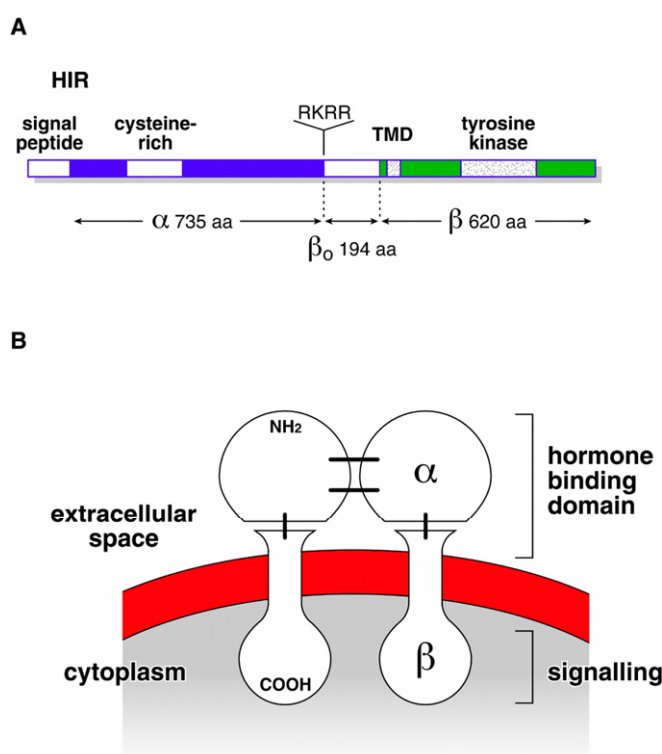


**Figure 1.** Représentation schématique de la signalisation intracellulaire de l'insuline. La voie PI3K favorise l'utilisation du glucose en stimulant, entre autre, la translocation du transporteur GLUT4. Parallèlement, l'activation de GLUT4 par la p38 MAPK optimise le transport du glucose. Tiré et adapté de Tremblay *et al.* 2003<sup>22</sup>

## 2.1. Le récepteur de l'insuline

### 2.1.1. Structure et fonction

Le gène du récepteur de l'insuline est composé de 22 exons et 21 introns. La traduction se fait d'un seul segment et génère le prorécepteur, qui sera par la suite scindé au site de clivage (4 acides aminés : RKRR) en sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Un assemblage hétérotétramérique de deux sous-unités  $\alpha$  et deux sous-unités  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ) par ponts disulfures formera le récepteur de l'insuline mature (figure 2). Les sous-unités  $\alpha$ , qui possèdent le domaine de liaison à l'insuline, sont exclusivement extracellulaires alors que les sous-unités  $\beta$  sont transmembranaires. Au niveau intracellulaire, nous retrouvons entre autre un domaine catalytique tyrosine kinase bordé par deux domaines de régulation. Cette activité kinase, indispensable à la propagation du signal qu'initie la liaison de l'insuline, classe le récepteur de l'insuline dans la grande famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK).



**Figure 2.** Représentation du gène et de la structure du récepteur de l'insuline. (A) Le gène est traduit d'un seul segment pour être ensuite scindé au motif RKRR en deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . (B) Un assemblage hétérotétramérique  $\alpha_2\beta_2$  forme le récepteur de l'insuline mature. Tiré de Bass *et al.* 1998 <sup>23</sup>

A l'état basal, la sous-unité  $\alpha$  semble inhiber l'activité kinase du récepteur puisque le retrait de cette partie extracellulaire par digestion enzymatique ou par mutagenèse active la kinase intracellulaire<sup>24-26</sup>. Lorsque l'insuline s'y lie, elle induit des changements de conformation qui activent la kinase et induit une *trans*-phosphorylation des sous-unités  $\beta$ . Cette autophosphorylation s'effectue essentiellement sur des résidus tyrosine intracellulaires. La tyrosine 960 du domaine juxtamembranaire, les tyrosines 1316 et 1322 du domaine C-terminal et les tyrosines 1146, 1150 et 1151 du domaine de régulation représentent les résidus ciblés. Ces derniers sont particulièrement importants pour réguler le niveau d'activation de la kinase. En effet, la mutation d'une, deux ou de ces trois tyrosines diminue progressivement l'activité kinase induite par une stimulation par l'insuline<sup>27,28</sup>. Bien que ces tyrosines peuvent aussi servir au recrutement de médiateurs tel SHP-2 et APS<sup>29,30</sup>, ce rôle est généralement attribué à la tyrosine 960 du motif NPXY<sub>960</sub>. La substitution de cette tyrosine par un autre acide aminé affecte la transmission du signal, sans toutefois modifier le niveau d'activation de la kinase, ce qui suggère un défaut dans le recrutement des médiateurs<sup>31,32</sup>. C'est via leur domaine PTB (*PhosphoTyrosine binding*) que les protéines IRS et Shc s'attachent au motif NPXY<sub>960</sub> phosphorylé. Finalement, les tyrosines autophosphorylées du domaine C-terminal semblent avoir un double rôle. Un des sites d'autophosphorylation serait contenu dans un motif YXXM qui, dans sa forme phosphorylée, est normalement reconnu par le domaine SH2 (*Src-Homology-2*) de certains partenaires. Il a été proposé que la sous-unité p85 de la PI3K s'accrocherait au récepteur activé via ce site<sup>33,34</sup>, mais l'interaction réelle *in vivo* est incertaine<sup>35</sup>. De plus, la délétion de 82 acides aminés en C-terminal, dont les tyrosines 1316 et 1322, n'a que peu d'effet sur la propagation du signal aux médiateurs, mais réduit considérablement le niveau d'autophosphorylation<sup>36</sup>, ce qui suggère que la phosphorylation des tyrosines du domaine C-terminal est majoritairement impliquée dans la régulation de l'activité plutôt que dans le recrutement d'effecteurs<sup>37</sup> (voir <sup>38</sup> pour une revue).

En dehors de son niveau d'expression et de la biodistribution de son ligand, *i.e.* l'insuline, l'activité du récepteur est très variable. D'ailleurs, il existe plusieurs différences entre les tissus qui pourraient expliquer cette hétérogénéité. Tout d'abord, diverses modifications post-traductionnelles créent la variété. La glycosylation hétérogène du récepteur en est un exemple bien simple<sup>39</sup>. Il y a aussi la formation de récepteur hybride, où une moitié de récepteur de l'insuline ( $\alpha\beta$ ) s'apparie avec une moitié de récepteur de l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) pour former un récepteur chimérique aux



propriétés distinctes. Le nombre de résidus tyrosine phosphorylés dans le domaine de régulation pourrait aussi être un mécanisme d'hétérogénéité spécifique aux tissus. Dans plusieurs lignée cellulaires, on observe une bi-phosphorylation de ce domaine alors que dans les hépatocytes de rat, la tri-phosphorylation prédomine<sup>40</sup>. Des différences fonctionnelles ont aussi été remarquées d'un tissu à l'autre. Par exemple, dans les adipocytes, la réponse maximale est atteinte avec 20% d'occupation du récepteur par l'insuline, alors que dans les hépatocytes, la relation est plutôt parallèle<sup>41-43</sup>. Finalement, un épissage alternatif est assurément contributeur vis-à-vis certaines divergences. On connaît deux isoformes du récepteur de l'insuline, récepteur-A et récepteur-B, qui possèdent une différence d'affinité envers l'insuline et une cinétique d'internalisation distincte<sup>44-46</sup>. Puisqu'ils n'ont pas la même distribution à travers l'organisme, ils contribuent aux différences d'un tissu à l'autre.

### **2.1.2. Internalisation, recyclage et dégradation.**

La liaison de l'insuline à son récepteur, majoritairement situé sur les microvilli et dans les radeaux lipidiques, induit son activation et sa migration vers des régions enrichies en clathrine<sup>47</sup>. Le complexe récepteur/ligand sera ensuite séquestré dans les vésicules intracellulaires de l'appareil endosomal<sup>48</sup>. Cette importante étape d'internalisation du complexe actif régule de maintes façons le signal insulinaire à transmettre (voir <sup>49</sup> pour une revue) :

**(1) Arrêt du signal par la dégradation intracellulaire de l'insuline** – Des pompes à protons ATP-dépendantes acidifient l'intérieur des endosomes, ce qui a pour premier effet de dissocier le complexe récepteur/ligand. Du même coup, la diminution du pH favorise l'activité d'une insulinasé qui dégrade plus aisément l'insuline à l'approche du pH 5,0-5,5<sup>50</sup>. Une partie de cette insuline peut-être gardée intacte puis relarguée par un mécanisme appelé rétroendocytose. D'une certaine façon, la cellule contrôle ainsi la concentration d'insuline dans son environnement<sup>51</sup>.

**(2) Régulation de la sensibilité à l'insuline par un contrôle du nombre de récepteur à la surface** – Alors que l'insuline est majoritairement dégradée, le récepteur maintenant libre sera, selon les besoins physiologiques, envoyé dans le compartiment lysosomal pour y être dégradé, ou retourné à la membrane plasmique pour permettre l'essor du signal insulinaire par un second élan (recyclage).

Une forte concentration d'insuline profitera d'une voie d'internalisation qui favorise le recyclage<sup>52</sup> alors que l'exposition prolongée à l'insuline favorise la dégradation du récepteur<sup>53</sup>. L'inhibition de l'acidification des endosomes aurait pour effet d'inhiber la dissociation du complexe récepteur/insuline, et conséquemment le recyclage du récepteur à la membrane<sup>54,55</sup>. La diminution de la signalisation observée dans de telles conditions suggère que l'acidification et le recyclage du récepteur ont des rôles importants dans la régulation de la signalisation de l'insuline<sup>56</sup>.

**(3) Accès du récepteur à la membrane plasmique ainsi qu'aux compartiments intracellulaires –** L'internalisation permet au récepteur d'agir dans différents compartiments cellulaires, et ainsi activer des sentiers de signalisation distincts. À titre d'exemple, la mutation de l'arginine 252 pour une cystéine du récepteur inhibe son internalisation. La capacité de signalisation via IRS1/2 n'en est pas affectée, par contre, la phosphorylation de Shc et l'activation de ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) en est diminuée<sup>57</sup>. De plus, au niveau endosomal, le récepteur voisine une vingtaine de phosphatases nécessaires à son inactivation<sup>58</sup>. Des études proposent même une augmentation momentanée de l'activité kinase du récepteur qui serait imputable à une déphosphorylation partielle du récepteur<sup>59</sup>. La phosphorylation de certaines tyrosines en C-terminal qui semblent avoir un effet négatif sur l'activité kinase<sup>37,60,61</sup> pourraient être les responsables de cette augmentation.

**(4) Activité biologique des fragments de dégradation de l'insuline –** L'insuline peut être relarguée intacte, mais peut aussi l'être après avoir été dégradée. La présence de fragments de dégradation de l'insuline a été observée dans le plasma humain<sup>62</sup>. Ces fragments conserveraient en partie la capacité de se lier au récepteur de l'insuline. Des adipocytes en cultures (3T3-L1) ont été incubés avec un fragments de dégradation (peptide HLVEALY), et une activité antilipolytique de ce fragment a été démontrée<sup>63</sup>. Avec l'idée que ces fragments agissent différemment de l'insuline elle-même, cela représente donc un autre mécanisme de régulation de l'effet de l'insuline.

### **2.1.3. Clairance de l'insuline par le foie.**

L'internalisation et la dégradation de l'insuline ont une importance particulière au niveau du foie. Tout d'abord, on sait que le foie est le principal organe responsable de la clairance de l'insuline

sanguine<sup>64,65</sup>. La demi-vie plasmatique de l'insuline est de 4-6 minutes; près de 50 pourcents sont éliminés de la circulation dès le premier passage au foie. Normalement, l'insuline est captée via son récepteur, mais à de fortes concentrations, elle pénètre aussi dans les hépatocytes par pinocytose<sup>66</sup>. Ce mode d'entrée pourrait être impliqué dans certaines actions de l'insuline<sup>67</sup>.

La clairance par le foie est modulée par plusieurs facteurs. Par exemple, l'ingestion de glucose aurait pour effet de diminuer la clairance de l'insuline. Le signal provient probablement des intestins puisque l'infusion de glucose dans la veine porte hépatique n'a pas cet effet. La quantité de glucose ingérée est corrélée avec la sécrétion d'insuline alors qu'il y a une relation inverse de la clairance<sup>68</sup>. Les acides gras libres auraient aussi tendance à faire diminuer la clairance de l'insuline par le foie<sup>69</sup>. Peut-être est-ce ce qui explique les anomalies de dégradation et de clairance de l'insuline qui s'observent lors d'obésité et de diabète de type 2<sup>70</sup> puisqu'un haut taux d'acide gras libre est habituellement associé à ces pathologies<sup>71</sup>. On pourrait penser que l'envergure de l'effet de premier passage donne au foie un droit de parole sur la concentration systémique d'insuline. Ainsi, l'inhibition de la clairance de l'insuline par les acides gras libres chez les diabétiques serait peut-être une façon d'en augmenter la concentration systémique pour contrebalancer la résistance à l'insuline et diminuer la surcharge vis-à-vis les cellules  $\beta$ -pancréatique<sup>72</sup>.

### **2.1.3.1. CEACAM1**

Une protéine est particulièrement importante dans la régulation de l'internalisation de l'insuline, la *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1* (CEACAM1). Cette protéine est exprimée dans le foie, mais pas dans le tissu adipeux ni le muscle squelettique<sup>73</sup>. Un épissage alternatif permet l'expression de deux isoformes de la protéine. Absent de la forme plus courte (CEACAM1-4S), un domaine intracellulaire phosphorylable par le récepteur de l'insuline se retrouve sur la forme plus longue (CEACAM1-4L)<sup>74</sup>. Alors que les protéines IRS et Shc interagissent étroitement avec la tyrosine 960 du récepteur de l'insuline, la phosphorylation de CEACAM1 est plutôt tributaire de la tyrosine 1316 du domaine C-terminal<sup>75</sup>. Cependant, la tyrosine 960 demeure indispensable à l'internalisation du récepteur activé. Il a été proposé qu'une fois phosphorylé, CEACAM1 recrute des protéines qui interagissent avec la tyrosine 960, et qu'ensuite tout ce complexe s'internalise<sup>76,77</sup>.

Plusieurs évidences montrent que CEACAM1 participe à la régulation de l'internalisation de l'insuline. D'abord, la co-expression de CEACAM1 dans des cellules NIH 3T3 exprimant le récepteur de l'insuline augmente l'internalisation et la dégradation de l'insuline<sup>77,78</sup>. Aussi, les souris L-SACC1 qui surexpriment un mutant de CEACAM1 (mutation S503A qui empêche la phosphorylation par le récepteur de l'insuline) montrent une hyperinsulinémie résultant d'un défaut de clairance<sup>79</sup>. Conséquemment, ces souris développent une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose. De plus, elles montrent une obésité viscérale accompagnée d'un niveau d'acides gras libres et de triglycérides sanguins élevés. Le contrôle de l'activité de FAS par CEACAM1 pourrait expliquer ce défaut du métabolisme lipidique<sup>80</sup>. La résistance à l'insuline dans le tissu adipeux, observée lors d'un clamp hyperinsulinémique/ euglycémique, contribue sans doute au dérèglement lipidique. De plus, il a été démontré que le contenu en triglycérides musculaires est augmenté, et la résistance à l'insuline dans le muscle a été confirmée<sup>81</sup>.

CEACAM1 régule donc la clairance de l'insuline, mais aussi le métabolisme des lipides. Ce double rôle de CEACAM1 complique la compréhension de la pathogenèse de la résistance à l'insuline observée dans les souris L-SACC-1. On sait que la clairance est affectée par le niveau d'acides gras libres sanguins<sup>69</sup>, et qu'indépendamment, ce sont deux paramètres qui influencent l'état de sensibilité à l'insuline. Pour mieux discerner l'impact de chacun, Dai *et al.*<sup>82</sup> ont administré de la carnitine à ces souris pour normaliser le niveau d'acides gras libres sanguin<sup>83</sup>. Ils ont observé le rétablissement de la clairance de l'insuline, de l'insulinémie et de la tolérance au glucose en ayant pris soin de vérifier que la carnitine n'influçait pas d'elle-même l'internalisation de l'insuline. Cela indique donc une forte contribution de l'adiposité viscérale et des acides gras libres vis-à-vis l'internalisation de l'insuline et le développement de la résistance à l'insuline chez les souris L-SACC-1.

#### **2.1.4. Invalidation génétique du récepteur de l'insuline**

Deux groupes de recherche indépendants ont invalidé génétiquement le récepteur de l'insuline dans la souris la même année<sup>84,85</sup>. Cette mutation provoque un léger retard de croissance ( $\approx 10\%$ ) à la naissance<sup>86</sup>, mais dans un premier temps, aucun défaut métabolique apparent. Par contre, la santé de la souris se détériore très rapidement. La glycémie augmente dès qu'elle commence à

s'alimenter, et l'insulinémie s'élève brusquement, mille fois au dessus des valeurs normales. Les cellules  $\beta$  du pancréas se détériorent très rapidement, et après quelques jours, il n'y a plus de vésicules d'entreposage de l'insuline visibles<sup>87</sup>. Enfin, l'animal meurt deux à trois jours après la naissance d'une acidocétose diabétique. Les souris invalidées pour le gène de l'insuline montrent sensiblement le même phénotype<sup>88</sup>, suggérant que l'insuline agit exclusivement via son récepteur.

Chez l'humain, quatre cas de mutations complètement invalidantes du récepteur de l'insuline ont été rapportés<sup>89-93</sup>. À l'inverse du modèle murin, le fœtus humain montre un important retard de croissance. On pense que chez la souris, le récepteur de l'IGF-1 compenserait pour l'absence du récepteur de l'insuline. Tout comme chez la souris, la déficience en récepteur de l'insuline chez l'humain provoque une hyperglycémie postprandiale, mais en dehors de cette période, on observe plutôt une hypoglycémie. On ne connaît pas le mécanisme exact pour expliquer cette baisse de glucose sanguin, mais on pense que les faibles réserves hépatiques en glycogène ne suffiraient pas à maintenir la glycémie toujours aussi élevée entre les repas<sup>94-97</sup>. Chez la souris, une alimentation plus incessante contribue forcément au maintien de l'hyperglycémie. (voir <sup>98</sup> pour une revue)

### **2.1.5. Invalidation génétique du récepteur de l'insuline dans le muscle**

L'invalidation du récepteur de l'insuline restreinte au muscle squelettique est une approche intéressante pour évaluer le rôle de ce tissu face à l'action globale de l'insuline. Ces souris montrent une diminution de la signalisation intracellulaire de l'insuline, un défaut du transport du glucose mais pas de résistance à l'insuline systémique<sup>99</sup>. Ce dernier aspect était inattendu puisque le muscle est considéré comme le tissu le plus important dans l'utilisation du glucose stimulé par l'insuline. On pense que la diminution du transport du glucose serait amoindrie par deux mécanismes de compensation : la signalisation via le récepteur de l'IGF-1<sup>100</sup> et l'activation de la signalisation par la contraction<sup>101</sup>. De plus, le tissu adipeux consommerait plus de glucose pour contrebalancer, comme le suggère l'obésité de ces souris<sup>102</sup>. Cette hypothèse est aussi appuyée par une plus grande intolérance au glucose observée dans les souris invalidées à la fois dans le muscle et le tissu adipeux<sup>103</sup>. Enfin, malgré ces mécanismes de compensation, les souris développent un syndrome métabolique, ce qui témoigne de l'importance de ce tissu dans le métabolisme du glucose.

### **2.1.6. Invalidation génétique du récepteur de l'insuline dans le tissu adipeux**

L'invalidation du récepteur de l'insuline uniquement dans le tissu adipeux résulte principalement en la diminution de moitié de la masse adipeuse, et du tiers le contenu global en triglycérides<sup>104</sup>. Ces souris résistent au gain de poids lié au vieillissement et à l'hyperphagie induite par une lésion hypothalamique. Même en mangeant trop, elles restent maigre et conserve une bonne tolérance au glucose. Ces résultats suggèrent donc que la signalisation de l'insuline dans le tissu adipeux n'est pas nécessaire pour maintenir une glycémie normale, mais le serait pour développer et maintenir des réserves de triglycérides dans les adipocytes. L'invalidation du transporteur de glucose GLUT4 spécifiquement dans le tissu adipeux<sup>105</sup> résulte en un phénotype beaucoup plus sévère (e.g. résistance à l'insuline et intolérance au glucose), ce qui démontre l'importance du transport du glucose dans ce tissu qui contient normalement plus de 80% des réserves d'énergie (voir tableau 1).

### **2.1.7. Invalidation génétique du récepteur de l'insuline dans le foie**

Les souris qui n'expriment plus de récepteur de l'insuline dans le foie dénotent une forte résistance à l'insuline et une intolérance au glucose. L'insuline n'est plus en mesure d'abaisser la production hépatique de glucose ni de réguler l'expression des gènes de la gluconéogenèse<sup>106</sup>. L'hyperglycémie induit une hyperinsulinémie, qui ensemble engendrent une résistance à l'insuline périphérique. Un clamp hyperinsulinémique/ euglycémique a démontré que dans cette situation l'augmentation de la production de glucose est un effet direct, et non un apport excédentaire de substrats gluconéogéniques<sup>107</sup>. La production hépatique de glucose, mais aussi la clairance de l'insuline, rendent le foie si important dans le métabolisme du glucose.

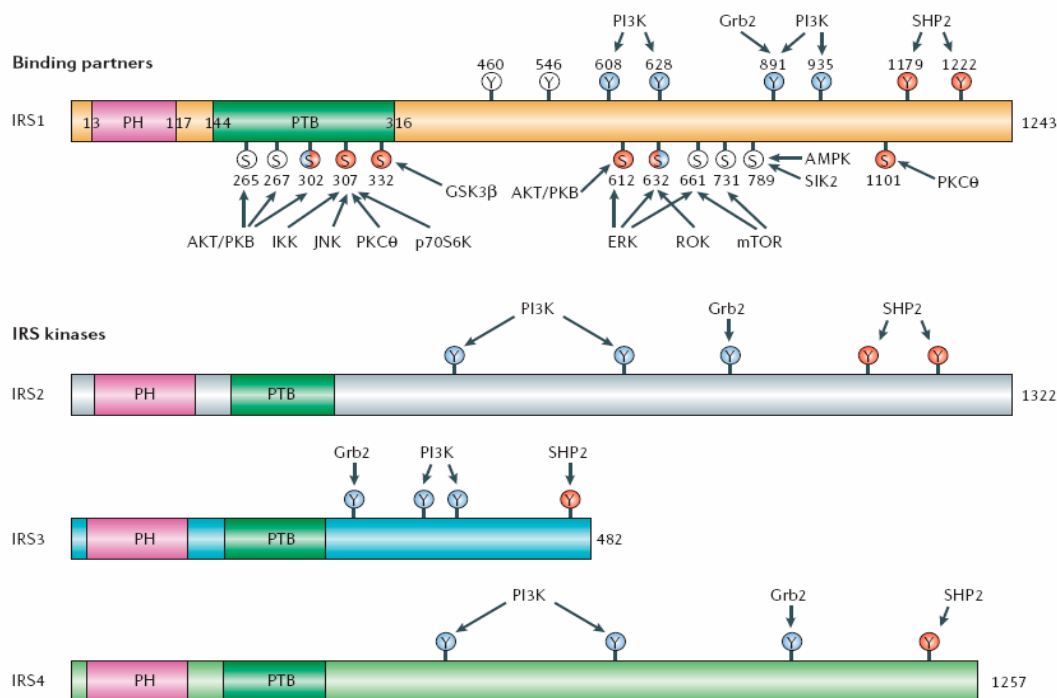
## **2.2. Les protéines IRS**

### **2.2.1. Structure et fonction**

Il existe quatre isoformes d'IRS, désignés IRS-1, -2, -3 et -4 selon l'ordre de découverte (figure 3). IRS-1 a d'abord été détecté par immunoprécipitation avec un anticorps anti-phosphotyrosine à partir de cellules Fao stimulées à l'insuline<sup>108</sup>. Encodé par un seul exon, la séquences nucléotidique prédit

un poids moléculaire de 131 kDa, mais sa vitesse de migration sur SDS-PAGE lui a d'abord valu le nom de pp185 (migration à 185 kDa)<sup>109</sup>. Ce retard de migration s'explique par l'abondance de résidus phosphorylés.

La principale fonction des protéines IRS est de faire le pont entre le récepteur de l'insuline activé et les protéines de signalisation en aval. Pour accomplir cette tâche, IRS-1 possède en sa région N-terminale un domaine PH (*Pleckstrin Homology*) et un domaine PTB. L'interaction de ces domaines avec les phospholipides des membranes cellulaires et les tyrosines phosphorylées du récepteur de l'insuline, respectivement, est nécessaire à la localisation cellulaire d'IRS-1. La phosphorylation par le récepteur de l'insuline d'un mutant tronqué (IRS-1 delta PH) est significativement réduite<sup>110</sup>. Par contre, la surexpression du récepteur de l'insuline ramène la phosphorylation d'IRS-1 à des niveaux normaux, ce qui suggère que le domaine PH est important pour la propagation optimale du signal, mais n'est pas complètement essentiel. Ce domaine est très spécifique à IRS-1 puisqu'il ne peut pas être substitué par le domaine PH d'une autre molécule de signalisation<sup>111</sup>. Le mécanisme impliqué n'est pas totalement compris, toutefois, une protéine qui interagit avec ce domaine PH a été décrite et nommée PHIP pour *PH domain-interacting protein*. La forte inhibition de l'action de l'insuline par l'expression d'un mutant inactif de PHIP dans les cellules L6 confirme l'importance de ce partenaire<sup>112</sup>. Finalement, la région C-terminale englobe une multitude de sites de phosphorylation. On y retrouve plus d'une vingtaine de résidus tyrosine potentiellement phosphorylés par le récepteur de l'insuline<sup>113,114</sup>. Ces phosphorylations permettent le recrutement des molécules de signalisation près du récepteur de l'insuline activé via leurs domaines SH2 pour ainsi propager le signal insulinique. A l'opposé, IRS-1 serait inhibé par la phosphorylation de certains résidus sérine<sup>114</sup>. De plus, une boucle de rétroaction négative aurait à sa disposition plus de 70 résidus sérine potentiels pour contrôler l'ampleur du signal. La phosphorylation d'une sérine interfère habituellement avec les fonctions du domaine qu'elle occupe. Par exemple, la phosphorylation d'une sérine qui se retrouve dans le domaine PTB rendra plus ardu l'interaction d'IRS-1 avec le récepteur de l'insuline.



**Figure 3.** Structure des quatre isoformes d'IRS. Les domaines communs PH et PTB sont représentés. La position des tyrosines (Y) qui sont phosphorylés par le récepteur de l'insuline, et les protéines de signalisation qui interagissent avec ces tyrosines sont indiqués. La position des résidus sérine et le nom des kinases qui les ciblent sont aussi représentés. Tiré de Taniguchi *et al.* 2006<sup>115</sup>

IRS-1 et IRS-2 ont beaucoup en commun. Ils ont une distribution similaire à travers l'organisme. Les séquences d'acides aminés à leurs extrémités N-terminales, où l'on retrouve les domaines PTB et PH, montrent une identité de 75%. En C-terminal, cette identité n'est que de 35%, mais on y retrouve près d'une vingtaine de sites de phosphorylation sur tyrosine très similaires<sup>116</sup>. Cependant, trois sites d'IRS-1 ne sont pas présents sur IRS-2, et à l'inverse, IRS-2 possède quatre sites uniques. Aussi, la localisation intracellulaire des IRSs est disparate. Dans les adipocytes 3T3-L1, IRS-1 est abondant dans les membranes intracellulaires, alors que IRS-2 est plutôt cytosolique<sup>117</sup>. Aussi, en plus du domaine PTB, IRS-2 interagit avec les phosphotyrosines du récepteur via un second domaine qui lui est propre<sup>118,119</sup>. Ces différences expliquent sûrement en partie les écarts fonctionnels qu'il existe entre ces deux isoformes. La nature et la cinétique d'activation varient d'un isoforme à l'autre. À titre d'exemple, IRS-1 interagit fortement avec Grb2 pour induire la voie des MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), alors que IRS-2 interagit que très peu avec Grb2. Cela



suggère donc que, dans ces conditions, IRS-1 a une affectation mitogénique plus importante que IRS-2<sup>120</sup>.

Les deux autres isoformes, IRS-3 et IRS-4, sont beaucoup moins importants dans la signalisation de l'insuline. Chez les rongeurs, IRS-3 est principalement exprimé dans les adipocytes, et n'est probablement pas exprimé chez l'humain<sup>121</sup>. IRS-4, quant à lui, est exprimé chez l'humain, mais n'est probablement pas très impliqué dans la signalisation de l'insuline puisque son invalidation chez la souris n'affecte pas de façon marquée l'homéostasie glycémique<sup>122</sup>.

### **2.2.2. Invalidation génétique des IRSs**

L'invalidation d'IRS-1 a pour principale conséquence un retard de croissance, intra-utérin et post-natal. Ces souris montrent une légère résistance à l'insuline dans le muscle<sup>123</sup> et le tissu adipeux<sup>124</sup> sans toutefois développer le diabète<sup>124,125</sup> puisque, malgré une diminution du contenu en insuline et une certaine irrégularité de sécrétion<sup>126</sup>, une augmentation de l'insulinémie suffit pour y contrevenir. Dans le foie, IRS-2 viendrait compenser la perte d'IRS-1 pour maintenir la sensibilité à l'insuline. Ces résultats font donc d'IRS-1 un important modulateur de la croissance, mais son implication dans la signalisation via un récepteur homologue, le récepteur de l'IGF-1, rend incertaine sa réelle implication dans la croissance dépendante de l'insuline. Par contre, ces résultats nous indiquent plus clairement que le rôle d'IRS-1 dans le métabolisme du glucose est plus important dans le tissu adipeux et le muscle que dans le foie, sans toutefois y être primordial.

De l'autre côté, l'invalidation d'IRS-2 chez la souris crée une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques. Un défaut de croissance des cellules  $\beta$ -pancréatiques empêche la compensation quantitative, cédant ainsi au développement de l'hyperglycémie et du diabète; certains mâles vont succomber à un coma hyperosmolaire<sup>127</sup>. Par contre, le transport du glucose dans le muscle stimulé par l'insuline n'est pas affecté par la délétion d'IRS-2, mais c'est plutôt une production hépatique de glucose incontrôlée qui serait à l'origine de ce diabète<sup>128</sup>. Il devient donc évident qu'IRS-2 est très important dans le métabolisme du glucose, tant au niveau de la sécrétion que de la sensibilité à l'insuline, dans le foie plus particulièrement.

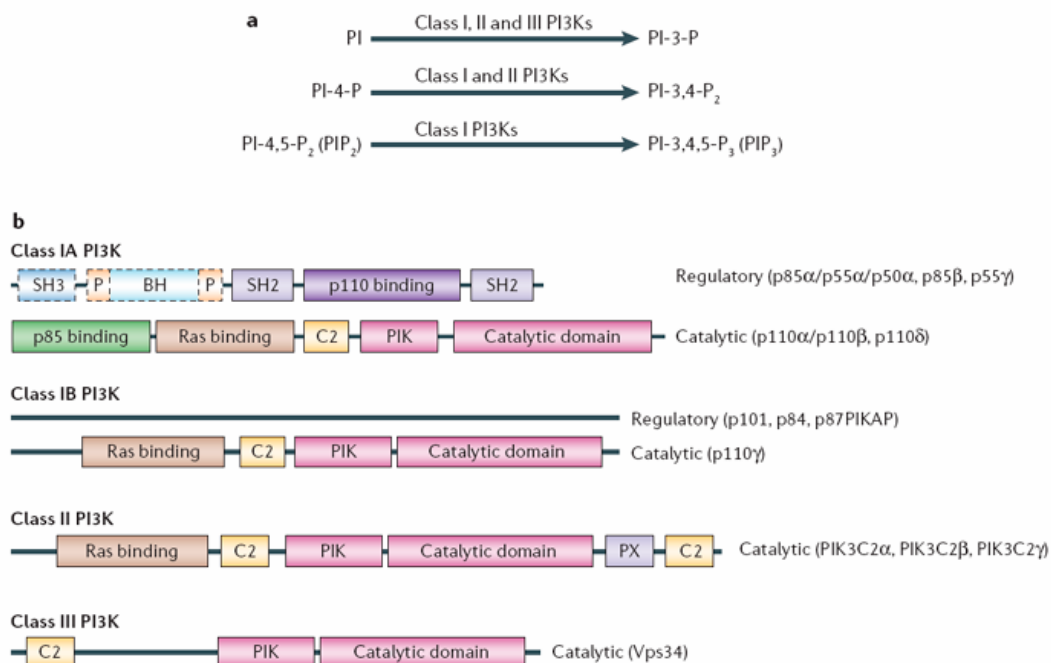
Pour mieux cerner le rôle de chaque isoforme dans le foie, l'expression de chacun d'eux a été réduite spécifiquement dans cet organe par interférence des ARNs à l'aide d'adénovirus (AdV)<sup>129</sup>. La réduction d'IRS-1 a causé une augmentation de la gluconéogenèse alors que la réduction d'IRS-2 a plutôt affecté les enzymes lipogéniques et augmenté l'accumulation de gras dans le foie. Ces résultats montrent que, malgré certaines compensations, chaque isoforme a des fonctions précises.

## 2.3. La PI3K

### 2.3.1. Structure et fonction

Il existe trois grandes classes de PI3K (I-III) divisées selon la préférence des substrats et l'homologie des séquences (figure 4a). La PI3K catalyse la réaction de phosphorylation du groupe 3'-hydroxyl du phosphatidylinositol (PI) et de phosphoinositides. Les PI3K de classe I génèrent principalement des phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) à partir de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI-4,5-P<sub>2</sub>). Les PI3K de classe II génèrent des phosphatidylinositol-3-phosphate (PI-3-P) et des phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PI-3,4-P<sub>2</sub>) *in vitro*, et possiblement des PIP<sub>3</sub> *in vivo*. Finalement, les PI3K de classe III génèrent essentiellement des PI-3-P à partir de PI<sup>130</sup>.

Dans chacune des trois classes, la PI3K démontre des structures particulières (figure 4b). Les PI3K de classe IA sont des hétérodimères formés d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110. Trois différents gènes codent pour les isoformes p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  et p55 $\gamma$  de la sous-unité régulatrice p85 alors que des sites alternatifs d'initiation de la transcription permettent l'expression des isoformes p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$ . Communément, on retrouve sur ces isoformes un domaine de liaison à la sous-unité p110 bordé par deux domaines SH2. Trois gènes distincts codent pour les trois isoformes p110 de la PI3K de classe IA : p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$ . Ils possèdent tous un domaine de liaison à la sous-unité p85 et un domaine catalytique. Les sous-unités p110 ne semblent pas avoir de spécificité de liaison face aux sous-unités régulatrices, laissant donc place à la formation d'une multitude d'hétérodimères différents.



**Figure 4.** Classification des PI3K. (A) Les différentes classes de PI3K catalysent la même réaction de phosphorylation, mais ont des substrats préférentiels différents. (B) Chaque classes possèdent des caractéristiques structurales particulières. Seuls les membres de la classe I possèdent des sous-unités régulatrices. Les isoformes p55 $\gamma$ , p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$  ne possèdent pas la queue N-terminale (pointillé). Tiré et adapté d'Engelman *et al.* 2006 <sup>131</sup>

Les PI3K de la classe IB sont aussi des hétérodimères, mais composés des sous-unités régulatrices et catalytiques p101 et p110 $\gamma$ . Bien que p110 $\gamma$  soit très homologue à ses collègues de classe IA, la sous-unité régulatrice de classe IB est très différente. L'absence des domaines SH2 marque entre autre une différence fonctionnelle importante. Deux nouvelles sous-unités régulatrices de cette classe ont récemment été identifiées : p84 et p87<sup>PIKAP</sup> <sup>132,133</sup>.

Les membres des classes II et III sont composés uniquement d'une sous-unité catalytique. Trois gènes codent distinctement pour les trois isoformes de la classe II, PIK3C2 $\alpha$ , PIK3C2 $\beta$  et PIK3C2 $\gamma$ , qui sont tout de même très homologues aux sous-unités p110 de la classe I. Enfin, Vsp34 (*vacuolar protein-sorting defective 34*), nommé ainsi pour son rôle décrit à sa découverte, est le seul membre de la classe III (voir <sup>131</sup> pour une revue).

Les particularités des isoformes de la PI3K se reflètent nécessairement sur les fonctions qu'ils accomplissent. Les domaines SH2 des sous-unités régulatrices de la classe IA en font d'importants médiateurs des RTKs, d'où leur rôle dans la croissance, migration et prolifération cellulaire, mais aussi dans le métabolisme du glucose.

Les domaines SH2 de la sous-unité p85 vont donc reconnaître les résidus tyrosine phosphorylés des IRSs et se rendre au complexe récepteur/IRS, près de la membrane, en transportant la sous-unité catalytique p110. Le rôle du « taxi p85 » semble particulièrement important puisqu'une mutation sur p110 le ciblant à la membrane le rend constitutivement actif<sup>134</sup>. Cependant, la liaison de p85 à p110 contrôle aussi la stabilité et l'activité de p110 en exerçant sur lui une constante inhibition. La liaison de p85 à IRS, accompagnée d'une phosphorylation sur le résidu tyrosine 688 de p85 par des kinases de la famille Src<sup>135</sup>, a pour effet de suspendre cette inhibition<sup>136,137</sup>. Donc, p110 se retrouve du coup activé et près de la membrane, où il peut phosphoryler des PI-4,5-P<sub>2</sub> pour générer des PIP<sub>3</sub>. L'action de la PI3K en réponse à une stimulation à l'insuline est donc l'accumulation de PIP<sub>3</sub> à la membrane, jusqu'à ce que les phosphatases PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) ou SHIP-2 (*Src homology 2 domain containing inositol 5' phosphatase-2*) les déphosphorylent<sup>138</sup>. Ces PIP<sub>3</sub> serviront à recruter et à activer les médiateurs en aval, tel la protéine kinase B (PKB/Akt).

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PI3K comme la wortmannin<sup>139,140</sup> et le LY294002<sup>141</sup> montre bien l'importance de la PI3K. En effet, la wortmannin bloque presque complètement le transport du glucose induit par l'insuline dans les adipocytes 3T3-L1. Cependant, l'apport de PIP<sub>3</sub>, perméable à la membrane, ne parvient pas à récupérer de cette inhibition, et seul, il reste sans aucun effet<sup>142</sup>. Cela suggère que la PI3K est essentielle, mais insuffisante à l'augmentation du transport du glucose.

### 2.3.2. Invalidation génétique de la PI3K

### 2.3.2.1. Invalidation des sous-unités régulatrices

Il existe cinq isoformes de sous-unités régulatrices de classe IA. L'invalidation d'un isoforme fait souvent varier l'expression des autres, ce qui apparaît être une compensation quantitative. De plus, il est probable que l'abolition d'un isoforme favorise le recrutement d'un autre, sans qu'il ne soit nécessairement surexprimé. L'interprétation devient donc très ardue puisque de changer la prédominance des isoformes change possiblement la réponse de façon qualitative et quantitative.

L'expression de la sous-unité catalytique est aussi modulée par l'invalidation des sous-unités régulatrices. La diminution de la quantité de p110 lorsque p85 est invalidé confirme bien le rôle de stabilisateur de p85 sur p110<sup>137</sup>, et cela, corrélativement au niveau d'expression original de l'isoforme p85 invalidé (où l'expression de p85 $\alpha$  est plus grande que l'expression de p85 $\beta$ , par exemple).

D'un point de vue plus physiologique, on s'attendait à voir s'installer une résistance à l'insuline puisque l'inactivation de la voie PI3K est défavorable à l'action de l'insuline. De façon surprenante, l'invalidation des isoformes des sous-unités régulatrices résulte en une meilleure sensibilité à l'insuline et une meilleure tolérance au glucose. Dans les rares cas où la quantité de PIP<sub>3</sub> a directement été mesurée, elle s'est souvent montrée élevée par rapport aux contrôles<sup>143,144</sup>, ce qui s'est traduit en une plus grande phosphorylation en aval de Akt. Par contre, l'activité PI3K mesurée dans des immunoprécipitats de phosphotyrosine et d'IRS n'était pas nécessairement corrélée.

Mais comment expliquer cette apparente dichotomie!? D'abord, nous savons que le complexe p85/p110 peut lier directement des lipides phosphatases<sup>145,146</sup> ou prendre part au complexe de signalisation de celles-ci<sup>147,148</sup>. Donc, on peut penser que l'augmentation de PIP<sub>3</sub> dans les cellules résulte d'une diminution de l'activité phosphatase. Une autre explication viendrait de l'activité biologique des sous-unités régulatrices indépendantes des sous-unités p110 (revue dans <sup>149</sup>). Il semblerait que la région N-terminale des sous-unités p85 de classe IA ait un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine et du cycle cellulaire. L'activation de JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) par l'insuline, défectueuse en absence de p85, est récupérée par la transfection de p85 $\alpha$  et p85 $\beta$ , mais pas de p55 $\alpha$  ni p50 $\alpha$  qui ne possèdent pas la queue N-terminale (voir figure 4b, pointillé)<sup>150</sup>. Il reste par contre à mieux définir ce domaine actif, et à préciser son possible rôle dans la sensibilité à

l'insuline. Aussi, nous avons vu que les sous-unités régulatrices, en attendant une stimulation, exercent assidûment une inhibition sur les sous-unités catalytiques. Cela nous permet de penser qu'une diminution de la quantité de sous-unités régulatrices permet à des sous-unités catalytiques libres d'exercer sans restriction leurs fonctions. Cette dernière hypothèse est compatible avec le manque d'augmentation de l'activité PI3K mesurée dans les immunoprécipitats de phosphotyrosine et d'IRS, puisque ces sous-unités catalytiques, libres et actives, n'y seraient tout simplement pas associées. Finalement, nous pouvons imaginer que la diminution de sous-unités régulatrices augmente la quantité de complexe p85/p110 par rapport à la quantité de p85 libres, favorisant ainsi l'interaction de p85/p110 avec ses effecteurs.

Enfin, l'invalidation de l'ensemble des isoformes de la classe IA, dans le muscle<sup>151</sup> ou dans le foie<sup>152</sup>, mène à un défaut sévère de signalisation de l'insuline, et aux symptômes qui s'y rattachent. Ces résultats montrent donc, en dehors de compensations possibles, que la signalisation via la PI3K de classe I est essentielle à l'action de l'insuline *in vivo*. Du reste des études, on retient que les sous-unités régulatrices jouent un rôle autant négatif que positif, possiblement en fonction de sa quantité, en excès ou non par rapport à p110.

### **2.3.2.2. Invalidation des sous-unités catalytiques**

L'invalidation des sous-unités catalytiques est assurément une approche plus directe et plus brusque pour évaluer le rôle des isoformes de la PI3K. Il y a trois isoformes dans la classe IA : p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$ . Les embryons invalidés pour p110 $\alpha$  meurent à la moitié de la gestation<sup>153</sup>. On a pu remarquer une surexpression de p85, probablement un effort compensatoire. Toutefois, il devient possible que ce surplus de p85 libre se retrouve sur des sites tyrosine phosphorylés et vienne entraver l'accès à d'autres molécules de signalisation. En ce sens, en plus du manque de p110 $\alpha$ , l'excès de p85 pourrait très bien inhiber les complexes p85/p110 $\beta$  et p85/p110 $\delta$ <sup>150</sup>. Aussi, on sait que p85 $\alpha$  peut séquestrer les protéines IRS, et donc l'activité PI3K qui leur est associée, dans un compartiment cellulaire pauvre en substrat<sup>154</sup>. Ce n'est donc pas si clair si l'inhibition de p110 $\alpha$  uniquement mènerait à la mort embryonnaire. Le rôle de p110 $\alpha$  dans la sensibilité à l'insuline a quand même pu être démontré *in vivo* avec l'insertion d'un gène codant pour une forme mutée inactive de p110 $\alpha$  à des souris<sup>155</sup>. Les homozygotes meurent au stade embryonnaire, mais les

hétérozygotes montrent une signalisation via les protéines IRS déficiente, ce qui dérive entre autre en une perte de croissance de l'animal, une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie.

L'inactivation de p110 $\beta$  est encore plus néfaste<sup>156</sup>. Les embryons meurent après seulement trois jours de développement. La définition de son rôle dans la sensibilité à l'insuline demandera donc des études supplémentaires. Et puis l'inactivation de p110 $\delta$  est plutôt sans effet sur la sensibilité à l'insuline puisqu'il est exprimé principalement dans le système immunitaire.

### 2.3.3. Lipide phosphatase

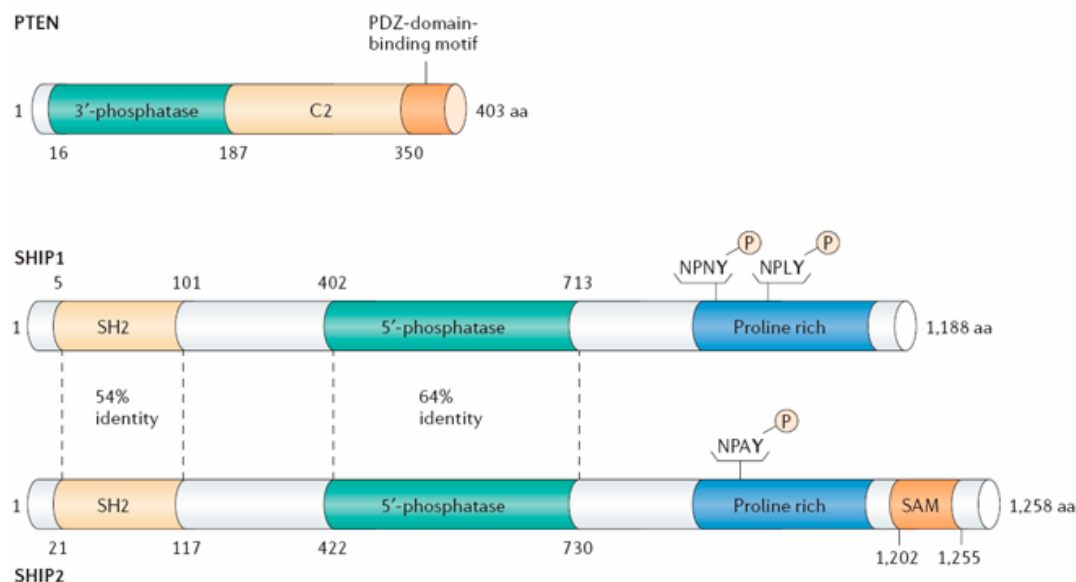
La production de PIP<sub>3</sub> par la PI3K est une étape cruciale à la signalisation de l'insuline. L'ampleur de la réponse est en grande partie déterminée par la quantité intracellulaire de ce lipide. L'accumulation ou la disparition est fonction de l'équilibre entre la production et la déphosphorylation de PIP<sub>3</sub>. Les lipides phosphatases SHIP2<sup>157,158</sup> et SKIP (*skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase*)<sup>159</sup> ont une activité 5'-phosphatase et hydrolysent PIP<sub>3</sub> pour former du PI-3,4-P<sub>2</sub>, alors que PTEN<sup>160</sup> forme plutôt du PI-4,5-P<sub>2</sub> par son activité 3'-phosphatase.

#### 2.3.3.1. SHIP2

##### 2.3.3.1.1. Structure et fonction

Il existe deux isoformes de SHIP, homologues à 45% (voir figure 5). SHIP1 est exclusivement exprimé dans les cellules hématopoïétiques où elle joue un rôle important dans la régulation des immunoglobulines G et la signalisation induite par les cytokines<sup>161,162</sup>. SHIP2, plus largement exprimé, se retrouve en abondance dans le cerveau, le muscle squelettique et cardiaque, et en plus faible quantité dans le foie et les reins<sup>157,163</sup>. Le domaine SH2 en N-terminal et l'extrémité C-terminale sont essentiels à l'interaction avec d'autres protéines ainsi qu'à la localisation subcellulaire de SHIP<sup>164-168</sup>. Le domaine SH2 et le motif NPXY présents dans la région riche en proline servent à la liaison de protéines contenant des résidus tyrosine phosphorylés ou un domaine PTB, respectivement. La région riche en proline permet l'interaction avec des protéines contenant un domaine SH3 (Src-Homology-3). Finalement, le domaine SAM (*sterile  $\alpha$ -motif*), présent seulement

sur SHIP2, permet des associations protéiques homo- et hétérologues en s'associant à d'autres domaines SAM<sup>169</sup>.



**Figure 5.** Représentation schématique des lipides phosphatases PTEN, SHIP1 et SHIP2. Tiré de Lazar *et al.* 2006<sup>170</sup>.

L'insuline induit la phosphorylation sur tyrosine<sup>171</sup> et la translocation du cytosol vers la membrane plasmique de SHIP2<sup>172</sup>. À la membrane, SHIP2 rejoint donc les PIP<sub>3</sub> là où ils sont produits. Cette relocalisation cellulaire est probablement à l'origine de l'inhibition sélective d'Akt2 qui suit le même parcours<sup>172</sup>. Quand on pense que chez la souris, l'inactivation de Akt1 produit principalement un retard de croissance sans trouble métabolique<sup>173,174</sup>, et que l'inactivation de Akt2 affecte plus spécifiquement le métabolisme du glucose<sup>175</sup>, il n'est pas surprenant de voir que la surexpression de SHIP2 inhibe le transport du glucose et la synthèse de glycogène<sup>176,177</sup>.

La surexpression de SHIP2 cause aussi la réduction de l'activation de MAPK par l'insuline. Cette atténuation n'est cependant pas attribuable à l'activité 5'-phosphatase de SHIP2<sup>178,179</sup>. Plutôt, c'est une interaction entre SHIP2 phosphorylé sur un résidu tyrosine et probablement le domaine SH2 de Shc qui empêcherait le recrutement de Grb2, et l'activation en aval de la voie Ras/MAPK.



#### 2.3.3.1.2. *Inactivation génétique de SHIP2*

La délétion spécifique de SHIP2 chez la souris n'affecte pas sa glycémie ni son insulïnémie, malgré une augmentation de l'activation d'Akt par l'insuline dans le muscle et le foie<sup>180</sup>. La tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline ne sont pas affectées. On observe qu'un léger retard de croissance, et un museau raccourci sans autre anomalie du squelette. De façon plus intéressante, ces souris ne développent pas d'hyperglycémie ni de résistance à l'insuline lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en gras. De plus, elles résistent à la prise de poids, qui s'explique par une augmentation de la dépense énergétique de 60%, pourtant équivalente aux souris contrôles alimentées avec un régime usuel. On peut donc penser qu'en plus d'agir dans les tissus périphériques, SHIP2 régule la prise alimentaire et/ou la dépense énergétique en régulant la signalisation de l'insuline dans le cerveau, où l'on sait qu'elle est exprimée<sup>180</sup>.

Chez l'humain, on croit que SHIP2 pourrait être associé à certains cas de diabète de type 2. En effet, certains polymorphismes sont présents plus régulièrement chez des sujets atteints que chez des sujets sains. Au Royaume-Uni et en Belgique, une mutation semble augmenter l'activité du promoteur de SHIP2, donc probablement son expression<sup>181</sup>. En France et en Grande Bretagne, quelques polymorphismes ont été associés à l'hypertension et au diabète de type 2, mais on ne connaît pas encore les mécanismes exacts impliqués<sup>182</sup>.

### 2.3.3.2. PTEN

#### 2.3.3.2.1. *Structure et fonction*

PTEN est une petite protéine de 403 acides aminés. Son domaine catalytique 3'-phosphatase, qui occupe pratiquement toute la moitié N-terminale (voir figure 5), est aussi impliqué dans la localisation subcellulaire de PTEN. Au centre de la protéine se trouve un domaine C2 qui permet des interactions avec les phospholipides. En C-terminal, on y trouve un domaine de liaison pour les protéines possédant un domaine PDZ, ainsi que des sites de phosphorylation<sup>183</sup>.

Quelques études montrent que PTEN a aussi une activité protéine phosphatase, et pourrait s'auto-déphosphoryler<sup>184</sup>, s'attaquer à FAK (*focal adhesion kinase*)<sup>185</sup> ou au récepteur du PDGF (platelet derived growth factor)<sup>186</sup>. Par contre, d'autres études sont nécessaires pour élucider les conséquences biologiques de ces déphosphorylations.

Bien que PTEN puisse déphosphoryler PI-3-P, PI-3,4-P<sub>2</sub> et PIP<sub>3</sub> *in vitro*, PIP<sub>3</sub> est le plus important substrat *in vivo*. PTEN est un important régulateur négatif de l'action de la PI3K dans plusieurs types cellulaires. Il est souvent vu comme un suppresseur de tumeurs puisqu'il s'oppose aux actions anti-apoptotiques, prolifératives et hypertrophiques de la voie PI3K<sup>187,188</sup>. Il s'oppose aussi aux effets de la PI3K dans l'action de l'insuline. Par exemple, une réduction de 50% de la quantité de PTEN par interférence des ARNs produit une augmentation de l'accumulation de PIP<sub>3</sub>, de la phosphorylation d'Akt et du transport du glucose en réponse à l'insuline<sup>189</sup>.

La production de ROS (*reactive oxygen species*) induite par l'insuline inhibe l'activité de PTEN, ce qui d'une certaine façon accentue l'action de l'insuline. La phosphorylation de PTEN par GSK-3, un effecteur en aval d'Akt, inhibe aussi son activité. Mais puisque l'insuline inhibe GSK-3, cette phosphorylation forme plutôt une boucle de rétroaction négative. Puisque PTEN régule l'action de l'insuline, qui elle-même régule PTEN (Voir <sup>183</sup> pour une revue complète de la régulation de PTEN), il est évident qu'un léger déséquilibre de cette voie pourrait rapidement dégénérer en résistance à l'insuline.

#### 2.3.3.2.2. *Invalidation génétique de PTEN*

Les souris complètement invalidées pour PTEN meurent pendant le développement embryonnaire. La mutation hétérozygote est viable mais produit des tumeurs dans une multitude d'organes<sup>190,191</sup>.

Lorsque l'invalidation est limitée au foie, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline s'en trouve améliorées<sup>192,193</sup>. La production hépatique de glucose est affectée par une baisse de l'expression des enzymes gluconéogéniques PEPCCK et G6P, et une augmentation de la synthèse de glycogène reflète une diminution de la glycogénolyse. Par contre, les souris développent une stéatose hépatique et à 18 mois, elles ont toutes au moins une tumeur. La mutation hétérozygote

spécifique au foie permet d'éviter ces problèmes, mais les améliorations du métabolisme du glucose disparaissent également.

L'invalidation restreinte au tissu adipeux améliore aussi la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline<sup>194</sup>. Cette amélioration est plus marquée après la destruction partielle de la masse  $\beta$ -pancréatique par un traitement à faible dose de STZ où seuls les animaux contrôles montrent une hyperglycémie. Dans ces conditions, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline compense pour la diminution des niveaux d'insuline sanguine.

Enfin, l'invalidation circonscrite au muscle squelettique ne provoque pas de changement à première vue<sup>195</sup>. Par contre, lorsque les animaux sont nourris avec un régime riche en lipides, les souris invalidées pour PTEN sont protégées contre l'apparition de l'intolérance au glucose et d'une réduction de la sensibilité à l'insuline, et ce malgré une prise de poids identique à leurs consœurs. Aussi, il est à noter que ni le tissu adipeux, ni le muscle squelettique ne montrent l'apparition de tumeurs aux suites de ces invalidations spécifiques.

Chez l'homme, trois mutations à l'intérieur du gène de PTEN ont été associées au diabète de type 2 dans une population japonnaise<sup>196</sup>. La substitution particulièrement fréquente d'un nucléotide (C-9G) dans la région non-transcrite du premier exon induit la surexpression de PTEN. Ce gène muté affecte plus lourdement la phosphorylation d'Akt que le gène sauvage lorsqu'ils sont introduits dans les cellules Cos-1.

### **2.3.3.3. SKIP**

SKIP est une lipide phosphatase largement exprimée, mais particulièrement abondante dans le muscle squelettique, le cœur et le rein<sup>159</sup>. L'insuline induit la translocation de SKIP de l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane, lui permettant de rejoindre les phospholipides. Il a été démontré que la surexpression de SKIP dans les cellules CHO réduit la production de PIP<sub>3</sub> et la phosphorylation d'Akt. Dans les cellules L6, cette surexpression diminue fortement la translocation de GLUT4, le transport du glucose et la synthèse de glycogène<sup>197</sup>.

La distribution tissulaire de SKIP et ses effets dans les myocytes L6 lui suggèrent donc un rôle dans le métabolisme du glucose, plus spécifiquement dans le muscle squelettique. D'autres études sont nécessaires pour évaluer son rôle dans les autres tissus cibles de l'insuline. De plus, la génération de souris transgéniques (invalidation ou surexpression) sera très importante pour confirmer le rôle de SKIP dans le métabolisme du glucose *in vivo*.

## 2.4. La protéine kinase B

### 2.4.1. Structure et fonction

Dans le génome des mammifères, trois chromosomes différents portent les trois gènes (Akt1, Akt2 et Akt3) qui codent pour trois isoformes protéiques du même nom<sup>198</sup>. Lorsqu'on compare les séquences peptidiques, Akt2 et Akt3 ont une homologie de 81 et 83% avec Akt1, respectivement<sup>199</sup>. Cependant, ces isoformes diffèrent de par leur distribution à travers l'organisme (voir tableau 1). Chacun possède un domaine PH à son extrémité N-terminale qui permet une interaction avec les phospholipides PIP<sub>3</sub>; c'est à ce domaine que les isoformes ont la moins grande homologie<sup>200</sup>. Un domaine catalytique sérine/thréonine kinase occupe la partie centrale de la protéine. C'est l'homologie de ce dernier avec celui de la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) qui a valu à Akt le surnom de PKB (respectivement  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et *related to protein kinase A and C* (RAC). Finalement, un domaine de régulation de l'activité kinase loge en son extrémité C-terminale.

La stimulation à l'insuline active la PI3K, ce qui mène à la conversion des PI-4,5-P<sub>2</sub> de la membrane cellulaire en PIP<sub>3</sub>. L'action de ce second messager est principalement opérée par les protéines qui possèdent un domaine PH, qui se lie préférentiellement à ces PIP<sub>3</sub> plutôt qu'aux autres PI. Akt qui contient un tel domaine va donc migrer jusqu'à la membrane suivant la stimulation à l'insuline pour rejoindre ces phospholipides<sup>201,202</sup>. On croit que sa liaison aux PIP<sub>3</sub> induit un changement de conformation qui exposerait ses deux principaux sites de phosphorylation (Akt1 : thréonine 308 et sérine 473, Akt2 : 308 et 474, Akt3 : 309 et 472 respectivement<sup>198</sup>)<sup>203</sup>. PDK1 (*PI-dependent kinase-1*) qui se retrouve aussi à la membrane, attiré par les mêmes PIP<sub>3</sub>, est quant à lui constitutivement

actif. Ce rapprochement avec Akt lui permet de le phosphoryler sur son résidu thréonine, ce qui le stabilise et lui donne une conformation active. Sa pleine activation sera possible seulement par une seconde phosphorylation, sur la sérine 473 positionnée dans le domaine de régulation, effectuée par une seconde kinase qu'on nomme PDK2. L'identité exacte de cette dernière n'est pas encore bien établie. Akt elle-même<sup>204</sup>, ou encore un ensemble d'enzymes sont possiblement à l'origine de cette phosphorylation<sup>205</sup>. Récemment, un complexe enzymatique formé de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et RICTOR (*rapamycin insensitive companion of mTOR*) s'est vu attribuer un rôle dans cette phosphorylation<sup>206,207</sup>. Enfin, Akt ainsi phosphorylé quittera la membrane cellulaire pour rejoindre ses différents substrats<sup>208</sup>. La phosphorylation de Akt sur ses résidus sérine et thréonine est souvent prise en compte pour estimer l'activité de l'enzyme, mais la phosphorylation sur des résidus tyrosine, par une ou plusieurs kinases encore inconnues, semble aussi importante pour son activation<sup>209,210</sup>. Akt possède un vaste éventail de 35 substrats connus, et simplement pour son rôle dans le métabolisme du glucose, plusieurs ont déjà été identifiés<sup>211</sup>.

	Expression élevée	Expression faible à modérée
<b>Akt1</b>	Cerveau, coeur, testicule, thymus	Rein, foie, rate
<b>Akt2</b>	Tissu adipeux brun, cervelet (cellule de Purkinje), coeur, muscle squelettique	Cerveau, rein, poumon, rate, testicule
<b>Akt3</b>	Cerveau, testicule	coeur, rein, foie, poumon, muscle squelettique, rate

**Tableau 2.** Profil d'expression des isoformes d'Akt. Tiré et traduit de Zdychova *et al.* 2005 <sup>212</sup>

La glycogène synthase kinase-3 (GSK3) fût la première cible physiologique d'Akt à être identifiée<sup>213</sup>. Sa phosphorylation diminue son activité envers la glycogène synthase, ce qui finalement augmente la synthèse de glycogène (glycogénèse)<sup>214</sup>. L'insuline favorise ainsi l'entreposage de glucose, mais contrôle aussi la glycémie en diminuant la production hépatique de glucose en favorisant la synthèse au détriment de la dégradation du glycogène (glycogénolyse).

Akt régule aussi le transport du glucose dans les adipocytes et les myocytes. Akt phosphoryle et inhibe la protéine activatrice de GTPases (GAP) AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*)<sup>215</sup>. Cela augmente l'activité des GTPases Rab2A, Rab8A, Rab10 et/ou Rab14 qui sont impliquées dans la réorganisation du cytosquelette essentielle à la translocation de GLUT4, étape cruciale à l'augmentation du transport du glucose. L'invalidation d'AS160 dans des adipocytes augmente le niveau basal de GLUT4 à la membrane, suggérant qu'AS160 contribue à la rétention de GLUT4 à l'intérieur de la cellule<sup>216</sup>.

PIKfyve (*FYVE domain-containing PI-3-P 5-kinase*) est aussi un substrat d'Akt qui contrôle la quantité de GLUT4 à la membrane plasmique. Son domaine FYVE lui permet d'interagir avec des PI-3-P qu'elle transforme en PI-3,5-P<sub>2</sub>. En présence d'insuline, Akt active PIKfyve par une phosphorylation sur sa sérine 318<sup>217</sup>. Dans les adipocytes 3T3-L1, l'expression d'un mutant auquel on a substitué cette sérine pour une alanine (S318A) augmente la translocation de GLUT4 à la membrane. Bien que le mécanisme impliqué ne soit pas encore identifié, la phosphorylation de PIKfyve par Akt et/ou les PI-3,5-P<sub>2</sub> produits semblent donc importants pour la mobilité de GLUT4.

Pour être opérante, la translocation de GLUT4 à la membrane requiert l'amarrage et la fusion des vésicules intracellulaires enrichies en GLUT4 à la membrane cellulaire (voir section 3.1.1). Synip (*syntaxin-4-interacting protein*), une protéine qui régule ce processus, est phosphorylée sur sa sérine 99 par Akt2, mais non par Akt1, ni Akt3, en réponse à une stimulation à l'insuline<sup>218</sup>. L'importance de ce processus a été démontrée par l'expression d'un dominant négatif de Synip (mutation S99F). En effet, ce mutant bloque le recrutement et la fusion des membranes enrichies en GLUT4. Étonnamment, cet effet n'a pas été obtenu avec le mutant S99A<sup>219</sup>. Enfin, la co-localisation d'Akt2 avec ces vésicules a été observée dans des adipocytes, et s'est vu être augmentée en présence d'insuline<sup>220</sup>.

Akt phosphoryle et inhibe aussi la tubérine (aussi connu sous le nom de TSC2) qui est associée à l'hamartine (TSC1). L'inhibition de ce complexe TSC1/2 permet l'activation de la GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) qui par la suite active le modulateur de la croissance cellulaire mTOR. En formant un complexe avec RAPTOR (*regulatory associated protein of mTOR*), mTOR régule la

synthèse protéique en phosphorylant la protéine ribosomale p70/S6 kinase (S6K1) et le facteur d'initiation de la traduction 4EBP-1 (*4E binding protein-1*)<sup>221</sup>. L'inhibition de cette voie par l'expression de mutants inactifs de PI3K ou d'Akt empêche l'insuline d'augmenter le niveau de traduction de GLUT1 par exemple<sup>222</sup>. L'activation de mTOR et de son effecteur S6K1 sert aussi de boucle de rétroaction négative sur la signalisation de l'insuline. En stimulant la phosphorylation inhibitrice (→ résidus sérine) d'IRS-1, S6K1 gêne sa phosphorylation activatrice (→ résidus tyrosine) et favorise sa dégradation (voir section 4.2.1). L'inhibition de la voie mTOR/raptor/S6K1 avec la rapamycine est favorable à l'action de l'insuline dans les hépatocytes HepG2<sup>223</sup>, les myocytes L6<sup>224</sup> et les adipocytes 3T3-L1<sup>225</sup>. De plus, il a été proposé que Akt puisse réduire l'activité de l'AMPK, dépendante du ratio AMP/ATP intracellulaire, en augmentant la production d'ATP<sup>226</sup>. Puisque l'AMPK active normalement TSC2<sup>227,228</sup>, l'inhibition de l'AMPK représente un second mécanisme pour inactiver TSC2, et ainsi activer mTOR<sup>229</sup>. Enfin, il a été démontré que PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40*) est phosphorylé sur son résidu thréonine 246 par Akt en réponse à l'insuline<sup>230,231</sup>. Récemment, cette phosphorylation s'est montrée indispensable pour que PRAS40 se dissocie du complexe mTOR/RAPTOR et cesse de l'inhiber<sup>232</sup>.

En contrôlant l'activité de certains facteurs de transcription, Akt régule aussi l'expression de gènes essentiels à l'action de l'insuline. FOXO-1 par exemple, promeut la transcription des gènes de la gluconéogenèse dans le foie<sup>233</sup>. Akt inhibe FOXO-1 en le phosphorylant sur sa sérine 256, ce qui le séquestre dans le cytoplasme et prévient ainsi la transcription des gènes qui lui sont associés. La phosphorylation de FOXO-1 par Akt réduit donc considérablement la gluconéogenèse et la production hépatique de glucose. Dans les adipocytes, l'insuline contribuerait à la différenciation par la même voie de signalisation<sup>234</sup>.

L'inhibition d'Akt par l'expression d'un dominant négatif ne bloque pas complètement l'effet de l'insuline sur le transport du glucose<sup>235</sup>. Ce qui suggère l'implication d'une autre voie de signalisation. Il est maintenant bien accepté que les PKC atypiques (PKCa)  $\lambda$  et  $\zeta$  ont aussi un rôle à jouer dans la propagation du signal insulinique. Contrairement au PKC conventionnelles, les PKCa ne sont pas sensibles aux seconds messagers tels le calcium et le diacyl glycérol (DAG). Malgré l'absence d'un domaine PH, leur mécanisme d'activation ressemble beaucoup à celui d'Akt. En effet, l'activation requière la liaison à des PIP<sub>3</sub> et une phosphorylation par PDK1<sup>236</sup>. L'activation des PKCa

ne serait pas seulement dépendante de la voie IRS/PI3K, mais aussi de Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*)<sup>237,238</sup>. L'expression d'un mutant inactif de PKC  $\lambda$  dans les cellules 3T3-L1 réduit le transport du glucose par un peu plus de 50%<sup>239</sup>. Par contre, une réduction de 80% de l'expression des PKC  $\lambda$  et PKC  $\zeta$  par interférence des ARNs n'a pas été suffisante pour réduire le transport du glucose dans ces même cellules<sup>240</sup>. Aussi, l'invalidation de PKC  $\zeta$  chez la souris n'induit seulement que quelques troubles immunologiques<sup>241</sup>. Malgré plusieurs démonstrations de son implication, la contribution exacte des PKCa dans le métabolisme du glucose reste donc à être mieux définie (voir revue dans <sup>242</sup>).

#### 2.4.2. Invalidation génétique d'Akt

Les souris invalidées pour le gène d'Akt1 montrent un retard de croissance et une espérance de vie réduite<sup>173</sup>, mais pas de troubles métaboliques<sup>174</sup>. Dans les cellules 3T3-L1 l'interférence des ARNs, réduisant spécifiquement la quantité d'Akt1 d'environ 95%, réduit par seulement 20-30% le transport du glucose stimulé par l'insuline<sup>243</sup>. Au contraire, les souris invalidées pour le gène Akt2 présentent une résistance à l'insuline et développent le diabète<sup>175</sup>. Cependant, le muscle squelettique et le tissu adipeux de ces souris montrent un défaut du transport du glucose seulement à de faible dose d'insuline, alors que la réponse à la dose maximale n'est pas affectée. La mesure du transport du glucose dans des adipocytes isolés de ces souris a montré une forte diminution qui n'a pu être compensée par la surexpression d'Akt1<sup>244</sup>. La réduction de 70% du contenu en Akt2 par interférence des ARNs dans les 3T3-L1 réduit de 50-58% le transport du glucose<sup>243</sup>.

Finalement, le phénotype murin suite à l'invalidation d'Akt3 ne lui confèrent pas de rôle particulier dans le métabolisme du glucose, mais plutôt un rôle dans le développement neuronal<sup>245</sup>. On peut donc conclure que la voie Akt1/2, mais pas Akt3, est indispensable à la signalisation de l'insuline pour maintenir l'homéostasie glycémique. Akt2 semble pouvoir subvenir seul à la tâche alors qu'Akt1 n'y aurait qu'un rôle secondaire. Jiang *et al.*<sup>243</sup> suggèrent que dans les souris invalidées pour Akt2, la présence d'Akt1 atténue le phénotype. Enfin, chez l'humain, la mutation R274H dans le domaine catalytique d'Akt2 provoque une sévère résistance à l'insuline et le diabète vers la trentaine<sup>246</sup>, ce qui confirme l'importance d'Akt2.



## 2.5. La protéine Cbl et la GTPase TC10

### 2.5.1. Structure et fonction

La première étape dans la signalisation de l'insuline via Cbl est le recrutement de la protéine adaptatrice APS<sup>247,248</sup>. Le domaine SH2 de APS va se lier au récepteur autophosphorylé. APS sera phosphorylé à son tour sur sa tyrosine 618, qui devient le site de liaison du domaine TKB (*Tyrosine kinase binding*) de Cbl homo- ou hétérodimérisé<sup>247,249,250</sup>. Le récepteur de l'insuline phosphoryle Cbl<sup>247,250</sup> qui recrutera alors le complexe CrkII-C3G, où C3G est un facteur d'échange de guanine (GEF), par l'entremise du domaine SH2 de la protéine adaptatrice CrkII. D'autre part, CAP (*Cbl-associated protein*) interagit avec Cbl via son domaine SH3, et tout le complexe Cbl/CrkII/C3G/CAP rejoint la flotilline, une protéine résidente des radeaux lipidiques, une structure membranaire riche en cavéoline. Toute cette collaboration protéique est mise en place pour que finalement C3G s'approche et active la GTPase TC10 qui se trouve dans ces radeaux lipidiques<sup>251,252</sup> (voir <sup>253</sup> et <sup>254</sup> pour une revue sur les protéines Cbl).

Récemment, plusieurs effecteurs de TC10 ont été identifiés<sup>255-260</sup>. Cependant, leurs mécanismes d'action et leur réelle implication dans la régulation de l'action de l'insuline n'ont pas tous été complètement élucidés. Puisque des évidences montrent que TC10 contrôle le réseau d'actine dans les adipocytes<sup>255,261</sup>, ce qui permet de penser que TC10 serait entre autre impliqué dans la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane (voir section 3.1.1).

Les PKC  $\lambda$  et  $\zeta$  sont les seules molécules reconnues pour jouer dans les deux sentiers, PI3K et TC10, qu'on savait complémentaires, mais qu'on croyait parallèles<sup>256</sup>. Les deux sentiers semblent donc converger vers l'activation de PKCa. Par contre, l'activation par TC10, et non par la PI3K, montre un recrutement de ces PKCa activées aux radeaux lipidiques, une différence compartimentale qui cache probablement une différence fonctionnelle. Aussi, l'activation de TC10 augmente la quantité de PI-3-P dans les radeaux lipidiques<sup>262</sup>. L'apport exogène de PI-3-P est suffisant pour stimuler la translocation de GLUT4, autant que l'insuline (!), mais ne parvient pas à

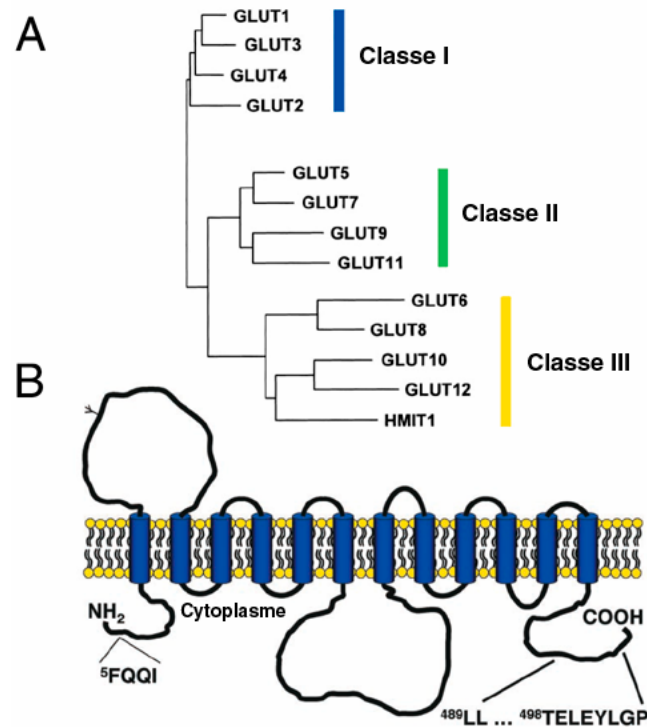
augmenter le transport du glucose. On peut donc imaginer un second croisement entre les voies PI3K et TC10 où cette production de PI-3-P alimenterait Akt et son effecteur PIKfyve.

Cependant, l'importance de cette voie de signalisation fait encore l'objet de débats. Par exemple, l'interférence des ARNs de CAP, Cbl et CrkII n'a montré aucun effet sur métabolisme du glucose dans les 3T3-L1<sup>263</sup>. De plus, contrairement à ce que plusieurs études auraient appuyé<sup>247,250,252,264,265</sup>, l'invalidation de c-Cbl chez la souris augmente la sensibilité à l'insuline<sup>266</sup>.

### 3. Les transporteurs de glucose

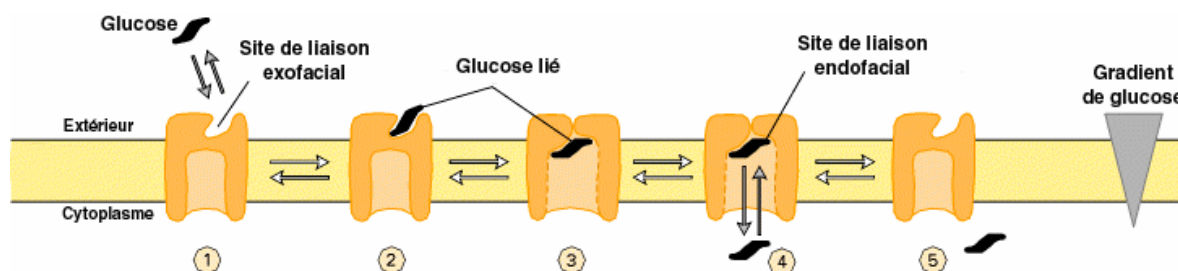
Le sucre est la principale source d'énergie et son entrée dans les cellules est vitale. La taille et les propriétés hydrophiles du glucose lui ont nécessité un système de transport à travers la membrane cellulaire hydrophobique. Chez les mammifères, on connaît 11 protéines qui facilitent le transport du glucose à travers les membranes cellulaires, selon le gradient et sans dépense d'énergie. Ensemble, ils forment la famille des GLUTs (*glucose transporter*), qu'on peut diviser en trois classes (I – III) selon des structures caractéristiques conservées. Basé sur ces critères s'ajoute à la famille un transporteur de fructose (GLUT5) et un transporteur de myoinositol (HMIT1)<sup>267</sup> (voir figure 6A).

La diversité de la famille des GLUTs est importante pour répondre aux besoins spécifiques des différents tissus. Néanmoins, les GLUTs ont tous environ la même taille ( $\approx 500$  acides aminés), une homologie de séquence appréciable (28% à 65%, surtout aux domaines transmembranaires<sup>268</sup>) et partagent la même topologie générale. Ils se présentent comme une protéine à douze domaines transmembranaires aux extrémités N- et C-terminales intracellulaires (voir figure 6B). Entre le sixième et septième domaine transmembranaire, on retrouve une grande boucle hydrophile intracellulaire. Chez les membres des classes I et II, il y a un site de glycosylation dans la première boucle extracellulaire qui augmente, à tout le moins, le transport par GLUT1<sup>269</sup>. Pour les membres de classe III, cette boucle et son site de glycosylation, se retrouve entre le neuvième et dixième domaine transmembranaire<sup>270</sup>.



**Figure 6.** Les transporteurs de glucose. (A) Dendrogramme des membres de la famille élargie des GLUTs. La longueur des branches reflète le degré de différence entre les séquences. Tiré de Joost *et al.* 2002 <sup>267</sup>. (B) Représentation schématique de la topologie de GLUT4. Les motifs de positionnement en N- et C-terminal sont indiqués. Voir le texte pour plus de détails. Tiré de Watson *et al.* 2004 <sup>271</sup>

Le transfert des molécules de glucose se fait par un changement de conformation du transporteur, exposant de façon alternative deux sites de liaison au glucose. Un premier site fait face à l'extérieur de la cellule (exofacial), et un second site fait plutôt face à l'intérieur de la cellule (endofacial). Lorsque le glucose se lie au site exofacial, le transporteur change subitement de conformation... le glucose est ballotté sur le site de liaison endofacial, la porte grande ouverte sur le cytoplasme (voir figure 7). Des analyses par mutagenèse dirigée de ces sites de liaison ont permis d'identifier des résidus des domaines transmembranaires qui composent distinctement les sites exofacials et endofacials. En effet, la mutation des glutamines 161 et 282, de la tryptophane 412 ou de la proline 345 inhibe complètement la liaison de l'extérieur alors que la mutation de la tyrosine 293 empêche la liaison de l'intérieur<sup>272-276</sup>. La queue C-terminale est aussi importante puisque sa délétion bloque le transporteur en conformation « face vers l'intérieur », empêchant donc le transport<sup>277</sup>.



**Figure 7.** Représentation schématique du transport du glucose facilité. Lorsque la concentration de glucose est plus grande à l'extérieur de la cellule que dans le cytoplasme, le transport net du glucose va de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (1 → 5). Dans le cas inverse, le glucose sort de la cellule selon le même mécanisme (4 → 1). Tiré et adapté de Lodish *et al.* 2000 <sup>278</sup>

GLUT1 a été isolé pour la première fois des érythrocytes<sup>279</sup>, où il représente près de 5% des protéines membranaires. En concert avec d'autres GLUTs, il sert essentiellement au transport basal dans les tissus périphériques<sup>280</sup>. Au cerveau et dans les neurones, c'est principalement avec le transporteur à haute affinité pour le glucose, GLUT3, qu'il fait équipe<sup>281</sup>. Cette affinité assure un transport maximal particulièrement important pour le cerveau qui a le glucose pour seule source d'énergie. GLUT2 a la plus faible affinité pour le glucose de tous ses collègues de classe I<sup>282</sup>. Le transport du glucose qu'il assure est proportionnel à la glycémie : Après un repas, le transport du glucose augmente dans les cellules du foie et du pancréas (voir tableau 2), et diminue entre les repas. Dans les hépatocytes, lorsque la concentration intracellulaire de glucose provenant de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse renverse le gradient à l'égard de la glycémie, GLUT2 transporte du glucose du foie vers la circulation. GLUT2 est aussi un transporteur de fructose de faible affinité<sup>282,283</sup>, ce qui est cohérent avec le fait que le foie soit le site principal du métabolisme du fructose. Finalement, GLUT4, qui est discuté plus en détail dans les sections ultérieures, a pour principal mandat de moduler le transport du glucose en réponse aux stimuli insuliniques. En ce sens, on le retrouve essentiellement dans les muscles squelettiques et cardiaque et les tissus adipeux blanc et brun (voir tableau 2). Les rôles et fonctions des membres de la classe II restent encore mal expliqués, et ceux de la classe III ne sont tout simplement pas bien caractérisés<sup>270</sup>.

### 3.1. Régulation de l'expression de GLUT4

Bien sûr, l'abondance de GLUT4 influence grandement le transport du glucose. En ce sens, le contrôle de son expression peut être considéré comme un mécanisme important de la régulation de l'homéostasie du glucose. L'insuline et le glucose sont eux-mêmes des régulateurs de l'expression de GLUT4, mais également les fonctions contractiles très énergivores du muscle qui s'assurent d'une bonne entrée de glucose en modulant l'expression du transporteur.

	Principaux sites d'expression	Fonction
<b>GLUT1</b>	<u>la plupart des tissus</u> ; (++) érythrocyte; (++) cerveau (endothélium); (+) muscle; (+) tissu adipeux	Transport basal
<b>GLUT2</b>	foie; îlots de Langerhans	Transport basal; « glucosenseur »
<b>GLUT3</b>	cerveau	Transport basal
<b>GLUT4</b>	muscle squelettique et cardiaque; tissu adipeux blanc et brun	Transport en réponse à l'insuline

**Tableau 3.** Biodistribution et fonction des GLUTs de la classe I. Tiré et adapté de Joost *et al.* 2002 <sup>267</sup>

En culture, l'incubation prolongée (18-24h) de cellules musculaires<sup>284</sup> avec de l'insuline diminue leur contenu en GLUT4, mais en augmente la quantité à la membrane plasmique et favorise l'expression de GLUT1. Cette diminution de GLUT4 a aussi été observée dans les adipocytes<sup>222</sup>. *In vivo*, la quantité de GLUT4 tend plutôt à diminuer dans le tissu adipeux et les muscles glycolytiques lorsque l'insulinémie est maintenue basse par une période de jeûne ou un traitement à la STZ<sup>285</sup>. La normalisation de la glycémie par une infusion physiologique d'insuline, mais pas par une infusion de phlorizin (excrétion rénale de glucose), a permis de récupérer de la diminution du transporteur dans le tissu adipeux<sup>286</sup>, suggérant que c'est bien l'insulinopénie, et non l'hyperglycémie qui est responsable des effets observés. Par contre, l'utilisation de la phlorizin a mené à une conclusion

inverse dans le muscle squelettique<sup>287</sup>. En accord avec ces deux études, Klip *et al.* ont conclu par une large revue de la littérature que l'hyperglycémie diminue l'expression de GLUT4 dans le muscle squelettique, mais pas dans le tissu adipeux<sup>288</sup>. Il n'y a pas d'élément sensible au glucose connu sur le gène de GLUT4, ni de GLUT1. Par contre, la génération de souris transgéniques exprimant un gène rapporteur sous la gouverne de différents fragments du promoteur de GLUT4 a permis de bien identifier une région sensible à l'insuline<sup>289</sup>.

Dans un second ordre d'idée, l'innervation musculaire durant le développement fœtal coïncide avec une augmentation de l'expression de GLUT4<sup>290</sup>. À l'inverse, la dénervation chirurgicale d'un muscle réduira son contenu en GLUT4<sup>290-292</sup>. On sait que la stimulation électrique de la contraction augmente l'expression de GLUT4<sup>293-295</sup>. De plus, il est reconnu que l'activité physique augmente d'elle-même le transport du glucose. La contraction musculaire augmente le transport du glucose en empruntant une voie de signalisation distincte de celle empruntée par l'insuline : la voie MAP kinase<sup>22</sup>. L'utilisation d'un agoniste de l'AMPK a permis de démontrer que l'activation de cette voie stimule la translocation<sup>296</sup> mais aussi l'expression de GLUT4<sup>297,298</sup>. Une bonne discipline d'entraînement assurera donc une bonne expression de GLUT4 pour subvenir aux besoins énergétiques du muscle d'un athlète<sup>299,300</sup>. Une seule session de natation prolongée a été suffisante pour augmenter du double l'ARNm du transporteur chez le rat<sup>301</sup>, de quoi encourager les nouveaux abonnés du gym.

La surexpression de GLUT4 dans le muscle squelettique et le tissu adipeux de souris résulte d'une part, en une augmentation de l'adiposité, mais d'autre part, en une meilleure tolérance au glucose et en une meilleure utilisation du glucose stimulé par l'insuline<sup>302-307</sup>. La surexpression de GLUT4 spécifiquement dans le tissu adipeux augmente aussi l'adiposité et la sensibilité à l'insuline<sup>308</sup>. La surexpression de GLUT4 ciblée aux muscles a aussi permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline<sup>309</sup>, sans induire d'obésité. Un clamp hyperinsulinémique/ euglycémique a dévoilé une augmentation de l'utilisation du glucose stimulée par l'insuline de 2,5 fois. Il est donc évident que l'expression de GLUT4 est suffisante pour moduler l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose.

## 3.2. La translocation de GLUT4

Avant même d'avoir identifié et cloné GLUT4, on savait que l'insuline provoquait la redistribution intracellulaire d'un « système » de transport du glucose<sup>310,311</sup>. En 1989, cinq groupes de recherche indépendants rapportent le clonage de l'ADN complémentaire de GLUT4<sup>312-316</sup>. GLUT4 se démarque des autres GLUTs par cette particularité qu'il a d'être hautement gouverné par l'insuline. Fortement et spécifiquement exprimé dans le muscle et le tissu adipeux, il en fait les deux plus grands consommateurs de glucose post-prandial, au moment où l'insulinémie est en hausse. L'insuline réussit à augmenter le transport du glucose dans les cellules qui contiennent GLUT4 en augmentant l'activité intrinsèque de ce transporteur (discuté à la section 3.3), mais surtout par l'entremise de cette redistribution cellulaire vers la surface membranaire qu'on appelle la translocation. Contrairement à GLUT1 (65% d'homologie), GLUT4 est essentiellement intracellulaire à l'état basal, dissimulé dans des compartiments intracellulaires en attente du signal insulinique. Ce n'est qu'une fois à la membrane qu'il peut aider le glucose à la traverser.

L'extrémité N-terminale de GLUT4 contient un motif, FQQI (voir figure 6B), qui promeut son internalisation<sup>317,318</sup>. La greffe de ce motif à GLUT1 cause sa relocalisation vers un compartiment intracellulaire<sup>319</sup>. FQQI est aussi utile pour diriger GLUT4 dans les bons compartiments lors de sa réinternalisation, une fois sa tâche accomplie<sup>320,321</sup>. Un motif dileucine (LL) à l'extrémité C-terminale a aussi un rôle à jouer dans l'internalisation du transporteur<sup>322,323</sup>. Ce motif serait aussi utile pour faire sortir de l'appareil de Golgi les GLUT4 nouvellement synthétisés ou internalisés<sup>320,324</sup>. Des études ont montré que le motif acide TELEYLGP, est aussi essentiel à ce processus<sup>325,326</sup>.

En condition basale, GLUT4 est donc majoritairement intracellulaire, mais circule tout de même lentement entre les membranes internes (endosomes et appareil de Golgi) et la membrane cellulaire. Il se retrouve aussi dans un compartiment plus statique, les vésicules d'entreposage de GLUT4, qui peuvent tranquillement se mêler aux endosomes, ou aller directement à la membrane cellulaire lorsque l'insuline en fait sentir le besoin. La stimulation par l'insuline, via les voies de signalisation PI3K et TC10, produit donc une augmentation de l'exocytose<sup>327</sup> de GLUT4 renchérit d'une réduction de son endocytose<sup>328-331</sup>, pour une augmentation nette de la quantité de transporteur à la membrane cellulaire de deux à huit fois dans muscle squelettique<sup>332</sup>. Dans ce tissu, l'augmentation du nombre

de ces transporteurs qui ont alors accès à l'environnement extracellulaire est beaucoup plus marquée au niveau des tubules transverseaux (t-tubules)<sup>333</sup>.

Les t-tubules sont des invaginations d'environ 30 x 100 nm à la surface cellulaire<sup>334</sup>. Ils sont importants pour maximiser la propagation des signaux électriques jusqu'à l'intérieur de la fibre musculaire appelée à contracter<sup>335</sup>. On leur connaît aussi un rôle dans l'action de l'insuline. En effet, il a clairement été démontré que l'insuline<sup>333,336</sup>, tout comme l'exercice<sup>337</sup>, augmente le transport du glucose en favorisant la translocation de GLUT4 plus particulièrement vers ces structures. Le démantèlement des t-tubules a permis de confirmer l'importance de cette structure dans l'action de l'insuline puisqu'il en a résulté une complète abolition du transport du glucose dans le muscle isolé<sup>338</sup>. Dans un modèle de diabète de type 2 précoce (régime riche en gras et en sucrose), la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique est diminuée, mais aussi vers les t-tubules<sup>339</sup>. Aussi, c'est la translocation de GLUT4 spécifiquement vers cette structure qui est affectée dans les rats diabétiques, traité avec de la streptozotocine (STZ), un agent qui détruit les cellules  $\beta$  pancréatiques<sup>340</sup>. Plus récemment, l'imagerie confocale a permis de visualiser et confirmer ce qu'on savait déjà<sup>341</sup>. On pense que ces invaginations serviraient à initier la signalisation de l'insuline plus profondément dans la cellule, et ainsi mieux rejoindre les effecteurs à travers l'épais empilement de protéines contractiles. De plus, la surface cellulaire s'en trouve augmentée de plus du double, ce qui d'une part, multiplie les possibilités de liaison de l'insuline à son récepteur, et d'autre part, augmente l'espace pour le transport du glucose à travers la membrane.

### 3.2.1. Fusion des membranes

La translocation des vésicules enrichies en GLUT4 vers la membrane plasmique n'est efficace pour augmenter le transport du glucose que si elles s'attachent, s'amarrent et fusionnent avec cette membrane. Les protéines qui permettent l'interaction entre les membranes en jeu sont appelées les SNAREs (*SNAP receptors*). On place d'un côté les t-SNARES (présents sur la membrane cellulaire (*target*)), membres de la famille des syntaxines, et de l'autre, les v-SNARES (pour *v*ésicules), membres de la famille des VAMPs. Les cellules expriment un grand nombre de SNAREs. Le pairage entre ceux-ci<sup>342,343</sup>, leur distribution intracellulaire<sup>344,345</sup> et la collaboration de quelques partenaires<sup>346,347</sup> sont essentiels à la spécificité de ce type d'interaction membranaire. Dans le cas



de la translocation des vésicules enrichies en GLUT4 stimulée par l'insuline, la syntaxine-4 est le seul t-SNARE impliqué et VAMP2 (synaptobrevin 2) est le principal v-SNARE. SNAP23 (SNAP25 dans les adipocytes)<sup>348</sup>, Munc18c<sup>349-351</sup> et Synip<sup>352</sup> y sont des partenaires. (voir pour <sup>353</sup> une revue)

### 3.3. L'activité intrinsèque

Il est relativement fréquent de voir dans la littérature des exemples où l'augmentation du transport du glucose diffère de l'augmentation de la quantité de GLUT4 à la membrane cellulaire (revue dans <sup>332</sup>). L'utilisation des myocytes L6-GLUT4myc<sup>354-356</sup> a permis d'observer un décalage entre la translocation (temps  $\frac{1}{2}$  = 2,5 min) et le transport du glucose (temps  $\frac{1}{2}$  = 6min), suggérant que la translocation n'est pas le seul mécanisme nécessaire à l'augmentation du transport du glucose. De plus, la translocation et le transport du glucose se distinguent aussi quant à leur sensibilité à la wortmannin, un inhibiteur de la PI3K (IC<sub>50</sub> de 3 et 43 nM, respectivement)<sup>357</sup>. Pour expliquer ces discordances, plusieurs études soutiennent que l'insuline a aussi la capacité d'augmenter l'activité intrinsèque de GLUT4.

L'insuline induit la phosphorylation et l'activation de la p38 MAPK. L'expression d'un mutant inactif ou l'inhibition de cette kinase avec des inhibiteurs spécifiques inhibent à plus de 60% le transport du glucose, sans toutefois affecter la translocation<sup>358-360</sup>. Ces résultats supportent donc l'idée d'une régulation de l'activité intrinsèque du transporteur, où p38 MAPK aurait un rôle crucial. Cependant, le mécanisme par lequel p38 MAPK régule l'activité de GLUT4 n'est pas encore connu. D'abord, on sait que p38 MAPK serait elle-même recrutée à la membrane cellulaire<sup>361</sup>. Aussi, la phosphorylation de GLUT4 sur le résidu sérine 488 semble corrélée avec une diminution de son activité<sup>362</sup>, mais la preuve que cette phosphorylation affecte vraiment son activité intrinsèque reste à faire, tout comme l'identification des partenaires de p38 MAPK qui contrôlerait cette phosphorylation. (revue dans <sup>332</sup>).

### 3.4. Invalidation génétique de GLUT4

Les souris invalidées pour GLUT4 sont environ 20% plus petites que leurs semblables, elles ont une espérance de vie raccourcie, une forte réduction de la masse adipeuse et un coeur plus gros exprimant davantage de GLUT1<sup>363</sup>. De façon surprenante, elles ont une glycémie normale, et elles

répondent normalement au test de tolérance au glucose. On observe tout de même une augmentation de l'insulinémie postprandiale, et une certaine résistance à l'insuline décelée par un test de tolérance à l'insuline. On pense que la compensation par d'autres GLUTs ou une captation plus grande du glucose par le foie expliquerait ce phénotype plus modéré qu'on l'aurait prédit<sup>363-365</sup>. Ce qui reste plus difficile à expliquer, c'est que les souris hétérozygotes semblent plus mal en point<sup>366</sup>. En effet, elles sont hyperinsulinémiques, hyperglycémiques et montrent des symptômes histopathologiques d'un diabète de type 2 au coeur et au foie. La restauration de GLUT4 uniquement dans le muscle<sup>367</sup> suffit à rééquilibrer le métabolisme du glucose, ce qui appuie bien l'importance de ce tissu dans le développement de la résistance à l'insuline<sup>368</sup>.

Les souris invalidées pour GLUT4 spécifiquement dans le muscle squelettique et cardiaque<sup>365</sup> montrent aussi une augmentation de GLUT1 dans un coeur plus gros. Par contre, contrairement aux souris complètement invalidées, le poids n'est pas affecté, ni la masse adipeuse et les souris ont une espérance de vie normale. Elles sont hyperglycémiques et intolérantes au glucose tandis que certaines développent le diabète. Le transport du glucose stimulé par l'insuline est sévèrement réduit dans le muscle, mais aussi dans le tissu adipeux. La suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline est aussi affectée<sup>369</sup>. Ces effets surprenant sur le tissu adipeux et le foie semblent résulter de l'hyperglycémie puisque l'augmentation de l'excrétion de glucose par les reins avec de la phloridzine rétablit l'action de l'insuline dans ces tissus. Les souris invalidées pour GLUT4 dans le muscle cardiaque uniquement montrent aussi cette hypertrophie cardiaque et l'augmentation de son contenu en GLUT1, mais ne développent aucune trouble métabolique<sup>370</sup>.

Enfin, l'invalidation de GLUT4 limitée aux tissus adipeux, blanc et brun<sup>105</sup>, n'affecte ni la masse adipeuse, ni la taille du coeur. Par contre, même si le tissu adipeux représente normalement moins de 10% du transport du glucose de tout l'organisme<sup>2</sup>, ces souris sont résistantes à l'insuline, intolérantes au glucose et certaines développent le diabète. Un clamp hyperinsulinémique/euglycémique a montré une réduction de 50% du transport du glucose total. *In vivo*, le transport du glucose dans le tissu adipeux est atténué, tout comme dans le muscle squelettique, ainsi que la suppression de la production hépatique de glucose. Cependant, dans le muscle *ex vivo*, les niveaux de transport du glucose redeviennent normaux, suggérant que l'inhibition du transport du glucose dans le muscle est secondaire à l'environnement « *in vivo* ». Pourtant, les facteurs habituellement

sécrétés par le tissu adipeux pouvant affecter la résistance à l'insuline, *i.e.* les acides gras libres, la leptine, le TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), la résistine et l'adiponectine<sup>371,372</sup>, ont des niveaux sanguins tout à fait normaux. De plus, aucun dépôt inhabituel de gras dans le muscle ni le foie n'a été observé.

## **4. Désensibilisation de la voie de signalisation insulinique**

L'activation de la cascade signalétique de l'insuline doit être négativement contrôlée pour limiter l'amplitude de l'action de l'hormone, et pour éventuellement y mettre fin. L'internalisation du récepteur de l'insuline et la dégradation de l'insuline forme un premier mécanisme (voir section 2.1.3). Différents effecteurs de la cascade sont ciblés par des mécanismes de contrôle et de rétroaction négative. En présence comme en absence d'insuline, c'est l'équilibre entre l'activation et l'inactivation de la cascade qui organise la réponse cellulaire.

### **4.1. Résistance à l'insuline et diabète sucré**

La perte de contrôle de ces mécanismes d'atténuation progresse la plupart du temps vers la résistance à l'insuline. Au point de vue cellulaire, cela se traduit par une cascade de signalisation induite par l'insuline de plus faible intensité, et donc une réponse cellulaire déficiente. Cliniquement, cela implique qu'une plus grande quantité d'insuline doit rejoindre les tissus pour subvenir au maintien d'une glycémie normale. Sans traitement ou changement d'habitude de vie, la résistance à l'insuline évolue généralement vers le diabète de type 2.

Il existe quatre principaux types de diabètes : le diabète de type 1, le diabète de type 2, le « Maturity Onset Diabetes of the Young » (MODY) et le diabète gestationnel. Puisque les travaux présentés dans cette thèse se réfèrent plus particulièrement à la résistance à l'insuline, l'emphase sera portée sur le diabète de type 2 qui est d'une certaine façon l'évolution pathologique de cette résistance.

#### 4.1.1. Physiopathologie du diabète de type 2

Lorsque la résistance à l'insuline s'installe, le métabolisme du glucose est fortement perturbé. Comme on le sait, le muscle capte près de 80% du glucose sanguin post-prandial. Lors de résistance à l'insuline, des défauts de signalisation mènent à une réduction marquée du transport du glucose dans ce tissu<sup>373</sup> qui s'explique par une diminution de la translocation de GLUT4<sup>374,375</sup>. Certaines études montrent aussi une diminution de l'expression de ce transporteur<sup>375,376</sup>, mais d'autres pas<sup>375,377</sup>. Les fonctions hépatiques sont aussi altérées. Par exemple, l'augmentation de la glycémie à jeun de patients diabétiques corrèle très bien avec une production hépatique de glucose exagérée<sup>373,378</sup>. La gluconéogenèse est responsable en grande partie de cette augmentation<sup>379,380</sup>, mais la glycogénolyse y contribue aussi<sup>379</sup>.

La résistance à l'insuline implique alors l'apparition d'une hyperinsulinémie compensatoire. Toutefois, ce stade préclinique ne suffit pas au développement de la maladie. Il a été démontré qu'en plus d'une action réduite de l'insuline, une sécrétion insuffisante est requise à la progression du diabète<sup>381-383</sup>. Au début, les processus adaptatifs  $\beta$ -pancréatiques sont tant quantitatifs que qualitatifs. La masse cellulaire augmente et on observe une augmentation de la capacité sécrétoire d'une même population de cellules  $\beta$ <sup>384</sup>. L'hyperglycémie marque l'apparition des premiers signes de dysfonction des cellules  $\beta$ . Dès ce stade, on commence à pouvoir observer une perte de différenciation des cellules  $\beta$ <sup>385</sup>. Lorsque les glycémies entament clairement l'éventail de celle du diabète (glycémie à jeun  $\geq 7$  mmol/L<sup>386</sup>), les cellules  $\beta$  sont vraisemblablement en sévère décompensation. Les cellules répondent de moins en moins aux stimuli les incitant à sécréter de l'insuline. Ce stade peut persévérer pendant quelque temps, alors que les cellules  $\beta$  sécrètent une quantité acceptable d'insuline qui permet, tout au moins, d'éviter les troubles majeurs que pourrait causer l'hyperglycémie plus sévère. Finalement, des dommages tissulaires apparaissent, avec une perte de fonction cellulaire et une diminution de la masse  $\beta$ -pancréatique<sup>387</sup>.

Le diabète de type 2 est donc une maladie progressive causée par une demande en insuline supérieure à la capacité de production et de sécrétion des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Présentement,

les thérapies sont basées sur un changement du style de vie (alimentation, exercice, etc) et l'utilisation d'une variété de composés pharmacologiques ayant pour effet d'augmenter la sécrétion d'insuline, de réduire la production hépatique de glucose et d'augmenter la sensibilité à l'insuline. Toutefois, lorsque la pathologie est bien installée, les patients ont recours, tels les diabétique de type 1, à une source exogène d'insuline<sup>385</sup>.

L'obésité est le plus important facteur de risque pour le diabète de type 2. L'apparition de la résistance à l'insuline chez des patients obèses s'explique souvent par un dérèglement des mécanismes de contrôle de la signalisation de l'insuline. Les protéines impliquées pourraient alors devenir de nouvelles cibles thérapeutiques. L'identification et la compréhension de ces mécanismes de régulation sont donc tout aussi primordiales que de se familiariser avec la signalisation elle-même.

## 4.2. Déficit de signalisation dans l'obésité

Les défauts de signalisation peuvent tout d'abord résider au niveau du récepteur de l'insuline lui-même. Une diminution du nombre de récepteurs de l'insuline a été observée dans des adipocytes isolés de sujets obèses<sup>388</sup>. Par contre, ce défaut n'a pu être remarqué dans le muscle, ni le foie<sup>389</sup>, et la diminution de la liaison de l'insuline à son récepteur ne semble pas corrélée avec l'apparition du diabète<sup>390,391</sup>. D'un autre côté, on a observé une diminution de l'activité kinase stimulée par l'insuline (et de l'autophosphorylation du récepteur)<sup>392,393</sup> qui peut même être récupérée par une perte de poids corporel<sup>394</sup>. Aussi, un défaut d'internalisation du récepteur à la suite de la liaison de l'insuline est plus souvent associé à l'obésité et au diabète<sup>70,388</sup>.

Les défauts au niveau du récepteur sont parfois modestes, mais parfois absents. Des mécanismes en aval du récepteur semblent donc mieux expliquer l'apparition de la résistance à l'insuline. L'augmentation de l'expression de la sous-unité p85 $\alpha$  peut expliquer certains cas de résistance à l'insuline<sup>395-397</sup>, dont celle reliée à l'obésité<sup>398</sup>. L'augmentation de p85 $\alpha$  viendrait alors interférer entre le complexe p85/p110 et ses effecteurs, de manière à inhiber la voie de signalisation<sup>399</sup>. Cependant, la régulation d'IRS-1 est assurément le mécanisme le plus étudié. On sait que sa phosphorylation

sur tyrosine est réduite dans les sujets diabétiques et que l'insuline stimule moins efficacement son association avec la PI3K. La diminution de l'utilisation du glucose *in vivo* corrèle très bien avec cette signalisation défectueuse<sup>400</sup>. Bien sûr, la réduction de l'activité du récepteur peut expliquer une partie de la déficience, mais la phosphorylation de IRS-1 sur ses résidus sérine marque un mécanisme plus considérable<sup>399</sup>.

#### 4.2.1. Sérine phosphorylation d'IRS-1

La principale fonction de tissu adipeux est d'entreposer précieusement l'énergie sous forme de triglycérides. Aujourd'hui, l'abondance de nourriture nous laisse parfois pencher vers la surconsommation. L'énergie excédentaire ingérée est tout de même préservée, menant à une augmentation de l'adiposité et à l'obésité. Une augmentation du niveau d'acide gras libre sanguin est une des conséquences néfastes de l'obésité sur la sensibilité à l'insuline. Maintenant, on sait que le tissu adipeux est un organe beaucoup plus complexe qu'un simple entrepôt. Le tissu adipeux sécrète plusieurs facteurs, comme par exemple la leptine, l'adiponectine et des cytokines proinflammatoires<sup>401</sup>. Dans l'obésité, l'augmentation de la concentration sanguine de TNF- $\alpha$ <sup>402</sup> est une seconde cause importante de l'apparition de la résistance à l'insuline.

Par des mécanismes différents, les acides gras libres, TNF- $\alpha$  et d'autres facteurs vont interférer avec la voie de signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérines. La majorité des phosphorylations d'IRS-1 sur des résidus sérine forment un mécanisme de rétroaction négative essentielle au bon fonctionnement cellulaire (la phosphorylation par Akt étant par contre positive<sup>403</sup>). La phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine limite la propagation du signal de diverses façons. Selon le résidu sérine impliqué, la phosphorylation provoque un changement de conformation, un encombrement allostérique ou une relocalisation subcellulaire d'IRS-1 qui résulte en une diminution de sa phosphorylation par le récepteur de l'insuline, en un recrutement déficient de la PI3K ou en une augmentation de sa dégradation, respectivement (revue dans <sup>404</sup> et <sup>405</sup>). Il est donc évident qu'une phosphorylation incontrôlée mènera à la résistance à l'insuline.

#### 4.2.1.1. Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par les acides gras

L'augmentation de la masse de tissus adipeux pendant l'obésité occasionne une augmentation d'acides gras libres dans le sang. L'infusion d'une émulsion de lipides et d'héparine cause en soi une résistance à l'insuline. En 1963, Randle proposait que la résistance à l'insuline induite par ces acides gras était le résultat d'une utilisation préférentielle de ces lipides comme source d'énergie au détriment de celle du glucose<sup>406,407</sup>. Aujourd'hui, des mécanismes bien précis ont été décrits.

D'abord, il a été démontré que la résistance à l'insuline provoquée par les acides gras libres est associée à une augmentation de l'activité de la PKC- $\theta$ <sup>408</sup>. Ensuite, il a été proposé que PKC- $\theta$  augmente la phosphorylation d'IRS-1 sur ses sérines 307 et 1101 pour réduire son activation. Les souris invalidées pour PKC- $\theta$  sont protégées contre les défauts de signalisation et de transport du glucose induit par une infusion de lipides<sup>409</sup>. C'est JNK et IKK (*inhibitor kappaB kinase*) qui seraient à l'origine de la phosphorylation d'IRS-1 en réponse à l'activation de PKC- $\theta$ <sup>410</sup>. Le salicylate, un inhibiteur d'IKK, bloque les effets négatifs d'une infusion de lipides sur la signalisation de l'insuline. Des souris hétérozygotes invalidées pour IKK sont aussi protégées contre ces effets<sup>411</sup>. Par contre, l'invalidation spécifiquement dans le muscle squelettique n'a pas empêché la phosphorylation d'IRS-1 sur sérine<sup>412</sup>. Enfin, comme discuté plus haut, l'invalidation de JNK protège contre la résistance à l'insuline induite par l'obésité<sup>413</sup>. (voir <sup>414</sup> pour une revue sur la phosphorylation de IRS-1)

#### 4.2.1.2. Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par le TNF- $\alpha$

Plusieurs études montrent que le TNF- $\alpha$  inhibe la signalisation via IRS-1 en augmentant sa phosphorylation sur son résidu sérine 307 (correspondant à la sérine 312 chez l'humain)<sup>415-417</sup>. Lorsque des souris invalidées pour le gène codant pour le TNF- $\alpha$  sont nourries avec un régime riche en gras, elles deviennent obèses, mais ne développent pas de résistance à l'insuline<sup>418</sup>.

Il a été démontré que JNK semble être la kinase sollicitée par le TNF- $\alpha$ <sup>417</sup>. Un régime riche en gras induit l'augmentation de la phosphorylation sur sérine 307 d'IRS-1, mais reste sans effet lorsque les souris sont invalidées pour JNK. L'invalidation de JNK dans un modèle de souris génétiquement obèse (*ob/ob*) améliore aussi l'insulinémie et la glycémie<sup>413</sup>. JIP1 (*JNK-interacting protein 1*) est un

partenaire important de JNK. Chez la souris, son invalidation occasionne une diminution de la phosphorylation du résidu sérine 307 corrélée avec une augmentation de la signalisation via IRS-1<sup>419</sup>. Aussi, la résistance à l'insuline induite par un régime riche en gras est beaucoup moins marquée dans ces souris.

Le TNF- $\alpha$  induit aussi la phosphorylation du résidu sérine 632. Cette phosphorylation est inhibée par la rapamycine, ce qui indique que mTOR est probablement la kinase impliquée<sup>420</sup>. Comme cette sérine est située très près du site de liaison à la PI3K (voir figure 3), on peut donc penser qu'elle interfère avec le recrutement de ce dernier.

#### **4.2.1.3. Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par mTOR**

Un régime riche en gras, utilisé pour induire l'obésité et le diabète, augmente de façon significative l'activité de S6K1 et la phosphorylation sur sérine d'IRS-1<sup>223</sup>. Deux modèles de souris génétiquement obèses (*K/K A $\nu$*  et *ob/ob*) montrent aussi cette augmentation de l'activité S6K1<sup>421</sup>. De plus, les souris invalidées pour S6K1 sont protégées contre cette résistance à l'insuline induite par la diète<sup>421</sup>. Ces résultats suggèrent donc que mTOR/S6K1 est impliqué dans le développement de la résistance à l'insuline.

#### **4.2.1.4. Sérine phosphorylation d'IRS-1 induite par d'autres médiateurs**

L'insuline stimule aussi la phosphorylation sur le résidu sérine 318 d'IRS-1 par la PKC- $\zeta$ <sup>422,423</sup>. Cette phosphorylation bloque l'interaction de IRS-1 avec le récepteur de l'insuline, diminuant ainsi son activation<sup>424</sup>. Il a été proposé que cette boucle de rétroaction négative soit à l'origine de la désensibilisation à l'insuline lors d'expositions prolongées, ou d'hyperinsulinémie<sup>424</sup>.

Un stress hyperosmotique mime les effets de l'insuline, comme l'augmentation de la translocation de GLUT4, mais peut aussi venir contrer ses effets (voir <sup>425</sup> pour une revue). Dans les adipocytes 3T3-L1, le stress hyperosmotique inhibe les fonctions d'IRS-1 par une phosphorylation sur sa sérine 307. Un traitement à la rapamycine permet d'éviter cette inhibition, suggérant que mTOR soit la kinase qu'on doit accuser<sup>426</sup>.



Dans le muscle et le tissu adipeux isolés de patients atteints de diabète de type 2, on a pu remarquer une activité sérine/thréonine kinase anormalement élevée de ERK<sup>427</sup> et p38 MAPK<sup>428</sup>. Il a été démontré que dans les adipocytes 3T3-L1, l'activation de ces deux kinases induit la résistance à l'insuline et interfère avec les fonctions d'IRS-1<sup>429</sup>.

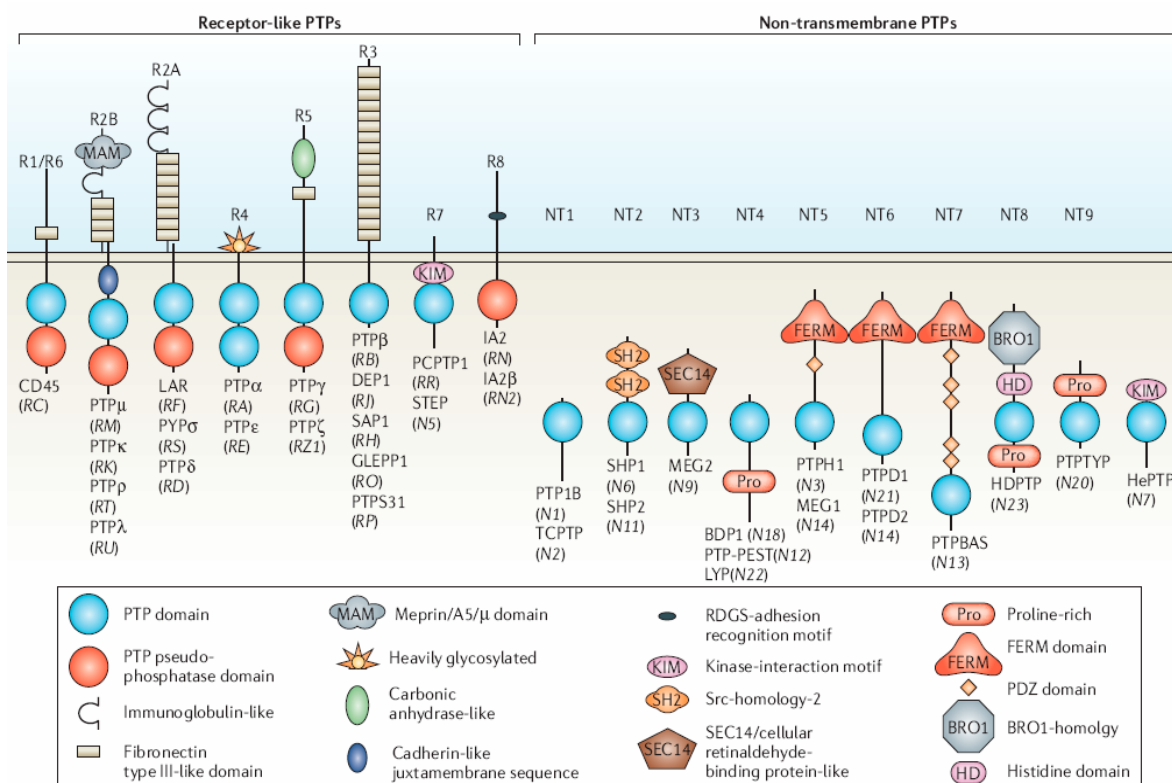
#### 4.2.2. Les Protéine Tyrosine Phosphatases

Il a été démontré que l'activité des protéines tyrosine phosphatases (PTPs), qui contrebalance l'activité des kinases (e.g. le récepteur de l'insuline), est parfois augmentée dans l'obésité<sup>430-434</sup>, ce qui représente un autre mécanisme important menant à la résistance à l'insuline.

On estime qu'un tiers des protéines cellulaires sont phosphorylées, la majorité sur des résidus sérine/thréonine, et de 0,01 à 0,05% sur des résidus tyrosine<sup>435</sup>. Malgré ces faibles pourcentages, la phosphorylation sur tyrosine est un important mécanisme de signalisation dans plusieurs fonctions cellulaires, incluant bien sûr le métabolisme du glucose. Depuis les vingt dernières années, beaucoup d'avancements ont été réalisés quant à la description et la compréhension des protéines tyrosine kinases (PTKs), les médiateurs de ces phosphorylations. Cependant, le niveau de phosphorylation est également déterminé par les PTPs, qui retirent le groupement phosphate ajouté par les PTKs. On reconnaît depuis longtemps leur importance dans la terminaison des signaux cellulaires, mais ce n'est que plus récemment qu'on a vraiment apprécié leur contribution dans l'initiation et la persistance de ces signaux. C'est effectivement l'équilibre entre l'activité des PTKs et des PTPs qui dicte l'état de phosphorylation sur les résidus tyrosine et les réponses cellulaires qui s'y rattachent.

Le domaine PTP très conservé d'environ 280 acides aminés est la marque distinctive des membres de la famille des PTPs qu'on peut diviser en trois groupes : PTPs classiques, PTPs à double spécificité et PTPs de faible poids moléculaire (LMW-PTP: *low molecular weight-PTP*). Je discuterai ici principalement des PTPs classiques, mais les deux autres sont revus en détails dans <sup>436</sup> et <sup>437,438</sup>, respectivement. Jusqu'à maintenant, on connaît 113 PTPs classiques chez les vertébrés, dont 37

chez l'humain. Le séquençage du génome humain a suggéré l'existence de près de 400 PTPs additionnelles, mais leur expression reste encore à être démontrée. L'alignement des séquences des domaines PTP et une analyse phylogénique a permis de les classer dans 17 sous-groupes (voir figure 10, et <http://science.novonordisk.com/ptp> pour plus de détails)<sup>439</sup>. Environ la moitié de ces sous-groupes définissent des PTPs cytoplasmiques (ou non-transmembranaires), et l'autre moitié, des PTPs qu'on dit de type récepteur, puisqu'elles possèdent un domaine extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique.



**Figure 8.** Représentation schématique des PTPs classiques. Les PTPs sont d'abord classées en deux groupes, celles de type récepteur (R1 à R8) et les non-transmembranaires (NT1 à NT9). La subdivision en sous-groupe est basée sur l'homologie des séquences. Les PTPs sont désignées selon le nom couramment utilisé dans la littérature et la désignation du gène est ajoutée entre parenthèse. Tiré de Tonks, 2006 <sup>440</sup>

#### 4.2.2.1. Structure et fonction des PTPs

Au niveau du domaine PTP, la présence d'une boucle structurale forme une pochette de 9 Å de profondeur au centre de laquelle vient s'installer le motif (H/V)**C**(X<sub>5</sub>)**R**(S/T). Des études de cinétiques ont démontré que l'arginine (**R**) joue un rôle important dans la liaison et la stabilisation du complexe PTP-substrat<sup>441</sup>. Quant à elle, la cystéine (**C**) est essentielle à l'activité catalytique. Au pH physiologique, la cystéine n'est pas protonisée et agit comme un nucléophile puisque son environnement (domaine PTP) lui confère un très faible pK<sub>A</sub>. Elle s'attaque au centre du groupement phosphate de son substrat pour former le complexe PTP-cystéine-PO<sub>3</sub>. À la fixation du substrat, une boucle adjacente à la première viendra positionner un résidu aspartate près du site catalytique. En fournissant un proton, cet aspartate permettra le clivage de PO<sub>3</sub>-tyrosine et la libération du substrat déphosphorylé. Par la suite, la libération du phosphate du complexe PTP-cystéine-PO<sub>3</sub> permet de restituer la PTP<sup>442</sup>. La mutation de la cystéine pour une sérine, ou de l'aspartate pour une alanine, permet l'interaction enzyme-substrat, mais empêche la déphosphorylation et donc la dissociation de ceux-ci. L'utilisation de tels mutants, qu'on appelle mutant trappeur, pour stabiliser le complexe PTP-substrat, autrement très transitoire, a grandement contribué à l'identification des substrats des différentes PTPs<sup>443</sup>.

Le faible pK<sub>A</sub> de la cystéine catalytique lui permet d'accomplir ses fonctions, mais la rend aussi susceptible à l'oxydation. Cette oxydation représente un mécanisme d'inhibition de plusieurs PTPs (listées dans <sup>440</sup>), réversible ou non, selon le degré d'oxydation. Une première oxydation du groupement thiol (-SH) de la cystéine vers la forme sulfénique (-SOH) peut être renversée par le bagage enzymatique de la cellule, ou par un agent réducteur *in vitro*<sup>444,445</sup>. Par contre, l'oxydation progressant vers les formes sulfonique (-SO<sub>2</sub>H) et sulfonique (-SO<sub>3</sub>H) devient irréversible<sup>446-448</sup>. En stimulant la production de ROS, l'insuline module donc à son avantage l'activité PTP<sup>449</sup>. Pour expliquer la source et l'impact des ROS en réponse à l'insuline, Nox4 (une NADPH oxydase) a récemment été mis en cause<sup>450</sup>. L'expression d'un mutant agissant comme un dominant négatif, tout comme l'interférence de son ARN, atténue la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et diminue l'action de l'insuline, de l'autophosphorylation du récepteur jusqu'au transport du glucose.

Le domaine catalytique PTP confère une spécificité quant aux substrats. En plus de reconnaître la tyrosine phosphorylée, les acides aminés qui l'entourent permettent l'interaction ou non avec une

protéine phosphorylée. Les autres segments des PTPs contribuent aussi à cette spécificité en dirigeant les PTPs vers des compartiments subcellulaires plus ou moins riches en substrat<sup>451-453</sup>. D'autres domaines vont plutôt faciliter l'interaction avec le substrat ou avec des partenaires pour former un complexe actif. Finalement, la distribution à travers l'organisme est un autre déterminant de la spécificité fonctionnelle. Par exemple, la PTP CD45 déphosphoryle le récepteur de l'insuline *in vitro*<sup>454</sup> et dans un modèle de surexpression<sup>455</sup>, mais elle n'a pas de rôle physiologique lié à l'insuline puisqu'elle n'est exprimée que dans les cellules du système immunitaire.

Étant donné l'abondance de phosphorylations durant la cascade de signalisation de l'insuline, il est facile de croire que certaines PTPs y interviennent. Quelques études suggèrent un rôle pour PTP $\alpha$ <sup>456,457</sup> et PTP $\epsilon$ <sup>451,458,459</sup> dans l'action de l'insuline, cependant, aucun défaut de signalisation n'a été rapporté à la suite de l'inactivation de ces PTPs chez la souris<sup>460-462</sup>. Aussi, depuis que TC-PTP s'est vu interagir avec le récepteur de l'insuline<sup>463</sup>, plusieurs évidences *in vitro* la proposent comme régulatrice de l'action de l'insuline<sup>464-466</sup>, mais la démonstration *in vivo* est toujours manquante. À ce jour, deux PTPs sont bien établies en tant que régulateurs de la signalisation et de l'action de l'insuline. Une multitude d'études *in vitro* appuyées par de surprenants résultats *in vivo* ont permis de clairement démontrer les rôles de LAR (Leukocyte common antigen-related) et PTP-1B dans le métabolisme du glucose. De plus, un membre des LMW-PTPs a récemment rejoint les rangs.

#### 4.2.2.2. LAR

##### 4.2.2.2.1. Structure et fonction

LAR est une PTP de type récepteur qui possède une large portion extracellulaire constituée de trois domaines de type immunoglobuline et de quatre à huit domaines fibronectine de type 2I selon l'épissage. Sa portion intracellulaire comporte essentiellement deux domaines PTP. Le plus près de la membrane (proximal (D1)) possède une forte activité catalytique alors que le plus éloigné de la membrane (distal (D2)), malgré une très forte homologie, possède peu ou pas d'activité. Son rôle serait plutôt dans la régulation du domaine proximal, et peut-être dans le recrutement de substrats ou

de partenaires. Son manque d'activité catalytique lui mérite le nom de domaine PTP pseudo-phosphatase.

En culture cellulaire, plusieurs études montrent que LAR interfère avec la signalisation de l'insuline en déphosphorylant le récepteur de l'insuline<sup>467,468</sup>, ciblant préférentiellement la tyrosine 1150<sup>469</sup>. Le substrat du récepteur de l'insuline IRS-1 semble aussi être déphosphorylé par LAR<sup>470,471</sup>. Tant chez le rongeur que chez l'humain, l'obésité et le diabète sont souvent associés à une augmentation de l'activité PTP dans le muscle squelettique et le tissu adipeux<sup>430-434</sup>. Chez l'homme, il a été démontré que LAR pouvait contribuer majoritairement à cette augmentation<sup>430,431</sup>.

#### 4.2.2.2.2. *Invalidation génétique de LAR*

La caractérisation des souris invalidées pour LAR a apporté des résultats difficiles à interpréter<sup>472</sup>. À jeun, les souris invalidées montrent une insulinémie, une glycémie et une production hépatique de glucose plus faible, ce qui suggère une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Par contre, un clamp euglycémique montre plutôt une diminution de la disposition du glucose et de la suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline comparé aux souris contrôles. Toutefois, LAR est aussi reconnue pour ses importantes fonctions dans le cerveau, où elle participe au développement et au maintien du réseau neuronal. Il est donc possible que le manque de LAR dans ce tissu explique la complexité du phénotype. La génération d'une souris invalidées pour LAR spécifiquement dans les tissus sensibles à l'insuline nous permettrait de clarifier son implication dans le métabolisme.

Par ailleurs, pour expliquer ce phénotype, le groupe de B. Neel s'est demandé s'il était possible qu'en situation saine (ni obésité, ni diabète), LAR ne régule que modestement l'action de l'insuline, tout en étant responsable de la résistance à l'insuline chez des sujets obèses. Donc, pour mimer l'augmentation l'abondance et/ou l'activité de LAR observée chez ces sujets<sup>430-434</sup>, ils ont surexprimé LAR spécifiquement dans le muscle de leurs souris<sup>473</sup>. Cette surexpression a eu pour effet de diminuer le transport du glucose dans le muscle, mais a aussi créé une résistance à l'insuline systémique. Cette étude appuie donc l'hypothèse que LAR contribue au développement de la résistance à l'insuline.

### 4.2.2.3. PTP-1B

#### 4.2.2.3.1. Structure et fonction

PTP-1B est une petite PTP non-transmembranaire de 435 acides aminés largement exprimée à travers l'organisme<sup>474</sup>. Son domaine catalytique est à son extrémité N-terminale, jouxtant deux domaines riches en proline qui permettent l'interaction avec des protéines contenant un domaine SH3. En C-terminal, on retrouve un petit motif hydrophobique qui s'occupe de maintenir PTP-1B au réticulum endoplasmique, fermement attaché aux membranes microsomales, le domaine catalytique orienté vers le cytoplasme<sup>475</sup>. Le clivage de ce motif libère PTP-1B et augmente son activité spécifique, suggérant que sa localisation subcellulaire module l'accessibilité aux substrats<sup>476</sup>.

Le récepteur de l'insuline affecte aussi l'activité de PTP-1B. La phosphorylation des résidus tyrosine 66, 152 et 153 par le récepteur<sup>477</sup> semble augmenter son activité *in vitro*<sup>478</sup>, mais étrangement, semble la diminuer *in vivo*<sup>479</sup>. Ce qui est plus clair, c'est que la phosphorylation du résidu sérine 50 par Akt<sup>480</sup> et la production intracellulaire de peroxyde d'hydrogène<sup>481</sup> en réponse à l'insuline inhibe l'activité PTP-1B, formant ainsi deux boucles de rétroaction positives qui favorisent le lancement de la cascade de phosphorylation et l'action de l'insuline.

Il y a un nombre impressionnant d'études *in vitro* qui démontrent l'implication de PTP-1B dans la régulation de l'action de l'insuline (revue dans <sup>482</sup>). Les tyrosines 1162 et 1163<sup>483,484</sup> du récepteur de l'insuline et les protéines IRS-1 et IRS-2 sont déphosphorylés par PTP-1B<sup>485</sup>. *In vitro*, les acides gras libres augmentent l'expression de PTP-1B dans le muscle squelettique et le foie<sup>486</sup>. La surexpression de PTP-1B dans le muscle squelettique cause une résistance à l'insuline semblable à ce qui a été observé lors de la surexpression de LAR<sup>473,487</sup>. Chez l'humain, le gène de PTP-1B loge au chromosome 20q13.1, dans une région qui a déjà été associée avec le diabète et l'obésité<sup>488-491</sup>. Cette considération est appuyée par plusieurs études qui rapportent une augmentation de l'activité et/ou l'expression de PTP-1B durant l'obésité et la résistance à l'insuline, notamment dans le muscle

squelettique et le tissu adipeux<sup>432,433,492</sup>. De plus, un polymorphisme de PTP-1B (P387L) a été associé au diabète de type 2<sup>493</sup>.

#### 4.2.2.3.2. *Invalidation génétique de PTP-1B*

Deux équipes indépendantes ont presque simultanément invalidé PTP-1B chez la souris<sup>494,495</sup>. En présence d'insuline, la phosphorylation du récepteur de l'insuline est prolongée et accentuée dans le muscle squelettique et le foie, mais pas dans le tissu adipeux. Un clamp hyperglycémique/euglycémique et des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont clairement démontré une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez ces souris. Pour les souris nourries *ad libitum*, l'insulinémie nécessaire pour maintenir un niveau de glucose semblable aux souris contrôles est réduite de moitié.

Normalement, un traitement au TNF- $\alpha$  augmente l'activité PTP-1B et provoque un défaut dans la signalisation de l'insuline dans le muscle de souris contrôle, mais les souris invalidées pour PTP-1B en sont protégées<sup>496</sup>. Aussi, un régime riche en lipide a induit l'obésité et le diabète dans les souris exprimant normalement PTP-1B, mais pas dans celles qui en sont invalidées<sup>494,495</sup>. Cette résistance à l'obésité, malgré une faible augmentation de la prise alimentaire, s'explique en grande partie par une augmentation de la dépense énergétique. L'absence d'obésité représente donc un deuxième mécanisme pouvant accroître la sensibilité à l'insuline.

Certaines études ont d'abord suggéré que l'augmentation de la sensibilité à la leptine au niveau de l'hypothalamus pourrait expliquer la résistance à l'obésité<sup>497,498</sup>. Pour tester cette hypothèse, des souris invalidées sélectivement dans différents tissus ont été générées<sup>499</sup>. L'invalidation dans le foie et le muscle squelettique n'a aucun effet sur l'adiposité. La déplétion de PTP-1B dans le tissu adipeux a, de façon complètement inattendue, augmenté le gain de poids durant un régime riche en gras lorsque comparé aux souris contrôles. Enfin, les résultats les plus intéressants proviennent de l'invalidation limitée aux neurones. Ces souris montrent une augmentation de la sensibilité à la leptine, qui se traduit par une augmentation de la dépense énergétique et une diminution de la prise alimentaire qui résulte en une réduction du poids et de l'adiposité. De plus, elles démontrent une meilleure tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline accrue. Brièvement, on peut conclure

que PTP-1B contrôle la sensibilité à l'insuline dans le foie et le muscle squelettique, et qu'à partir du cerveau, elle contrôle l'adiposité et la sensibilité à l'insuline.

#### 4.2.2.4. LMW-PTP

##### 4.2.2.4.1. Structure et fonction

Les LMW-PTPs forment un groupe de PTPs distinct des PTPs classiques. Tel que l'évoque leur appellation, ce sont de petites PTPs, soit d'environ 18 kDa. Elles ne présentent pas d'homologie avec les autres PTPs, à l'exception de la séquence catalytique qui opère selon le même mécanisme. Chez l'humain, il existe quatre isoformes qui proviennent de l'épissage alternatif d'un même transcrit primaire. Les isoformes 1 et 2 (IF1 et IF2) ne diffèrent seulement qu'au niveau des résidus 40 à 73 et sont tous les deux actifs. Par contre, les isoformes SV3 (*splicing variant 3*) et LMW-PTP-C sont inactifs, d'où la proposition d'un rôle de « dominant négatif naturel » pour ce dernier<sup>500,501</sup>.

L'action de LMW-PTP est régulée par son activité et l'accessibilité à ses substrats. La phosphorylation de son résidu tyrosine 131 augmente jusqu'à 25 fois son activité enzymatique. Elle est aussi phosphorylée sur sa tyrosine 132, mais celle-ci servirait plutôt de site d'interaction avec le domaine SH2 de Grb2<sup>502,503</sup>. Selon sa localisation subcellulaire, dans le cytoplasme ou sur des structures associées à la membrane ou au cytosquelette, LMW-PTP agit sur différents substrats. Enfin, puisqu'elle possède un domaine catalytique similaire à celui des PTPs classiques, elle est aussi susceptible à l'oxydation par les ROS, comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>504</sup> et le NO<sup>505</sup>.

Le récepteur du PDGF<sup>506,507</sup> et celui du FGF (*fibroblast growth factor*)<sup>508</sup> ont entre autre été reconnus comme des substrats spécifiques de LMW-PTP, ce qui lui confère un rôle dans la croissance cellulaire. L'expression d'un mutant inactif de LMW-PTP a montré que la prolifération cellulaire stimulée par l'insuline est également régulée par LMW-PTP<sup>509</sup>. La synthèse de glycogène, une action plus métabolique de l'insuline, est aussi augmentée par l'expression de ce mutant. Agissant comme un mutant trappeur, son expression a aussi permis de confirmer une interaction directe entre



LMW-PTP et le récepteur de l'insuline. Par contre, l'insuline n'induit pas la phosphorylation de LMW-PTP, comme le fait le PDGF<sup>510</sup>.

#### 4.2.2.4.2. *Invalidation génétique de LMW-PTP*

La souris complètement invalidée pour LMW-PTP n'a pas encore été générée. Toutefois, des oligonucléotides anti-sens ont récemment été utilisés pour réduire son expression<sup>511</sup>. L'injection sous-cutanée d'oligonucléotides spécifiques à LMW-PTP, qui en permet une bonne biodistribution<sup>512,513</sup>, a permis de réduire de 90% la quantité d'ARNm dans le foie, et de 60-75% dans le tissu adipeux de souris génétiquement obèses (*ob/ob*) ou nourris avec un régime riche en gras. La diminution de LMW-PTP a, dans ces deux modèles d'obésité et de résistance à l'insuline, amélioré la sensibilité à l'insuline des souris, comme le démontre une forte diminution de l'insulinémie à jeun ( $\approx 50\%$ ) et de plus faibles glycémies au cours de tests de tolérance au glucose et à l'insuline. De plus, ces souris montrent une diminution de la cholestérolémie, des triglycérides et de stéatose hépatiques, sans toutefois perdre de poids. LMW-PTP a donc un rôle important dans l'action de l'insuline et le métabolisme des lipides, par contre, son implication dans l'apparition et/ou le développement de la résistance à l'insuline reste à être démontrée.

## 5. SHP-1 au centre des objectifs de la thèse

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la PTP SHP-1 (*SH2 domain-containing protein-1*), qu'on désigne aussi parfois par HCP (*hematopoietic cell phosphatase*), PTP-1C et SH-PTP1. Son abondance dans les cellules hématopoïétiques corrèle tout à fait avec son importance dans le système immunitaire (revue dans <sup>514</sup>).

Différentes raisons nous ont amené à croire que SHP-1 pouvait être impliquée, comme LAR, LMW-PTP et PTP-1B, dans la signalisation de l'insuline et la régulation du métabolisme du glucose. Tout d'abord, en plus d'être abondamment exprimée dans les cellules hématopoïétiques, SHP-1 se retrouve aussi en abondance dans le foie, et en plus faible quantité dans les autres tissus cibles de l'insuline, le muscle squelettique et le tissu adipeux<sup>515</sup>. De plus, il a été démontré que dans différents systèmes de signalisation, tel le PDGF<sup>516</sup>, l'interleukine-4<sup>517</sup> et Lck (*lymphocyte protein tyrosine*

*kinase*)<sup>518</sup>, SHP-1 est un régulateur de la phosphorylation de p85 et de l'activité PI3K. De plus, SHP-1 a depuis été associée à l'activation de PTEN dans des lignées de cellules cancéreuses, suggérant un second mécanisme de régulation de l'action de la PI3K<sup>519</sup>. Enfin, l'importance de STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription-3*) dans la gluconéogenèse<sup>520,521</sup> a récemment permis d'y présumer un rôle pour SHP-1 puisque STAT-3 semble être régulé par SHP-1<sup>522,523</sup>.

## 5.1. Structure et fonction

Le gène de SHP-1 est contenu dans le chromosome 12p12-13, une région qui est associée à environ 10% des cas de leucémie aiguë lymphoblastique infantile<sup>524</sup>, ce qui cadre bien avec son importance dans les cellules hématopoïétiques. SHP-1 est une PTP non-transmembranaire qui a la particularité de posséder, à son extrémité N-terminale, deux domaines SH2 en tandem (SH2<sub>N</sub> et SH2<sub>C</sub>, étant le plus N- et C-terminal, respectivement). Au centre de la protéine loge le domaine catalytique et un domaine de liaison à la cavéoline<sup>525</sup>. Enfin, la queue C-terminale contient une multitude de sites de phosphorylation, autant des résidus sérine que tyrosine, un signal de localisation nucléaire (SLN) et un domaine d'interaction avec les lipides.

## 5.2. Régulation de son activité

Comme plusieurs PTPs, SHP-1 est aussi régulée par les ROS et l'oxydation qu'ils occasionnent<sup>526,527</sup>. Une telle régulation de SHP-1 par l'insuline est donc tout à fait probable, mais reste à être démontrée. Bien qu'important, ce mécanisme de régulation dénote peu de spécificité. Plusieurs autres mécanismes régulent l'activité de SHP-1 avec beaucoup plus de subtilités.

### 5.2.1. Les domaines SH2

La détermination de la structure cristalline proposait déjà que le domaine SH2<sub>N</sub> puisse réguler l'activité catalytique de SHP-1<sup>528</sup>. En effet, au stade inactif, ce domaine entre en contact avec les résidus chargés autour de la pochette catalytique, et une partie de SH2<sub>N</sub> s'insère dans la pochette et bloque l'accès aux substrats. Lorsque SH2<sub>C</sub> se lie à une protéine phosphorylée, un changement de conformation fait en sorte que SH2<sub>N</sub> s'expose à son environnement, disposé à interagir lui aussi

avec une protéine phosphorylée. De façon synergique, ces interactions protéiques libèreraient le domaine PTP de l'inhibition par SH2<sub>N</sub><sup>528,529</sup>. *In vitro*, la liaison à des phosphopeptides augmente significativement l'activité phosphatase suggérant qu'*in vivo*, des ligands sont essentiels à son activation. L'idée que le SH2<sub>N</sub> d'une molécule de SHP-1 inhibe l'activité d'une autre a été proposée<sup>530</sup>, mais il a été démontré que SHP-1 apparaît plutôt comme un monomère<sup>531</sup>. De plus, *in vitro*, la concentration de l'enzyme n'affecte pas son activité spécifique, ce qui suggère que l'interaction entre deux molécules de SHP-1 n'affecte pas son activité, et donc que la régulation de l'activité par SH2<sub>N</sub> est strictement intramoléculaire.

Le domaine SH2<sub>C</sub> reconnaît, comme tous les domaines SH2, des protéines contenant des résidus tyrosine phosphorylés. Cette interaction permet à SHP-1 de directement recruter un substrat, ou de s'en approcher par l'intermédiaire d'une autre protéine. La délétion de SH2<sub>C</sub> affecte peu ou pas l'activité intrinsèque de SHP-1, et SH2<sub>N</sub> conserve sa capacité à l'inhiber<sup>530,532</sup>.

## 5.2.2. La queue C-terminale

L'utilisation de mutants tronqués en C-terminal a permis de démontrer l'importance de cette portion dans la régulation de SHP-1. D'abord, la délétion des 35 derniers acides aminés augmente de façon marquée l'activité phosphatase, mais étrangement, la délétion des 60 derniers ne l'affecte pas<sup>529</sup>. Une autre équipe a observé qu'un clivage à la thrombine de la queue C-terminale augmentait l'activité SHP-1, ce qui appuie l'idée d'une régulation négative par la queue C-terminale<sup>533</sup>. Les motifs qu'on y retrouve susceptibles d'influencer l'activité de SHP-1 sont les résidus tyrosine et sérine phosphorylables, le SLN et le domaine d'interaction avec les lipides.

### 5.2.2.1. Phosphorylation de résidus tyrosine

Dans des thymocytes et des hybridomes de cellules T, SHP-1 est phosphorylé sur les résidus tyrosine 536 et 564<sup>534</sup>. La mutation de la cystéine catalytique a permis de démontrer que la tyrosine 536 est sujette à l'autodéphosphorylation<sup>535</sup>. Ces phosphorylations augmentent l'activité phosphatase de SHP-1, mais ont aussi des fonctions adaptatrices dans le recrutement de protéines possédant un domaine SH2. Plusieurs évidences soutiennent le recrutement de Grb2<sup>536-540</sup> et de

substrats potentiels<sup>541</sup>. Enfin, il a été démontré que la phosphorylation de SHP-1 en réponse à une stimulation à l'insuline, dans plusieurs lignées cellulaires, dont des hépatocytes, augmente son activité phosphatase<sup>539</sup>. Cette phosphorylation formerait donc une boucle de rétroaction négative dans la signalisation de l'insuline.

#### **5.2.2.2. Phosphorylation de résidu sérine**

Différents stimuli provoquent la phosphorylation de SHP-1 sur le résidu sérine 591. Par contre, son effet semble parfois contradictoire et spécifique à certains types cellulaires. Dans les plaquettes, cette phosphorylation semble augmenter l'activité phosphatase<sup>542,543</sup>, alors qu'elle l'inhiberait dans les neutrophiles<sup>544</sup>. La fonction et l'importance de la phosphorylation sur des résidus sérine de SHP-1 restent donc à être clarifiées, mais surtout, à être démontrées dans les tissus cibles de l'insuline.

#### **5.2.2.3. Signal de localisation nucléaire (SLN)**

Dans les cellules hématopoïétiques, SHP-1 est principalement cytoplasmique. Par contre, dans d'autres types cellulaires, le noyau abrite en bonne partie la PTP<sup>522,545-547</sup>. La présence d'un SLN en deux parties (<sup>576</sup>KVKK-X<sub>13</sub>-KRK<sup>595</sup>) situé à l'extrémité C-terminale est responsable de cette translocation. Craggs et Kellie<sup>547</sup>, après avoir discuté de l'importance du SLN, proposent que dans les cellules hématopoïétiques, ce signal est atténué de manière à laisser SHP-1 errer dans le cytoplasme. L'interaction entre le domaine SLN et les importines est cruciale pour la translocation au noyau. La phosphorylation peut augmenter l'affinité avec les importines ou encore masquer le SLN<sup>548</sup>. La sérine 591 qu'on sait être phosphorylée, est tout près du domaine SLN, ce qui permet de lui suspecter un rôle dans la localisation subcellulaire de SHP-1. Mais que ce soit par la phosphorylation ou par un autre mécanisme, la régulation de la localisation cellulaire permet à SHP-1 de rejoindre différents substrats, et d'accomplir différentes tâches.

#### **5.2.2.4. Interaction avec les lipides**

La localisation de SHP-1 dans les radeaux lipidiques fait toujours l'objet de débats. Par contre, il est clair que l'expression d'un mutant dirigé vers ces structures membranaires réduit plus facilement la phosphorylation de plusieurs de ses substrats<sup>549-551</sup>. La région C-terminale semble critique puisque

la délétion de ses 68 derniers acides aminés empêche le ralliement de SHP-1 à cette structure<sup>551</sup>. Entre SH2<sub>C</sub> et son domaine PTP, SHP-1 contient aussi un domaine de liaison à la cavéoline-1 (206FVYLRQPY<sub>213</sub>)<sup>525</sup> qui participe assurément à sa localisation aux radeaux lipidiques puisque la cavéoline-1 en est la composante majeure<sup>552</sup>. Dans cette étude, environ 30% du contenu en SHP-1 co-localisait avec les membranes enrichies en cavéoline-1.

De plus, l'extrémité C-terminale de SHP-1 lie aussi des phospholipides tel l'acide phosphatidique, le dipalmitoylphosphatidylglycérol, le phosphatidylsérine, le PI-4,5-P<sub>2</sub> et le PIP<sub>3</sub><sup>553</sup>. Cette association PTP/lipide augmente l'activité phosphatase de SHP-1 par plus de mille fois, et ajuste possiblement sa localisation cellulaire vers la membrane<sup>553-556</sup>. En effet, si on se réfère à la production de PIP<sub>3</sub> par la PI3K en réponse à une stimulation insulinique, on peut facilement s'imaginer que SHP-1 ira rejoindre les PIP<sub>3</sub> nouvellement formés à la membrane<sup>554</sup>. L'activation directe et la relocalisation subcellulaire formeraient alors un double rôle pour PIP<sub>3</sub> dans la régulation de l'activité de SHP-1, représentant ainsi un second mécanisme de rétroaction négative actionné par SHP-1.

### 5.2.3. Isoforme et variant d'épissage

Deux isoformes de SHP-1 qu'on désigne (I)SHP-1 et (II)SHP-1 ont été identifiés chez l'homme<sup>557</sup> et la souris<sup>531</sup>. Leurs séquences nucléotidiques sont pratiquement identiques à l'exception de la région non traduite en 5' et des quelques nucléotides codants du départ. Les premiers acides aminés de (I)SHP-1 sont « MLSRG » alors que (II)SHP-1 débute par « MRV ». Un promoteur plus distal, et un autre proximal soutiennent l'expression de (I)SHP-1 et (II)SHP-1, respectivement. L'activité de ces promoteurs est régulée différemment. Par exemple, dans les cellules épithéliales humaines, seulement (I)SHP-1 est exprimé, mais les deux isoformes sont présents dans l'équivalent murin, ce qui appuie l'indépendance des promoteurs. Ces promoteurs sont donc possiblement un mode de régulation de l'activité de SHP-1.

De ces deux isoformes, plusieurs variants d'épissage ont été identifiés. SH2<sub>C</sub> et/ou SH2<sub>N</sub> sont absents de l'ARNm de quelques uns de ces variants. Étant donné la fonction de régulation de ces domaines (surtout SH2<sub>N</sub>), une forte activité de ces variants a été proposée et confirmée par expression bactérienne<sup>531</sup>. Un de ces variants, décrit par une autre équipe<sup>558</sup>, montre des

différences notables à l'intérieur de sa queue C-terminale. D'abord, le fait qu'elle soit plus longue de 29 acides aminés a motivé l'appellation SHP-1L (pour Long) de ce variant. Aussi, elle ne contient pas le domaine SLN et ses sites de phosphorylation sont différents. Enfin, elle renferme un domaine riche en proline qui permet habituellement l'interaction avec des protéines contenant un domaine SH3. Toutes ces différences affectent l'activité et/ou la localisation cellulaire des variants de SHP-1, leur concédant vraisemblablement des fonctionnalités distinctes.

Cependant, il n'est pas encore clair si ces ARNm sont tous traduits en protéines stables à des niveaux suffisamment élevés. Par exemple, on sait que SHP-1 prend normalement une conformation globulaire qui lui permet de résister à la digestion protéolytique, alors que les variants d'épissage sont plutôt linéaires et sensibles à cette digestion. Aussi, les macrophages contenant la mutation *motheaten* (délétion simple dans l'exon 3; voir section suivante) n'expriment pas la forme majeure de SHP-1, mais des transcrits d'épissage alternatif ne contenant pas l'exon 3 sont détectés. Cependant, l'absence d'activité SHP-1 propose que ces ARNm ne sont pas traduits, ou que les protéines sont trop instables<sup>559</sup>.

### 5.3. Invalidation génétique de SHP-1

L'invalidation génétique de SHP-1 à proprement dit n'a pas encore été réalisée, mais est assurément en cours. Néanmoins, nous avons accès à deux modèles murins de mutations spontanées qui affectent l'expression et l'activité de SHP-1. Ces souris souffrent d'alopecie et de dermatite irrégulières qui caricaturent un assaut par les mites, leur valant l'appellation de souris *motheaten* (*me*)<sup>560,561</sup>. Le premier modèle contient une délétion de la cytosine 228. Cette délétion crée un site d'épissage qui entraîne l'exclusion d'un segment de 101 paires de bases, entraînant du même coup le décalage du cadre de lecture. Enfin, un codon d'arrêt est ainsi généré, 81 paires de base en aval du segment disparu. Les souris du second modèle de mutation spontanée sont désignées *viable motheaten* (*me<sup>v</sup>*) en raison de leur espérance de vie un peu plus longue (61 jours, comparativement à 22 jours pour les souris *me*)<sup>562-564</sup>. La mutation *me<sup>v</sup>* consiste en une substitution (T→A) dans le domaine PTP qui fait disparaître un site d'épissage, favorisant l'activation de celui situé 15 paires de base en amont, ou d'un autre, situé dans une région normalement non codante, 69 paires de base en aval. Il en résulte donc la production de deux transcrits erronés, l'un allongé de 23 acides aminés,

et l'autre plus court de cinq. La mutation *me<sup>v</sup>*, contrairement à la mutation *me*, manifeste une activité résiduelle d'environ 10-20%.

Étant donné l'abondance de SHP-1 dans les cellules hématopoïétiques, il n'est pas surprenant de voir que les souris *me* et *me<sup>v</sup>* développent des troubles immunologiques<sup>514</sup>. Les deux modèles de souris sont gravement immunodéficientes et développent des troubles d'origine auto-immune. Ces souris meurent prématurément, habituellement des suites d'une pneumonie hémorragique et d'accumulation de macrophages, de lymphocytes et de granulocytes dans les poumons. L'activité SHP-1 résiduelle dans les souris *me<sup>v</sup>* rend le phénotype beaucoup moins sévère.

#### **5.4. Hypothèse de travail et approche expérimentale**

La première phase exploratoire consistait à s'assurer rapidement de l'implication de SHP-1 dans le métabolisme du glucose. Les souris *me<sup>v</sup>* devenaient alors un modèle très intéressant pour valider cette première hypothèse. Dans un premier temps, nous avons pu déterminer que ces souris présentent une glycémie 40 % plus faible que les souris contrôles, et des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont révélé une amélioration du métabolisme du glucose qu'on pouvait précairement attribuer à la réduction de l'activité de SHP-1. Ces résultats très positifs nous ont donc poussés à approfondir la question. En ce sens, nous nous attardons au chapitre I à caractériser les souris *me<sup>v</sup>*, tant au point de vue de la signalisation intracellulaire que de la physiologie de l'animal. De plus, l'abondance de SHP-1 dans le foie nous a incités à mieux caractériser le rôle de SHP-1 dans ce tissu. C'est en profitant de l'hépatotropisme des AdV (un vecteur viral utilisé pour le transfert de gènes) que nous y avons exprimé un mutant inactif de SHP-1 (DNSHP-1, mutation C453S) et mis à profit l'interférence des ARN afin de tester avec plus de solidité notre hypothèse de travail.

Au second chapitre, nous voulions mieux décrire les mécanismes par lesquels SHP-1 améliore la sensibilité à l'insuline dans le foie. Il est connu que les hépatocytes Fao survivent bien dans un milieu sans glucose, ce qui évoque la capacité à en produire, et donc la présence d'un système enzymatique gluconéogénique adéquat. De ce fait, les cellules Fao nous sont apparues comme un modèle cellulaire approprié. Selon la même approche, nous avons exprimé DNSHP-1, mais aussi la

forme sauvage de SHP-1, dans ces cellules pour étudier la signalisation et l'action de l'insuline. Au cours de cette étude, nous avons pu découvrir un nouveau mode de régulation de l'activité SHP-1.

*In vivo*, le transfert de gène spécifiquement au foie nous avait permis de clairement démontrer l'importance de SHP-1 dans ce tissu. Par contre, son implication dans le muscle squelettique n'a jusqu'ici été démontrée qu'avec les souris *me<sup>v</sup>*, où tous les tissus sont déficients en SHP-1. Si on se réfère aux études montrant qu'un peut observer un défaut de signalisation dans le muscle des souris qui sont pourtant invalidées pour le récepteur de l'insuline spécifiquement dans le foie<sup>106</sup>, il devient plausible que l'augmentation de la sensibilité à l'insuline dans le muscle des souris *me<sup>v</sup>* soit secondaire à celle du foie. Au cours du troisième et dernier chapitre nous avons donc exprimé notre mutant DNSHP-1 dans les myocytes L6, une lignée cellulaire déjà très bien caractérisée, pour démontrer que SHP-1 améliore la sensibilité à l'insuline dans le muscle squelettique par un mécanisme cellulaire indépendant. Puisque le transfert de gènes dans le muscle squelettique à l'aide d'AdV est très peu efficace chez la souris adulte, nous avons eu recours à une souris transgénique qui surexprime le récepteur du coxsackie/adénovirus (CAR)<sup>565</sup> dans le muscle pour confirmer nos résultats *in vivo*.



## **Chapitre I**

LA PROTÉINE TYROSINE PHOSPHATASE SHP-1 RÉGULE  
NÉGATIVEMENT L'HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE

## Résumé

La protéine tyrosine phosphatase SHP-1 est un inhibiteur bien connu de la cascade de signalisation dans les cellules hématopoïétiques, mais son rôle potentiel dans les tissus cibles de l'insuline est encore inconnu. Dans la présente étude, nous montrons que les souris *me<sup>v</sup>* qui expriment une protéine SHP-1 fonctionnellement déficiente sont particulièrement tolérantes au glucose et sensibles à l'insuline comparativement aux souris contrôles, conséquemment à l'augmentation de la signalisation du récepteur de l'insuline via la voie IRS/PI3K/Akt observée dans le foie et le muscle squelettique. La diminution de l'activité SHP-1 dans le foie de souris normales par l'expression d'un mutant catalytiquement inerte de SHP-1 ou par interférence des ARNs effectuées par transferts adénoviraux appuient tous deux ce phénotype. La phosphorylation sur des résidus tyrosine de CEACAM1, un modulateur de la clairance hépatique de l'insuline, et la clairance du sérum de [<sup>125</sup>I]-insuline sont nettement augmentées dans les souris déficientes en SHP-1, et *in vitro*, dans des hépatocytes déficients en SHP-1. Ces découvertes décrivent un nouveau rôle pour SHP-1 dans la régulation de l'homéostasie du glucose par la modulation de la signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique, mais aussi de la clairance de l'insuline.

## The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis

Marie-Julie Dubois<sup>1,8</sup>, Sébastien Bergeron<sup>1,8</sup>, Hyo-Jeong Kim<sup>2</sup>, Luce Dombrowski<sup>1</sup>, Mylène Perreault<sup>1</sup>, Bénédicte Fournès<sup>3</sup>, Robert Faure<sup>4</sup>, Martin Olivier<sup>5</sup>, Nicole Beauchemin<sup>3</sup>, Gerald I. Shulman<sup>2,6</sup>, Katherine A. Siminovitch<sup>7</sup>, Jason K. Kim<sup>2</sup>, and André Marette<sup>1</sup>

Department of <sup>1</sup>Anatomy-Physiology and Lipid Research Unit and <sup>4</sup>Pediatrics, Laval University Hospital Research Center, 2705 Laurier Boul., Québec, Québec G1V 4G2, Canada, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Section of Endocrinology and Metabolism, Yale Mouse Metabolic Phenotyping Center, Yale University School of Medicine, 295 Congress Avenue, New Haven, Connecticut 06520, USA, <sup>3</sup>McGill Cancer Centre, McGill University, 3655 Promenade Sir-William-Osler, Montreal, Quebec H3G 1Y6, Canada, <sup>5</sup>Departments of Experimental Medicine, Microbiology and Immunology, McGill University, 3775 University Street, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada, <sup>6</sup>Howard Hughes Medical Institute, <sup>7</sup>Departments of Medicine and Immunology, University of Toronto, Mount Sinai Hospital Samuel Lunenfeld Research Institute, 600 University Avenue, Toronto, Ontario M5G 1X5, Canada. <sup>8</sup>These authors contributed equally to this paper. Correspondence should be addressed to A.M. (andre.marette@crchul.ulaval.ca)

## **Abstract**

The protein tyrosine phosphatase SHP-1 is a well known inhibitor of activation-promoting signaling cascades in hematopoietic cells but its potential role in insulin target tissues is unknown. Here we show that *viable motheaten* mice bearing a functionally-deficient SHP-1 protein are markedly glucose tolerant and insulin sensitive as compared to wild-type littermates, due to enhanced insulin receptor signaling to IRS/PI3K/Akt in liver and muscle. Down-regulation of SHP-1 activity in liver of normal mice by adenoviral expression of a catalytically inert mutant of SHP-1, or following small hairpin RNA-mediated SHP-1 silencing, further confirmed this phenotype. Tyrosine phosphorylation of CEACAM1, a modulator of hepatic insulin clearance, was also markedly increased and [<sup>125</sup>I]insulin clearance augmented in SHP-1-deficient mice or hepatic cells. These findings demonstrate a novel role for SHP-1 in the regulation of glucose homeostasis through modulation of insulin signaling in liver and muscle as well as hepatic insulin clearance.

## **Introduction**

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) play a key role in the regulation of insulin action in liver and peripheral insulin target tissues (reviewed in<sup>1-3</sup>). Both PTP1B and LAR (leukocyte related-antigen) are known to negatively modulate insulin action on glucose metabolism through tyrosine dephosphorylation of the insulin receptor (IR) and/or IRS-1<sup>4-7</sup>. SHP-2, a ubiquitously-expressed SH2-domain-containing cytosolic PTP positively modulates insulin signaling<sup>8,9</sup>. By contrast, the SHP-1 PTP, expressed primarily in hematopoietic lineages and in epithelial cells<sup>10-13</sup>, generally inhibits growth-promoting receptors or their targets<sup>10-16</sup>. Insulin stimulates the phosphorylation and activation of SHP-1, presumably by a direct association between SHP-1 and the IR<sup>17,18</sup>. The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is also dephosphorylated by SHP-1 upon interleukin-4<sup>19</sup>, platelet-derived growth factor (PDGF)<sup>20</sup> or T cell receptor (TCR) stimulation<sup>21</sup>. However, this association has not been investigated in classical insulin target cells involved in glucose homeostasis.

The transmembrane glycoprotein carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) is dephosphorylated by SHP-1 in lymphocytes and epithelial cells<sup>22-24</sup>. CEACAM1 is also a substrate of the IR in liver and modulates receptor-mediated insulin endocytosis and degradation<sup>25-28</sup>, as mice overexpressing a dominant-negative phosphorylation-defective CEACAM1 mutant in the liver develop hyperinsulinemia resulting from impaired hepatic insulin clearance<sup>29</sup>.

The negative regulatory effects of SHP-1 on CEACAM1 and other signaling cascades prompted us to examine the possible role for SHP-1 in regulation of insulin sensitivity and glucose homeostasis. We find that viable motheaten (*me<sup>v</sup>*) mice expressing a catalytically defective SHP-1<sup>30</sup> are markedly glucose tolerant and insulin sensitive compared to wild-type controls, due to enhanced IR signaling to IRS/PI3K/Akt in liver and muscle, and to increased phosphorylation of CEACAM1. This remarkable metabolic phenotype of *me<sup>v</sup>* mice is recapitulated in normal mice through adenoviral expression of a dominant-negative inactive form of SHP-1 in the liver or hepatic SHP-1 knockdown by shRNA-

mediated gene silencing, confirming a critical role for SHP-1 in negatively modulating insulin action and clearance in the liver thereby regulating whole body glucose homeostasis.

## Results

**SHP-1 is expressed in skeletal muscle and liver.** SHP-1 is primarily expressed in hematopoietic cells, but has also been detected in liver and skeletal muscle<sup>11,31</sup>. Results of northern blot analysis confirmed SHP-1 expression in skeletal muscle of wild-type and *me<sup>v</sup>* mice, although at lower levels than in bone-marrow-derived macrophages<sup>32</sup> (Fig. 1a). SHP-1 is also expressed in skeletal muscle, liver and L6 myocytes (Fig. 1b), and its abundance in the liver is comparable to that of *me<sup>v</sup>* macrophages. SHP-1 is also detected immunohistochemically in myocytes and hepatocytes (Fig. 1c), and also in macrophages and Kupffer cells, as indicated by colocalization of SHP-1 with the macrophage and Kupffer cell markers MOMA-1 and F4/80 in muscle and liver, respectively (Fig. 1c). In muscle cells, SHP-1 was dispersed throughout the cytoplasm with enrichment in subsarcolemmal compartment(s), but shows no nuclear localization. SHP-1 immunoreactivity was less prominent in larger muscle fibers suggesting that type IIb fibers may express lower amounts of SHP-1. In liver, SHP-1 is detected in the cytosol and also in the nucleus, consistent with the distribution of SHP-1 in other cell types<sup>33,34</sup>. SHP-1 immunoreactivity was negligible in liver and muscle tissues from non-viable motheaten (*me*) mice known to express no SHP-1 (Supplementary Fig. 1 online).

**Glucose metabolism is increased in *me<sup>v</sup>* mice.** Determination of SHP-1 tyrosine phosphatase activity in liver extracts from wild-type and *me<sup>v</sup>* mice confirmed the marked reduction (~75%) of SHP-1 function in the mutant mice (Fig. 2a). Body weight was also significantly reduced in *me<sup>v</sup>* mice in part due to their lower adiposity, even after correcting for body weight differences (Supplementary Table 1 online). Despite comparable circulating insulin concentrations, fasting blood glucose concentrations were 40% lower in *me<sup>v</sup>* relative to control mice (Supplementary Table 1 online), suggesting increased insulin sensitivity in *me<sup>v</sup>* mice. Triglyceride concentrations were also reduced in *me<sup>v</sup>* mice (Supplementary Table 1 online).

We first assessed the potential role of SHP-1 in regulating whole body insulin action and glucose disposal by evaluating glucose and insulin tolerance. Intraperitoneal glucose injection evoked rapid increase in glycemia, and gradual return to near fasting levels over 90 min in wild-type mice, but barely increased glycemia in *me<sup>v</sup>* mice in which glucose values returned to fasting levels within 30 min (Fig. 2b). We then performed insulin tolerance tests using a low insulin dose (0.25 U/kg) to avoid severe hypoglycemia in *me<sup>v</sup>* mice caused by regular insulin dose (0.5–1.5 U/kg). While insulin injection induced a time-dependent reduction in glycemia in both wild-type and SHP-1-deficient mice, rate of blood glucose reduction was more rapid and the hypoglycemic effect of insulin more sustained in *me<sup>v</sup>* compared to control mice (Fig. 2c). Thus *me<sup>v</sup>* mice are more glucose tolerant and insulin sensitive than their wild-type littermates.

To further define the role for SHP-1 in modulating whole body insulin sensitivity, we examined insulin-mediated glucose uptake and metabolism during a 2 h hyperinsulinemic-euglycemic clamp and 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]glucose injection in awake mice. As shown in Figure 2d,e, insulin-stimulated increases in whole body glucose turnover and gastrocnemius muscle glucose uptake were significantly increased in *me<sup>v</sup>* compared to wild-type mice. Similarly, insulin-mediated suppression of basal hepatic glucose production during a hyperinsulinemic euglycemic clamp was also greater in the mutant mice (Fig. 2f).

**Increased insulin sensitivity in isolated *me<sup>v</sup>* muscle.** To investigate whether the *me<sup>v</sup>* phenotype of increased skeletal muscle insulin sensitivity is maintained *ex vivo*, we assessed insulin effects on 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H]glucose uptake in *me<sup>v</sup>* EDL and soleus muscles. While basal glucose uptake rates were similar in wild-type and *me<sup>v</sup>* mice, insulin-stimulated increases in glucose uptake were ~2–4 fold higher in *me<sup>v</sup>* compared to wild-type EDL and soleus muscles (Fig. 2g). These increases were inhibited by the PI3K inhibitor, wortmannin, in both wild-type and *me<sup>v</sup>* mice (Supplementary Fig. 2 online), suggesting that enhanced insulin responsiveness in the mutant mice is PI3K-dependent.

**Increased insulin signaling in *me<sup>v</sup>* muscle and liver.** Because SHP-1 interacts with components of the insulin signaling pathway, we next investigated whether SHP-1 modulates tyrosine phosphorylation of the IR, IRS-1/2 and regulatory p85 subunit of PI3K. As shown in Figure 3a and 3b

(quantified in Supplementary Table 2 online), tyrosine phosphorylation of several proteins (MW ~ 95, 120, and 170–180 kDa) was increased in *me<sup>v</sup>* relative to wild-type muscle and liver, even in the absence of exogenous insulin injection. Immunoprecipitation data confirmed the phosphotyrosine content of both the IR and IRS-1 proteins to be enhanced in *me<sup>v</sup>* muscle and liver; IRS-2 tyrosine phosphorylation was also increased in *me<sup>v</sup>* liver. Interestingly, p85-PI3K, a SHP-1 substrate in Jurkat T cells,<sup>21</sup> was also more tyrosine phosphorylated in *me<sup>v</sup>* compared to control muscle and liver (Fig. 3a,b). These results suggest that SHP-1 targets are key players in the coupling of the IR to IRS/PI3K/Akt in two insulin target tissues involved in glucose homeostasis.

The possible association of enhanced IR, IRS and p85-PI3K tyrosine phosphorylation in *me<sup>v</sup>* mice with augmented insulin effects on PI3K activity and Akt phosphorylation was also investigated (Fig. 3 and Supplementary Fig. 3 online). Insulin-stimulated PI3K activity detected in both IRS-1 and IRS-2 immunoprecipitates was markedly enhanced in *me<sup>v</sup>* relative to control skeletal muscle (Fig. 3c) and IRS-2 immunoprecipitable PI3K activity was enhanced in *me<sup>v</sup>* liver (Fig. 3d). Akt was also hyperphosphorylated on both Ser473 and Thr308 regulatory sites and its kinase activity was increased in *me<sup>v</sup>* muscle (Fig. 3e,f and Supplementary Fig. 3 online).

Although insulin-induced PI3K and Akt activation were similarly increased in *me<sup>v</sup>* muscle, Akt activation was consistently higher than PI3K activity in liver of these mice. SHP-1 functions in the liver may therefore also include the regulation of PTEN, a lipid phosphatase that counteracts PI3K activity by dephosphorylating phosphatidylinositols 3,4,5-trisphosphate and 3,4-bisphosphate<sup>35,36</sup>. PTEN tyrosine phosphorylation was indeed augmented in *me<sup>v</sup>* liver (Supplementary Fig. 4 online), suggesting that SHP-1 deficiency further augments Akt activation by enhancing PTEN tyrosine phosphorylation.

**Liver SHP-1 down-regulation enhances glucose metabolism.** While the severe haemopoietic cell defects conferred by the *me<sup>v</sup>* mutation<sup>37</sup> would be expected to cause secondary insulin resistance rather than heightened insulin sensitivity, these alterations as well as decreased adiposity may confound the analysis of insulin effects in *me<sup>v</sup>* mice. To demonstrate that SHP-1 deficiency *per se* accounts for enhanced insulin signaling and glucose metabolism in insulin target tissues, a dominant



negative SHP-1 species (DNSHP-1)<sup>38</sup> was overexpressed in the liver of wild-type mice by adenoviral gene transfer and efficacy of gene transfer confirmed 3 d post-injection by histochemical and western blot analyses (Fig. 4a). Results of an intraperitoneal glucose tolerance test on 5 h-fasted mice revealed better glucose tolerance in these mice compared to LacZ-transduced mice (Fig. 4b) and immunoblotting analysis of DNSHP-1 hepatic cell lysates revealed several proteins as hyperphosphorylated under both fasting and post-insulin-stimulatory conditions (Fig. 4c). Insulin signaling to IRS/PI3K/Akt was also augmented in DNSHP-1-infected liver, tyrosine phosphorylation of hepatic IR, IRS-1 and IRS-2 (Fig. 4c), insulin-induced IRS-1- and IRS-2-associated PI3K (Fig. 4d) and Akt activities and insulin-mediated Akt Ser473/Thr308 phosphorylation (Fig. 4e) being increased in these mice (Supplementary Fig. 3 and Table 2 online). PTEN tyrosine phosphorylation, however, was not altered in the DNSHP-1 liver (Supplementary Fig. 4 online).

We next tested whether SHP-1 knockdown in the liver recapitulates the insulin-sensitive phenotype of *me<sup>v</sup>* mice. Injection of AdV shRNA-SHP-1 was associated with 45% decrease in SHP-1 protein levels in liver with no effect on  $\alpha$ -tubulin levels (Fig. 4f). SHP-1 knockdown enhanced both glucose tolerance (Fig. 4g) and insulin signaling, inducing increases in insulin-mediated receptor tyrosine phosphorylation and Akt Ser473 phosphorylation (Fig. 4h), but not PTEN phosphorylation (Supplementary Fig. 4 online). Thus the improved insulin signaling to Akt and glucose tolerance observed in *me<sup>v</sup>* mice is recapitulated by liver-specific SHP-1 down-regulation.

**SHP-1 modulates CEACAM1 and insulin clearance.** The 120 kDa CEACAM1 protein is a SHP-1 substrate in T and epithelial cells<sup>22-24</sup> and regulates insulin degradation. Thus the detection of an abundantly tyrosine phosphorylated 120 kDa species in *me<sup>v</sup>* and DN-SHP-1-expressing liver suggests that SHP-1 effects on hepatic insulin clearance may reflect modulation of CEACAM1. As shown in Figure 5a, CEACAM1 tyrosine phosphorylation is increased by almost 3-fold in *me<sup>v</sup>* and by almost 9-fold in AdV-DNSHP-1 infected mice relative to control livers. CEACAM1 phosphorylation was induced only after insulin injection in wild-type mice, but was constitutively high in *me<sup>v</sup>* liver and not further increased by insulin stimulation (Fig. 5b). Similarly, CEACAM1 phosphorylation triggered by DNSHP-1 expression was not further enhanced by insulin stimulation (Fig. 5b) and was also increased in shRNA-SHP-1-transduced mice in the absence of acute insulin injection (Fig. 5c).

We next evaluated the effects of SHP-1 on insulin degradation by measuring [<sup>125</sup>I]-insulin clearance in the DNSHP-1-transduced mice. As shown in Figure 5d, SHP-1-deficiency was associated with significant acceleration of insulin clearance. As appearance of [<sup>125</sup>I]-insulin in the circulation peaked only ~20–30 min post-injection (data not shown), it appears that SHP-1 effects on insulin clearance are seen primarily in the second, slower clearance phase reflecting endosomal insulin dissociation and degradation. The early kinetics of [<sup>125</sup>I]insulin internalization was investigated using a hepatic cell line expressing SHP-1 at levels comparable to L6 myocytes, and also stably overexpressing CEACAM1 (Fig. 5e). DNSHP-1 AdV delivery in these cells markedly enhanced CEACAM1 phosphorylation, even in the absence of insulin stimulation, and resulted in greater insulin internalization than observed in control cells (Fig. 5f). Decreases in internalized insulin at 20 min in the infected cells may reflect endosomal-mediated insulin degradation<sup>39</sup> and retroendocytosis. These data confirm the important role for SHP-1 in modulating CEACAM1 phosphorylation and hepatic insulin clearance.

**Insulin receptor and CEACAM1 are SHP-1 substrates.** Further evaluation of SHP-1 effects on CEACAM1 and other potential SHP-1 substrates in DNSHP-1-expressing liver cells revealed that SHP-1 co-immunoprecipitates CEACAM1, IR and p85, but not IRS-1 (Fig. 6a) and that SHP-1 immunodepletion removes a small fraction of CEACAM1 and IR (Fig. 6b). Tyrosine-phosphorylated IR, CEACAM1 and p85 immunoprecipitated from liver of insulin-injected mice were also all dephosphorylated *in vitro* by GST-SHP-1 but not by GST-DNSHP-1 (Fig. 6c,d) and thus are substrates for SHP-1 in the liver. In contrast, neither IRS-1 (Fig. 6c) nor IRS-2 (data not shown) were SHP-1 substrates in the dephosphorylation assay, suggesting that the IRS proteins bind to the IR and not directly to SHP-1. While IR was also dephosphorylated *in vitro* by GST-PTP1B and GST-PEST (Fig. 6e,f), neither PTPase dephosphorylates CEACAM1. The selective ability of SHP-1 to dephosphorylate CEACAM1 provides further evidence of a key role for SHP-1 in the regulation of hepatic insulin clearance.

## ***Discussion***

Data from gene-knockout and transgenic overexpression models have identified important roles for PTPs (LAR, PTP1B, SHP-2) in the regulation of insulin sensitivity and glucose homeostasis *in vivo*<sup>5,7,9</sup>. PTP1B has received particular attention as cumulative genetic and biochemical findings reveal a key inhibitory role for PTP1B in modulating insulin signaling (see<sup>1,2</sup>). By contrast, a potential role for SHP-1 in modulating insulin action on glucose metabolism has remained relatively unstudied, possibly due to the perception that SHP-1 is not significantly expressed in classical insulin-target tissues. However, as reported here and elsewhere<sup>31</sup>, the liver expresses relatively high levels of SHP-1 and, as also shown here, SHP-1 is expressed, albeit to a lesser extent, in skeletal muscle. SHP-1 subcellular distribution appears quite distinct in these two tissues, SHP-1 being primarily cytosolic and concentrated in discrete subsarcolemmal compartments in muscle cells, while being enriched in the nuclear compartment of hepatocytes and possibly modulating transcriptional function in these cells as suggested for intestinal cells and keratinocytes<sup>33,34</sup>.

In the current study, analysis of insulin-mediated glucose metabolism in SHP-1-deficient *me<sup>v</sup>* mice has revealed a significant role for SHP-1 in the modulation of insulin sensitivity and whole body glucose metabolism. When compared to wild-type littermates, *me<sup>v</sup>* mice exhibit lower fasting blood glucose concentrations despite normal insulin levels. Glucose and insulin tolerance tests as well as hyperinsulinemic-euglycemic clamp studies also reveal these mice to be remarkably glucose tolerant and insulin sensitive, and to manifest enhanced whole body, skeletal muscle and liver sensitivity to insulin. Insulin-induced glucose uptake *ex vivo* is also augmented in *me<sup>v</sup>* muscle.

As is consistent with data from *in vitro* studies of SHP-1 functions<sup>18</sup>, SHP-1 deficiency was associated here with increases in insulin-evoked tyrosine phosphorylation of the IR, IRS-1 and IRS-2, as well as enhanced PI3K and Akt activation in skeletal muscle and liver. Moreover, the IR was specifically immunoprecipitated with SHP-1 in liver, and dephosphorylated by SHP-1 *in vitro*. These data strongly suggest that SHP-1 attenuates insulin action in muscle and liver by binding and dephosphorylating the IR and thereby inhibiting insulin signaling to the IRS/PI3K/Akt pathway.

SHP-1 deficiency was also associated with increased insulin-induced tyrosine phosphorylation of p85-PI3K. The p85 subunit is tyrosine phosphorylated by the IR *in vitro*<sup>40</sup> and its insulin-induced tyrosine phosphorylation is associated with PI3K activation<sup>41</sup>. Interestingly, p85 is a target of SHP-1 upon growth factor stimulation and receptor activation in different cell types<sup>19-21</sup> and cells lacking SHP-1 show increased PI3K activity and Akt phosphorylation<sup>42</sup>. We have confirmed that SHP-1 interacts with p85 in liver and that the p85-PI3K subunit is dephosphorylated by GST-SHP-1 *in vitro*. Available data suggest that SHP-1 inhibitory effects on PI3K activity and Akt Ser473 phosphorylation reflects its dephosphorylation of Tyr688, a residue that, when phosphorylated, interacts with the p85 NH<sub>2</sub>-terminal SH2 domain so as to relieve p85 inhibitory effects on the p110 catalytic subunit<sup>19-21,42</sup>. This model is consistent with recent data ascribing to p85 roles in both stabilizing p110 and maintaining p110 in a state of low activity by an allosteric mechanism<sup>43,44</sup>.

SHP-1 effects on insulin signaling to glucose metabolism may also reflect its negative regulation of PTEN. SHP-1 binding and dephosphorylation of PTEN promotes PTEN binding to membrane phosphatidylinositols and thus impairs PI3K signaling to Akt<sup>45</sup>. However, PTEN tyrosine phosphorylation, while increased in *me<sup>v</sup>* liver, is not altered by DNSHP-1 or shRNA-SHP-1 expression. Thus, PTEN hyperphosphorylation in *me<sup>v</sup>* mice is either a secondary phenomenon or the dramatic reduction of SHP-1 activity engendered by the *me<sup>v</sup>* mutation is required to reveal SHP-1 effects on PTEN.

To further evaluate SHP-1 effects on insulin signaling, we attempted, but failed, to rescue SHP-1 activity in liver of *me<sup>v</sup>* mice using an AdV SHP-1 construct. This problem may reflect enhanced antiviral immune response in the *me<sup>v</sup>* mice, with increases in immune-mediated elimination of the adenovirally transduced cells. However, AdV-mediated delivery of a dominant-negative SHP-1 mutant or of shRNA-SHP-1 allowed us to circumvent this problem. Although the AdV constructs transduced not only hepatocytes, but also liver Kupffer and macrophage cells (Supplementary Fig. 5 online), Kupffer cells transduction is unlikely to have affected glucose metabolism as these cells are not a major reservoir of AdV accumulation in liver<sup>46</sup> and do not contribute to liver glucose production. Analysis of DNSHP-1 or shRNA-SHP-1-transduced mice confirmed that glucose tolerance and IR signaling to IRS/PI3K/Akt were augmented in the context of SHP-1 deficiency, indicating that increased insulin signaling to Akt and liver glucose metabolism in *me<sup>v</sup>* mice is a cell autonomous

effect of SHP-1 deficiency rather than a secondary consequence of immune alterations and/or reduced adiposity.

Analysis of all three mouse models of altered SHP-1 function also identified CEACAM1 as a SHP-1 substrate in the liver. Our data also reveal an important role for SHP-1 in modulating both CEACAM1 phosphorylation and hepatic insulin degradation. It is interesting to note that CEACAM1 deficiency created by expressing a dominant-negative CEACAM1 transgene in the liver (L-SACC1 mice) not only alters hepatic insulin clearance but also causes abnormalities in lipid metabolism such as elevation of plasma triglycerides, and lipid accretion in the visceral adipose depots<sup>29</sup>. These perturbations of lipid metabolism have been attributed in part to hyperinsulinemia in the L-SACC1 mice, but a role for CEACAM1 in directly modulating lipid metabolism in liver has also been proposed<sup>47,48</sup>. Our data showing CEACAM1 to be hyperphosphorylated in *me<sup>v</sup>* mice, which manifest reduced adiposity and significant reduction in plasma triglycerides, provide further support for a role of CEACAM1 in the control of lipid metabolism. While further studies are required to determine the mechanisms whereby SHP-1 modulates lipid metabolism and fat accretion, the current data demonstrate that SHP-1 is expressed in insulin target tissues and modulates whole body and tissue insulin sensitivity for glucose metabolism as well as hepatic insulin clearance. SHP-1 thus represents an attractive target for the design of drugs to ameliorate insulin resistance and type 2 diabetes.

## **Methods**

**Animals.** Viable motheaten mice ( $me^v$ ; C57BL/6J  $me^v/me^v$ ) and their littermates (used at 6–9 weeks old) were bred in the animal facility of the Samuel Lunenfeld Research Institute at the Mount Sinai Hospital (Toronto, Canada). C3H mice (6–8 weeks old) used for adenoviral expression studies were from Charles River Labs. Animal experimentation was approved by the Laval University Institutional Animal Care Committee. We determined fat and lean masses by dual-energy x-ray absorptiometry using a PIXImus mouse densitometer (Lunar Corp.).

**Adenovirus preparation and injection.** We generated adenoviruses (AdV) encoding LacZ, GFP, DNSHP-1 and shRNA-SHP-1 using the AdEasy™ system according to the manufacturer's instructions (STRATAGENE) (Supplementary Methods online). We injected AdV ( $6 \times 10^{10}$  viral particles/100  $\mu$ l saline) into the tail vein of mice to specifically target the liver.

**Intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests.** Three days after AdV injection and following a 5 h fast, we injected mice intraperitoneally with either glucose (1 g/kg) or human insulin (0.25 U/kg). Blood was collected at the indicated times for determination of glycemia using a glucometer (Elite, Bayer Inc.).

**Tissue-specific glucose metabolism and insulin action.** Following overnight fasting, we conducted hyperinsulinemic-euglycemic clamps in awake  $me^v$  and wild-type mice as previously described<sup>49</sup>. Briefly, 2 h clamps were conducted with a prime-continuous infusion of 2.5 or 1.25 mU/kg/min (to determine insulin sensitivity at sub-maximal insulin dose) and a variable infusion of 20% glucose to maintain euglycemia. We estimated insulin-stimulated whole-body glucose metabolism using [<sup>3</sup>-<sup>3</sup>H]glucose infusion during clamps, and assessed tissue-specific glucose uptake with 2-deoxy-D-[1-<sup>14</sup>C]glucose injection. We measured 2-[<sup>3</sup>H]2-deoxy-D-glucose uptake in isolated EDL and soleus muscles as previously described<sup>50</sup>.

**Insulin signaling and CEACAM1 determinations.** We injected fasted mice either with saline or insulin (3.8 U/kg) for 2 or 5 min. Liver and gastrocnemius muscles were quickly excised and frozen in liquid nitrogen. Tissue lysates were prepared and used for insulin signaling studies as previously described<sup>50</sup>. In brief, 0.25–1 mg of protein were incubated (overnight, 4 °C) with 40 µL protein A Sepharose beads (Amersham) linked to antibodies against IR $\beta$ , IRS-1, IRS-2, p85, or CEACAM1. Beads were washed with PBS containing 1% Igepal CA-630 detergent (Sigma) and phosphatase inhibitors, boiled 5 min in Laemmli buffer and immunoprecipitates were subjected to western blot analysis. For PI3K and Akt kinase activities, we immunoprecipitated muscle and liver lysates (1 mg protein) with 2 µg of antibody against IRS-1, IRS-2 or Akt-1/2 coupled to protein A Sepharose at 4 °C and kinase assays were performed as previously described<sup>50</sup>.

**[<sup>125</sup>I]insulin clearance *in vivo*.** Human recombinant [<sup>125</sup>I] insulin (Amersham Biosciences) was injected via tail vein (100 Bq/g) to 5 h-fasted mice, 3 d after AdV infection. We collected venous blood samples at different time points and counted plasma for assessment of [<sup>125</sup>I]insulin clearance.

**[<sup>125</sup>I]insulin internalization in hepatic cells.** We used BNL-CL2 mouse embryonic hepatocytes stably expressing CEACAM1 (generated as described in Supplementary Methods online), cultured in 6-well plates and infected with either GFP or DNSHP-1-encoding AdVs (2.5 x 10<sup>10</sup> viral particles per well). Based on GFP visualization, >80% of the cells expressed the constructs after 24 h. AdV-infected cells were incubated with 200 pM [<sup>125</sup>I]insulin in D-MEM at 4 °C for 30 min. Cells were then washed three times with ice-cold PBS and incubated with pre-warmed D-MEM at 37 °C. [<sup>125</sup>I]insulin internalization was stopped at different times by two 5 min washes with ice-cold D-MEM adjusted to pH 2.8 to remove surface receptor-bound ligand. Cells were solubilized in NaOH 1N and internalized radioactivity was counted in a  $\gamma$ -counter. Data are expressed as % of pre-bound [<sup>125</sup>I]insulin internalized, corrected for by subtracting nonspecific radioactivity of cells after incubation with [<sup>125</sup>I]insulin in the presence of 10 µM cold insulin.

**Immunocytochemical detection of SHP-1 in mouse liver and muscle.** We fixed 6 µm-thick frozen sections of tibialis anterior muscle and liver with ice-cold acetone followed by staining with a polyclonal antibody to SHP-1 (1:1000) or monoclonal antibodies F4/80 (1:100) or MOMA-1 (1:50) to

detect macrophages/Kupffer cells. Nuclei were stained with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI). We used secondary Alexa Fluor® 488 antibody (1:1000) to visualize SHP-1 or a biotin-linked antibody (1:300), followed by CY3-coupled streptavidin (1:700) for detection of F4/80 and MOMA-1. Sections were then rinsed, mounted onto gelatin-coated slides and images were obtained using a Nikon Eclipse 80i microscope.

**Phosphatase assay.** We assessed SHP-1 phosphatase activity by using the RediPlate™ 96 EnzChek® Tyrosine Phosphatase Assay kit (Molecular Probes). We immunoprecipitated SHP-1 from tissue lysates with a polyclonal antibody prebound to protein A Sepharose beads. After a 18 h incubation, beads were washed three times with PBS containing 1% Igepal CA-630 and 5 mM DTT. Beads were placed into RediPlate™ wells and incubated 30 min at room temperature before reading for fluorescence.

**Dephosphorylation assays.** We immunoprecipitated IR, IRS-1, IRS-2, p85 PI3K and CEACAM1 from liver lysates of insulin-stimulated AdV DNSHP-1-infected mice. Beads were washed three times and resuspended in 20 µl of buffer (50 mM Hepes, 5 mM DTT). We added increasing amounts of wild-type SHP-1, PTP1B or PTP-PEST or the inactive mutated SHP-1 (C453S), PTP1B (D181A), or PTP-PEST (C231S) GST fusion proteins and the dephosphorylation reaction was allowed to occur during a 15 min incubation period (37 °C) with constant agitation (800 RPM). Increasing amounts of GST-SHP-1 proteins were found to interfere with the detection of tyrosine phosphorylated p85 on immunoblots. We therefore assessed the ability of a fixed amount of GST-SHP-1 to dephosphorylate p85 over increasing times of incubation. The reaction was stopped by the addition of Laemmli sample buffer, samples were boiled for 5 min and subjected to SDS-PAGE followed by anti-phosphotyrosine (4G10) immunoblotting.

**Data analysis.** All data are presented as mean ± SE. Effects of genotype or adenoviral DNSHP-1 or shRNA expression were compared by ANOVA analysis, followed by Fisher's protected least squares difference test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .



**Other methods.** Adenoviruses preparation, generation of CEACAM1-expressing BNL-CL2 hepatocytes, northern blot analysis, analytical methods and antibodies are described in Supplementary Methods online.

## ***Acknowledgements***

This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association (A.M.) and CIHR (A.M., K.A.S and N. B.). Part of this study was also conducted at the NIH-Yale Mouse Metabolic Phenotyping Center and supported by grants from the United States Public Health Service (U24 DK-59635 [G.I.S. and J.K.K.]) and American Diabetes Association (7-01-JF-05 [J.K.K.]). A.M. is the recipient of a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) Investigator Award. K.A.S is a CIHR Senior Scientist and a McLaughlin Centre for Molecular Medicine Scientist. M.O. is a CIHR investigator and a Burroughs Wellcome Fund Fellow. G. I. S. is an investigator of Howard Hughes Medical Institute and the recipient of a Distinguished Clinical Scientist Award from the American Diabetes Association. N. B. is a senior researcher from the « Fonds de la recherche en Santé du Québec ». M-J.D. and S.B. were supported by studentships from the « Fonds de la recherche en Santé du Québec » and the Canadian Diabetes Association. We thank B. Marcotte, S. Brûlé, P. Dallaire, N. Lefort, S. Fortier, V. Rampersad, J. Blanchette, T. Higashimori for excellent technical assistance. We also thank A. Simard and S. Rivest for their help with immunofluorescence microscopy, M. L. Tremblay (McGill Univ.) for providing wild-type and mutant forms of GST-PTP1B and GST-PTP-PEST, and A. Veillette for the anti-SHP-1 antibody.

## References

1. Goldstein, B.J. Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 2474-80 (2002).
2. Asante-Appiah, E. & Kennedy, B.P. Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E663-70 (2003).
3. Elchebly, M., Cheng, A. & Tremblay, M.L. Modulation of insulin signaling by protein tyrosine phosphatases. *J Mol Med* **78**, 473-82 (2000).
4. Zabolotny, J.M., Haj, F.G., Kim, Y.B., Kim, H.J., Shulman, G.I., Kim, J.K., Neel, B.G. & Kahn, B.B. Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J Biol Chem* **279**, 24844-51 (2004).
5. Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. & Kennedy, B.P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-8 (1999).
6. Ahmad, F. & Goldstein, B.J. Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells. *J Biol Chem* **272**, 448-57 (1997).
7. Klamon, L.D., Boss, O., Peroni, O.D., Kim, J.K., Martino, J.L., Zabolotny, J.M., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, Y.B., Sharpe, A.H., Stricker-Krongrad, A., Shulman, G.I., Neel, B.G. & Kahn, B.B. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* **20**, 5479-89 (2000).
8. Yamauchi, K., Milarski, K.L., Saitel, A.R. & Pessin, J.E. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 664-8 (1995).
9. Maegawa, H., Hasegawa, M., Sugai, S., Obata, T., Ugi, S., Morino, K., Egawa, K., Fujita, T., Sakamoto, T., Nishio, Y., Kojima, H., Haneda, M., Yasuda, H., Kikkawa, R. & Kashiwagi, A. Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J Biol Chem* **274**, 30236-43 (1999).
10. Matthews, R.J., Bowne, D.B., Flores, E. & Thomas, M.L. 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* **12**, 2396-405 (1992).
11. Plutzky, J., Neel, B.G. & Rosenberg, R.D. Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1123-7 (1992).
12. Shen, S.H., Bastien, L., Posner, B.I. & Chretien, P. A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* **352**, 736-9 (1991).
13. Yi, T.L., Cleveland, J.L. & Ihle, J.N. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol* **12**, 836-46 (1992).
14. Chen, H.E., Chang, S., Trub, T. & Neel, B.G. Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* **16**, 3685-97 (1996).

15. Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. & Lodish, H.F. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729-38 (1995).
16. Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitonov, A., Imyanov, E., Ullrich, A. & Bohmer, F.D. Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. *J Biol Chem* **270**, 21277-84 (1995).
17. Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C. & Kasuga, M. Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem* **269**, 12220-8 (1994).
18. Bousquet, C., Delesque, N., Lopez, F., Saint-Laurent, N., Esteve, J.P., Bedecs, K., Buscail, L., Vaysse, N. & Susini, C. sst2 somatostatin receptor mediates negative regulation of insulin receptor signaling through the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* **273**, 7099-106 (1998).
19. Imani, F., Rager, K.J., Catipovic, B. & Marsh, D.G. Interleukin-4 (IL-4) induces phosphatidylinositol 3-kinase (p85) dephosphorylation. Implications for the role of SHP-1 in the IL-4-induced signals in human B cells. *J Biol Chem* **272**, 7927-31 (1997).
20. Yu, Z., Su, L., Hoglinger, O., Jaramillo, M.L., Banville, D. & Shen, S.H. SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **273**, 3687-94 (1998).
21. Cuevas, B., Lu, Y., Watt, S., Kumar, R., Zhang, J., Siminovitch, K.A. & Mills, G.B. SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J Biol Chem* **274**, 27583-9 (1999).
22. Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E. & Veillette, A. Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* **14**, 783-90 (1997).
23. Boulton, I.C. & Gray-Owen, S.D. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol* **3**, 229-36 (2002).
24. Nakajima, A., Iijima, H., Neurath, M.F., Nagaishi, T., Nieuwenhuis, E.E., Raychowdhury, R., Glickman, J., Blau, D.M., Russell, S., Holmes, K.V. & Blumberg, R.S. Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J Immunol* **168**, 1028-35 (2002).
25. Formisano, P., Najjar, S.M., Gross, C.N., Philippe, N., Oriente, F., Kern-Buell, C.L., Accili, D. & Gorden, P. Receptor-mediated internalization of insulin. Potential role of pp120/HA4, a substrate of the insulin receptor kinase. *J Biol Chem* **270**, 24073-7 (1995).
26. Li Calzi, S., Choice, C.V. & Najjar, S.M. Differential effect of pp120 on insulin endocytosis by two variant insulin receptor isoforms. *Am J Physiol* **273**, E801-8 (1997).
27. Najjar, S.M., Choice, C.V., Soni, P., Whitman, C.M. & Poy, M.N. Effect of pp120 on receptor-mediated insulin endocytosis is regulated by the juxtamembrane domain of the insulin receptor. *J Biol Chem* **273**, 12923-8 (1998).
28. Choice, C.V., Howard, M.J., Poy, M.N., Hankin, M.H. & Najjar, S.M. Insulin stimulates pp120 endocytosis in cells co-expressing insulin receptors. *J Biol Chem* **273**, 22194-200 (1998).
29. Poy, M.N., Yang, Y., Rezaei, K., Fernstrom, M.A., Lee, A.D., Kido, Y., Erickson, S.K. & Najjar, S.M. CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat Genet* **30**, 270-6 (2002).

30. Tsui, H.W., Siminovitch, K.A., de Souza, L. & Tsui, F.W. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* **4**, 124-9 (1993).
31. Norris, K., Norris, F., Kono, D.H., Vestergaard, H., Pedersen, O., Theofilopoulos, A.N. & Moller, N.P. Expression of protein-tyrosine phosphatases in the major insulin target tissues. *FEBS Lett* **415**, 243-8 (1997).
32. Forget, G., Siminovitch, K.A., Brochu, S., Rivest, S., Radzioch, D. & Olivier, M. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *Eur J Immunol* **31**, 3185-96 (2001).
33. Tenev, T., Bohmer, S.A., Kaufmann, R., Frese, S., Bittorf, T., Beckers, T. & Bohmer, F.D. Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. *Eur J Cell Biol* **79**, 261-71 (2000).
34. Duchesne, C., Charland, S., Asselin, C., Nahmias, C. & Rivard, N. Negative regulation of beta-catenin signaling by tyrosine phosphatase SHP-1 in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **278**, 14274-83 (2003).
35. Furnari, F.B., Huang, H.J. & Cavenee, W.K. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res* **58**, 5002-8 (1998).
36. Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P. & Tonks, N.K. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13513-8 (1998).
37. Zhang, J., Somani, A.K. & Siminovitch, K.A. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol* **12**, 361-78 (2000).
38. Dustin, L.B., Plas, D.R., Wong, J., Hu, Y.T., Soto, C., Chan, A.C. & Thomas, M.L. Expression of dominant-negative src-homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase-1 results in increased Syk tyrosine kinase activity and B cell activation. *J Immunol* **162**, 2717-24 (1999).
39. Levy, J.R. & Olefsky, J.M. The trafficking and processing of insulin and insulin receptors in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology* **121**, 2075-86 (1987).
40. Hayashi, H., Miyake, N., Kanai, F., Shibasaki, F., Takenawa, T. & Ebina, Y. Phosphorylation in vitro of the 85 kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and its possible activation by insulin receptor tyrosine kinase. *Biochem J* **280** ( Pt 3), 769-75 (1991).
41. Hayashi, H., Kamohara, S., Nishioka, Y., Kanai, F., Miyake, N., Fukui, Y., Shibasaki, F., Takenawa, T. & Ebina, Y. Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the alpha-type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo. *J Biol Chem* **267**, 22575-80 (1992).
42. Cuevas, B.D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K. & Mills, G.B. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**, 27455-61 (2001).
43. Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A. & Backer, J.M. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **18**, 1379-87. (1998).
44. Ueki, K., Algenstaedt, P., Mauvais-Jarvis, F. & Kahn, C.R. Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* **20**, 8035-46. (2000).
45. Lu, Y., Yu, Q., Liu, J.H., Zhang, J., Wang, H., Koul, D., McMurray, J.S., Fang, X., Yung, W.K., Siminovitch, K.A. & Mills, G.B. Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J Biol Chem* **278**, 40057-66 (2003).

46. Shayakhmetov, D.M., Li, Z.Y., Ni, S. & Lieber, A. Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J Virol* **78**, 5368-81 (2004).
47. Dai, T., Abou-Rjaily, G.A., Al-Share, Q.Y., Yang, Y., Fernstrom, M.A., Deangelis, A.M., Lee, A.D., Sweetman, L., Amato, A., Pasquali, M., Lopaschuk, G.D., Erickson, S.K. & Najjar, S.M. Interaction between altered insulin and lipid metabolism in CEACAM1-inactive transgenic mice. *J Biol Chem* **279**, 45155-61 (2004).
48. Najjar, S.M., Yang, Y., Fernstrom, M.A., Lee, S.J., Deangelis, A.M., Rjaily, G.A., Al-Share, Q.Y., Dai, T., Miller, T.A., Ratnam, S., Ruch, R.J., Smith, S., Lin, S.H., Beauchemin, N. & Oyarce, A.M. Insulin acutely decreases hepatic fatty acid synthase activity. *Cell Metab* **2**, 43-53 (2005).
49. Kim, H.J., Higashimori, T., Park, S.Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y.J., Noh, H.L., Cho, Y.R., Cline, G., Kim, Y.B. & Kim, J.K. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* **53**, 1060-7 (2004).
50. Perreault, M. & Marette, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* **7**, 1138-43. (2001).

## Figures

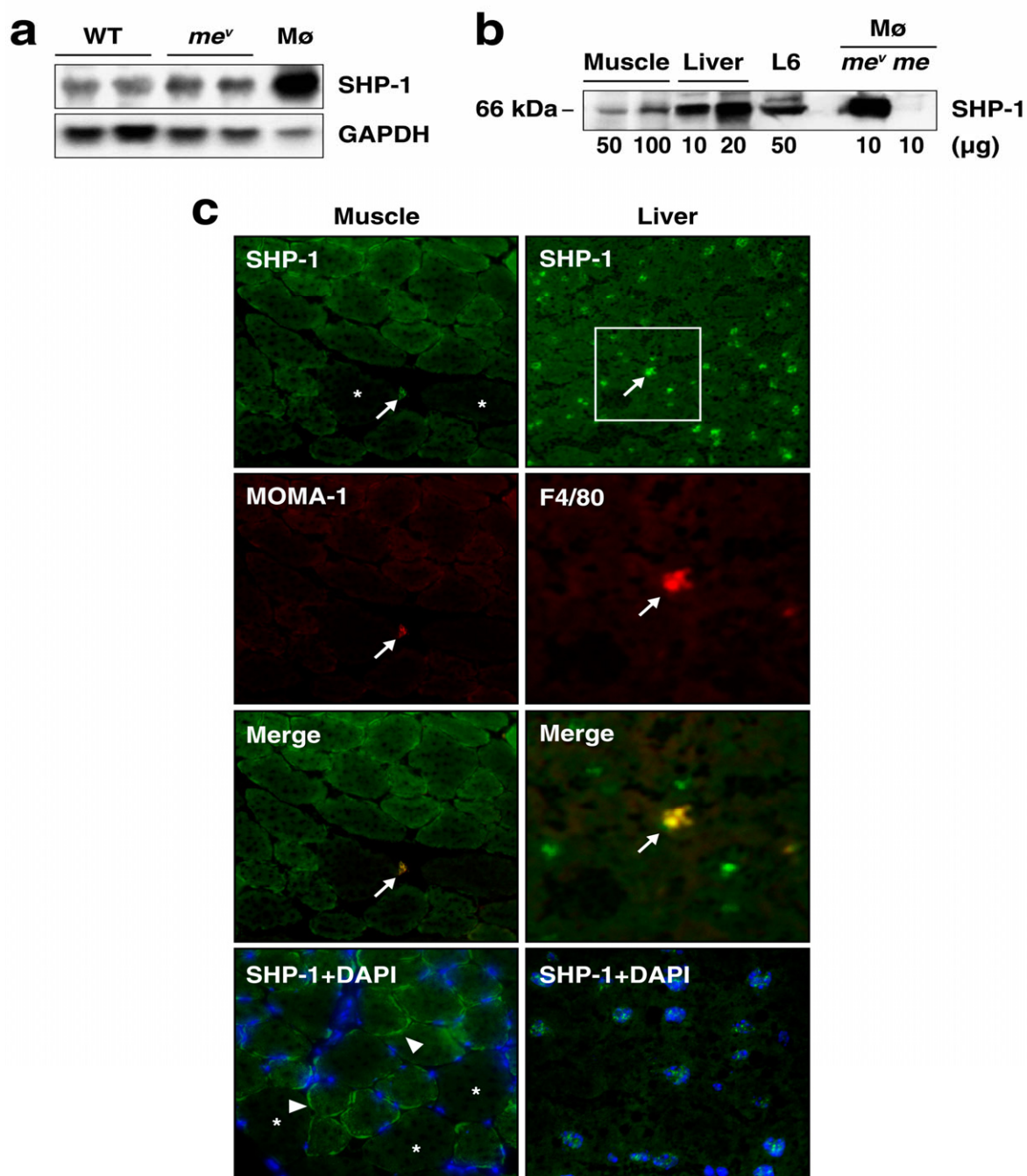


Figure 1

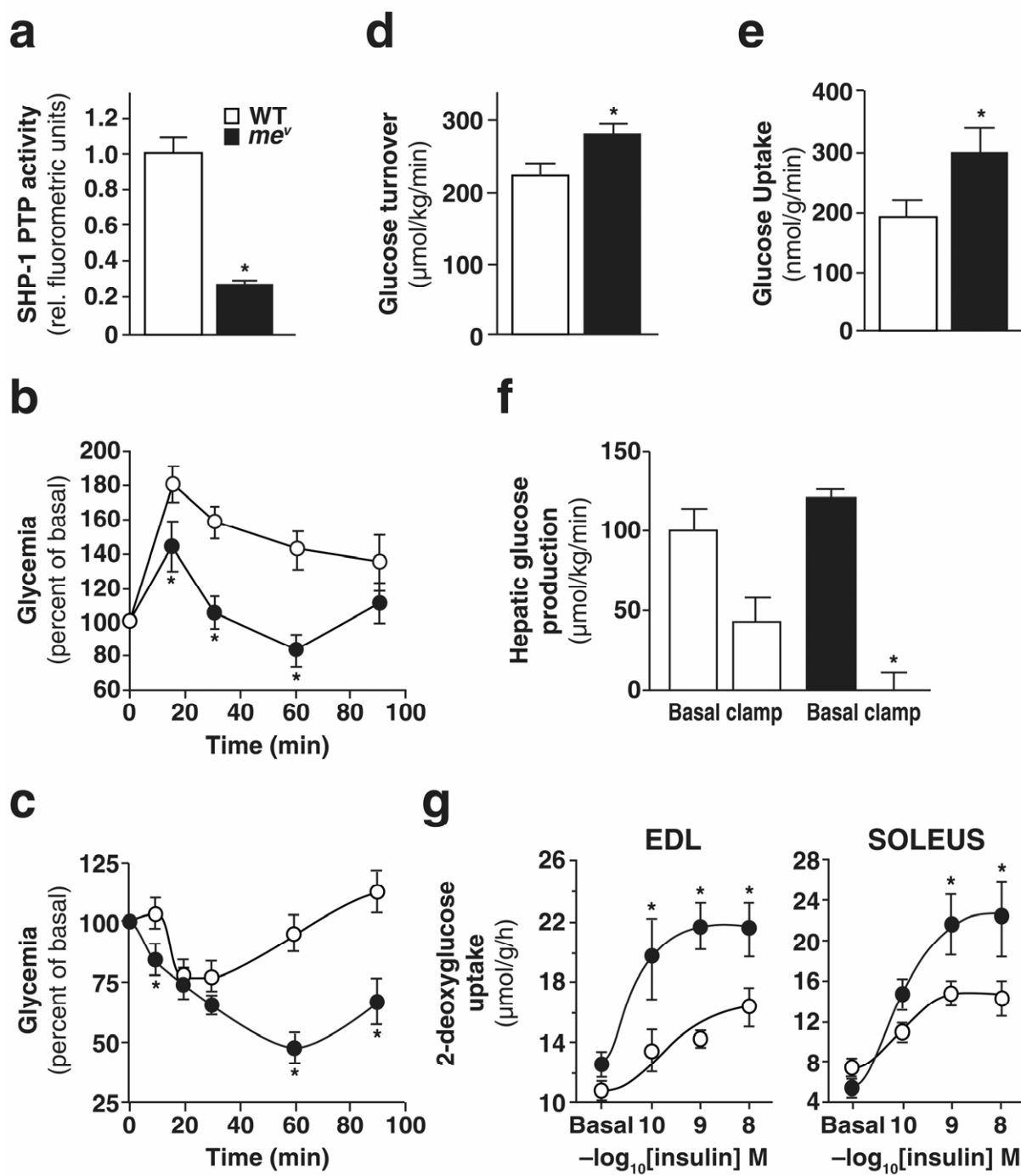


Figure 2

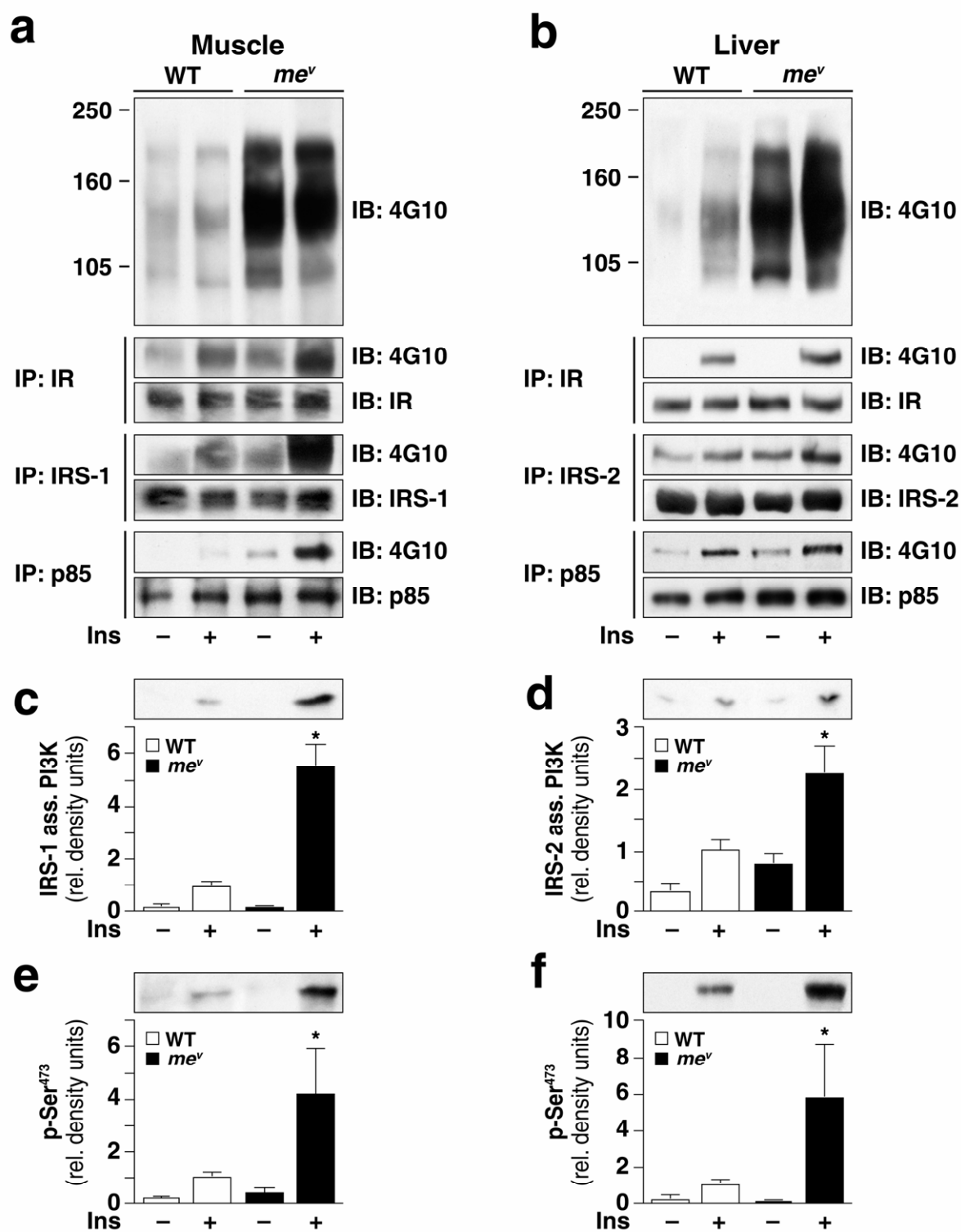


Figure 3



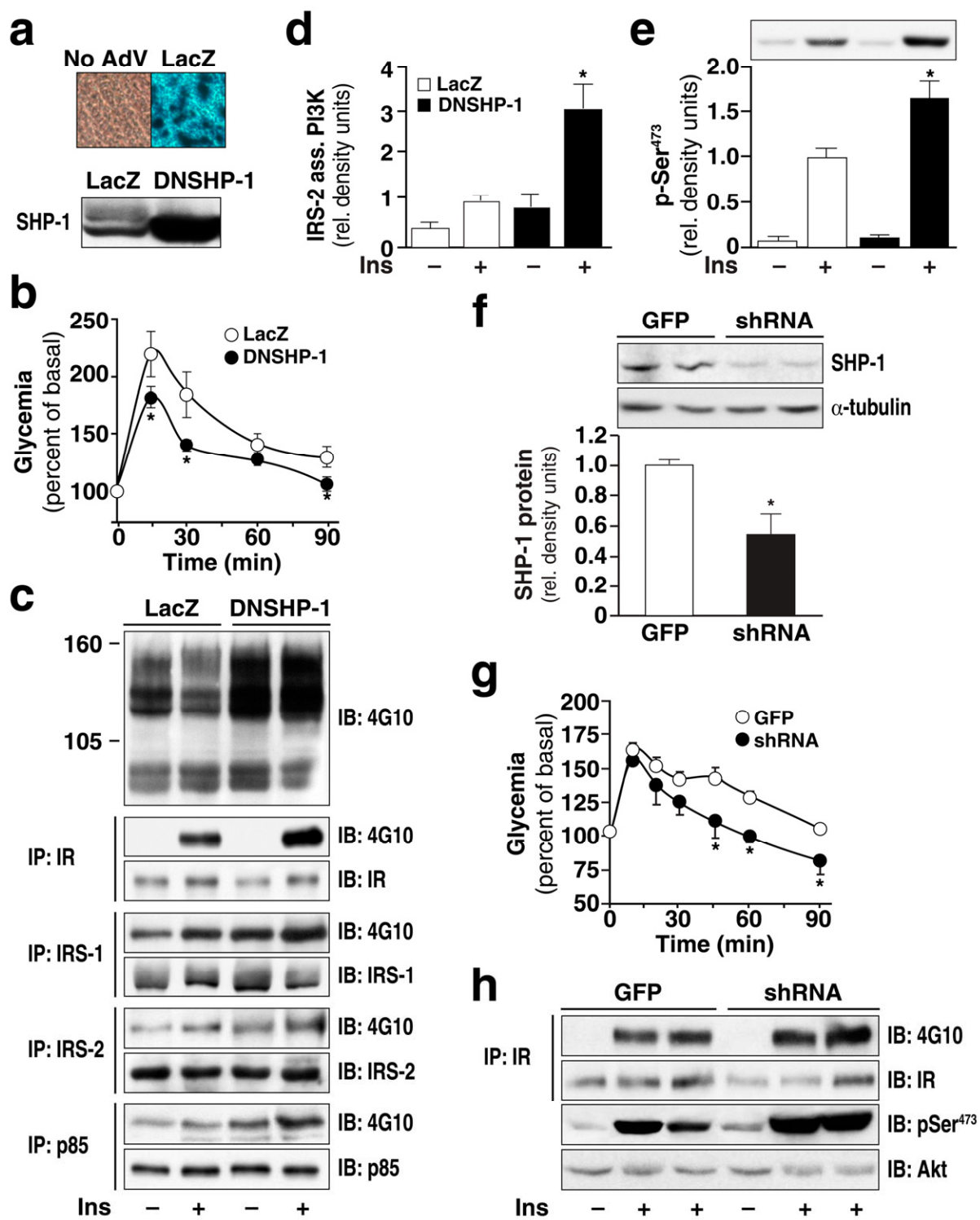


Figure 4

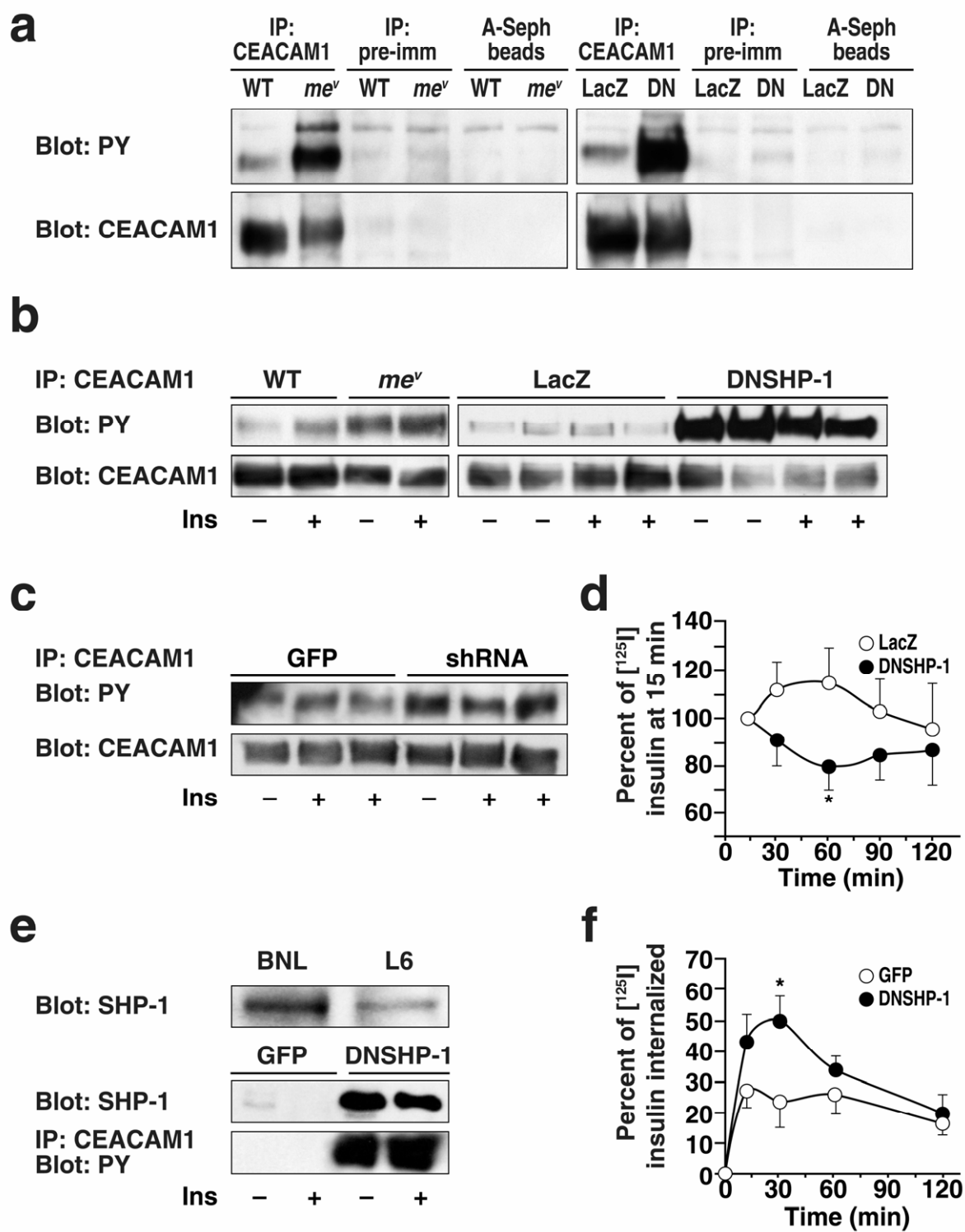


Figure 5

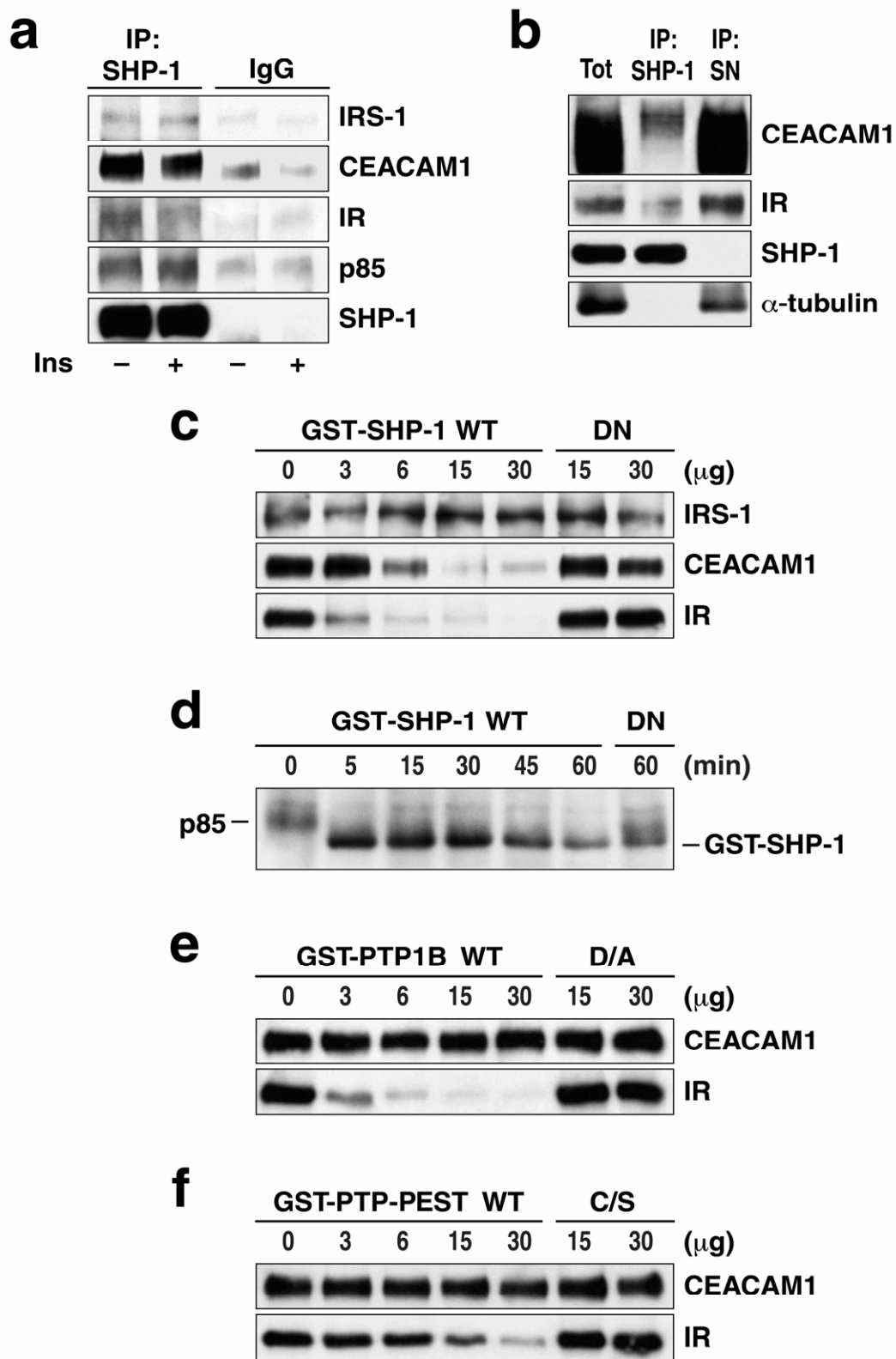


Figure 6

## Legends to figures

**Figure 1** SHP-1 is expressed in skeletal muscle and liver. (a) Northern blot analysis of SHP-1 expression in hindlimb skeletal muscles of 6–9 weeks old wild-type and *me<sup>v</sup>* mice. Equivalent amounts of RNA (10  $\mu$ g) isolated from bone-marrow-derived macrophage (M $\emptyset$ ) of *me<sup>v</sup>* mice were loaded as a positive control. The blot was reprobed with a GAPDH probe for loading comparison. (b) Immunoblot analysis of SHP-1 in extracts from skeletal muscle and liver of wild-type mice, and rat L6 skeletal muscle cells. Extracts from bone-marrow-derived macrophages lines (M $\emptyset$ ) from *me<sup>v</sup>* and *me* mice were used as positive and negative controls, respectively. The amount of loaded proteins is indicated below the representative gel. (c) SHP-1 immunoreactivity in muscle and liver sections. Acetone-fixed sections of tibialis anterior muscle (left panels) and liver (right panels) of wild-type mice were stained with antibodies to SHP-1, the macrophage and Kupffer cell markers MOMA-1 or F4/80, and DAPI. In muscle sections, SHP-1 was localized to both myocytes and macrophages (see Merge panel). In muscle cells, SHP-1 labeling was dispersed in the cytoplasm and enriched in subsarcolemmal compartments (arrowheads). In liver sections, SHP-1 immunoreactivity was found both in hepatocytes and Kupffer cells (see Merge panel). In hepatocytes, SHP-1 immunoreactivity was dispersed in the cytoplasm and strongly associated with the nuclear region as revealed by colocalization of SHP-1 and DAPI staining. Images shown are representative of three independent experiments.

**Figure 2** Metabolic phenotyping of wild-type and SHP-1-deficient *me<sup>v</sup>* mice. (a) SHP-1 tyrosine phosphatase activity in liver extracts from wild-type (WT) and SHP-1-deficient *me<sup>v</sup>* mice. Blood glucose excursions after intraperitoneal glucose (b) and insulin (c) tolerance tests ( $n = 8–10$ ), (d) insulin-stimulated whole-body glucose turnover during hyperinsulinemic-euglycemic clamps, (e) insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle (gastrocnemius) during clamps, (f) insulin-mediated suppression of hepatic glucose production during clamps in WT and *me<sup>v</sup>* mice ( $n = 7–12$ ), (g) *Ex vivo* glucose uptake in EDL and soleus muscles isolated from WT and SHP-1-deficient *me<sup>v</sup>* mice ( $n = 4–6$ ). Open symbols = WT animals, filled symbols = *me<sup>v</sup>* mice. Data are mean  $\pm$  SE \*,  $P < 0.05$  vs WT values.

**Figure 3** Insulin signaling to PI3K/Akt in muscle and liver of WT and *me<sup>v</sup>* mice. Homogenates were prepared from muscle and liver of WT and *me<sup>v</sup>* mice acutely injected with insulin (+) or saline (-). Upper gels show detection of tyrosine phosphorylated proteins in muscle (a) and liver (b) total extracts from WT and *me<sup>v</sup>* mice after immunoblotting with 4G10 anti-phosphotyrosine antibody. IR, IRS-1/2, and the p85 subunit of PI3K were immunoprecipitated (IP) from tissue extracts and immunoblotted (IB) with corresponding antibodies or 4G10 to assess phosphotyrosine content. Insulin-induced PI3K activity and Akt Ser473 phosphorylation were measured in muscle (c,e) and liver (d,f) of WT (open bars) and *me<sup>v</sup>* (filled bars) mice acutely injected with insulin (+) or saline (-) as described in Methods. Immunoblots in (a) and (b) are representative of at least three independent experiments (quantified in **Supplementary Table 2** online). PI3K activity (c,d) and Akt phosphorylation (e,f) are from 4–5 independent experiments. Data are mean  $\pm$  SE \*,  $P < 0.05$  vs corresponding WT values.

**Figure 4** Effects of liver-specific DNSHP-1 overexpression and knockdown of SHP-1 by shRNA-mediated gene silencing on glucose metabolism and insulin signaling. Mice were injected with adenoviruses (AdV) encoding  $\beta$ -galactosidase (LacZ), dominant-negative SHP-1 (DNSHP-1), GFP or shRNA-SHP-1. (a) Analysis of AdV-infected mouse liver for  $\beta$ -gal (X-gal histochemical staining) and SHP-1 expression. Control liver did not stain with X-gal (left panel), whereas  $\beta$ -gal expression was shown in LacZ-infected mice (right panel). Immunoblot analysis of SHP-1 content in liver extracts from LacZ and DNSHP-1-injected mice is shown below. (b) Glucose tolerance of LacZ (open circles) and DNSHP-1 (filled circles) expressing mice. (c) Tyrosine phosphorylation and expression of insulin signaling components in liver of LacZ- or DNSHP-1-expressing mice after acute insulin (+) or saline (-) injection. Insulin-induced IRS-2-associated PI3K activity (d) and Akt phosphorylation (e) measured in LacZ- (open bars) and DNSHP-1-infected (filled bars) mice. (f) Analysis of shRNA-SHP-1-transduced mouse liver for SHP-1 and  $\alpha$ -tubulin expression. (g) Glucose tolerance of mice after AdV-mediated liver expression of GFP (open circles) or shRNA-SHP-1 (filled circles). (h) Basal (-) and insulin-induced (+) phosphorylation and expression of the insulin receptor and Akt in liver of mice transduced with GFP or shRNA-SHP-1. Insulin receptor was immunoprecipitated before determination of tyrosine phosphorylation (4G10) or expression. Akt phosphorylation on Ser473 and protein levels were determined in liver lysates. Immunoblots in a, c, e, f and h are representative of

at least 3–5 animals per experimental group. Data in **b**, **d**, **e**, **f** and **g** are mean  $\pm$  SE from at least 4–6 mice. \*,  $P < 0.05$  vs LacZ or GFP values.

**Figure 5** SHP-1 regulates CEACAM1 phosphorylation in liver and modulates hepatic insulin clearance. (a–c) Tyrosine phosphorylation and expression of CEACAM1 after immunoprecipitation from liver extracts of WT and *me<sup>v</sup>* mice (a, b left panels), LacZ and DNSHP-1-transduced mice (a, b right panels) and GFP and shRNA-SHP-1 expressing mice (c). Specificity of CEACAM1 antibody was demonstrated by control experiments using pre-immune serum or beads alone (a). (d) [<sup>125</sup>I]insulin clearance in LacZ- (open circles) or DNSHP-1-infected (filled circles) mice. Results are expressed as % of [<sup>125</sup>I]insulin at 15 min. (e,f) BNL-CL2 mouse embryonic hepatocytes stably expressing CEACAM1 were infected with either GFP or DNSHP-1-encoding AdVs for 24 h. Cells were either used for western blotting (e) or measurement of [<sup>125</sup>I]insulin internalization (f). (e) Upper blot compares expression of SHP-1 protein in BNL-CL2 hepatic cells expressing CEACAM1 vs L6 muscle cells (80  $\mu$ g of protein extracts). Lower blots show the expression of DNSHP-1 (30  $\mu$ g of protein extracts) and its impact on CEACAM1 phosphorylation after AdV infection in BNL-CL2 cells. In some experiments, cells were stimulated for 10 min with insulin (+) before being analysed. (f) [<sup>125</sup>I]insulin internalization in cells infected with either GFP or DNSHP-1. Internalized radioactivity is expressed as % of pre-bound [<sup>125</sup>I]insulin internalized at each time point. Data in (f) are mean  $\pm$  SE of seven independent experiments with GFP- or DNSHP-1-infected cells. \*,  $P < 0.05$  vs GFP values.

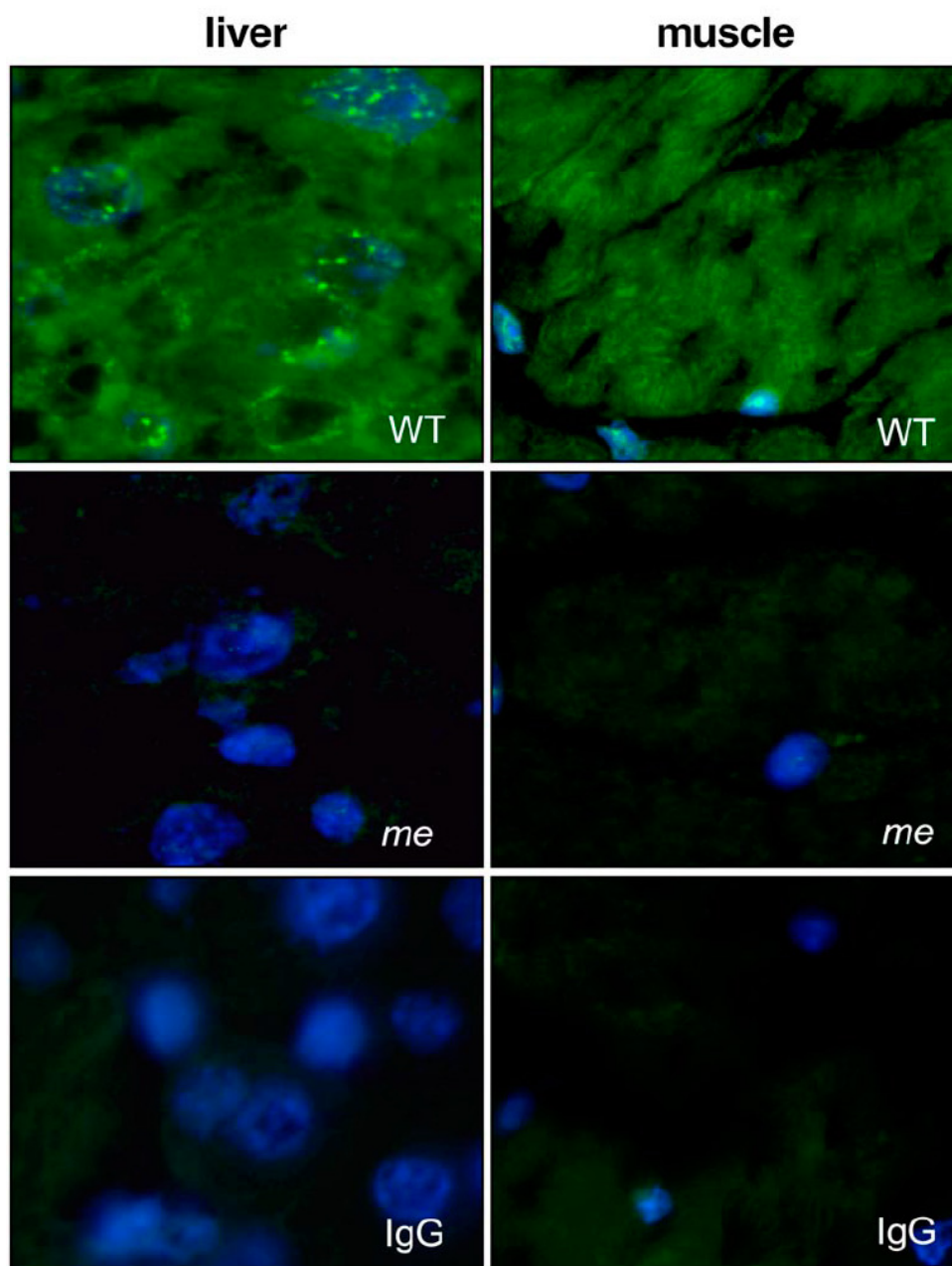
**Figure 6** SHP-1 binds to and dephosphorylates the insulin receptor, CEACAM1 and p85-PI3K in mouse liver. (a) SHP-1 co-immunoprecipitates with CEACAM1, IR and p85, but not IRS-1. SHP-1 was immunoprecipitated (IP) using SHP-1-specific antibody or control IgG from 500  $\mu$ g of liver lysates isolated from saline (–) or insulin (+) injected DNSHP-1-transduced mice. IPs were analysed for IRS-1, CEACAM1, insulin receptor (IR), p85-PI3K or SHP-1 contents by immunoblotting (IB). (b) Depletion of SHP-1 from 250  $\mu$ g of liver lysates reveals partial association with CEACAM1, IR but not  $\alpha$ -tubulin. Tot lane shows total amounts of CEACAM1, IR, SHP-1 and  $\alpha$ -tubulin IP from 250  $\mu$ g of liver extracts from insulin-injected mice. IP:SHP-1 lane shows co-immunoprecipitation of IR, CEACAM1 and  $\alpha$ -tubulin with SHP-1 from the same amount of liver lysates. IP:SN lane shows amounts of CEACAM1, IR, SHP-1 and  $\alpha$ -tubulin recovered in the supernatant after SHP-1 IP. (c)

IRS-1, CEACAM1 or IR were IP from liver of insulin-injected DNSHP-1-infected mice and subjected to a tyrosine dephosphorylation assay with WT or DNSHP-1 GST fusion proteins as described in Methods. After the dephosphorylation reaction, samples were analysed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine (4G10) antibody. (d) p85-PI3K was IP as in (c) and subjected to a tyrosine dephosphorylation assay with 10  $\mu$ g of either WT or DNSHP-1 GST fusion proteins for the indicated times. After the dephosphorylation reaction, samples were analysed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine (4G10) antibody. (e,f) CEACAM1 or IR were IP from liver of insulin-injected DNSHP-1-infected mice and subjected to a tyrosine dephosphorylation assay with WT or mutant PTP1B or PTP-PEST GST fusion proteins exactly as described in (c). Blots are representative of at least three different experiments with livers of three DNSHP-1-infected animals.

## ***Supplementary information***



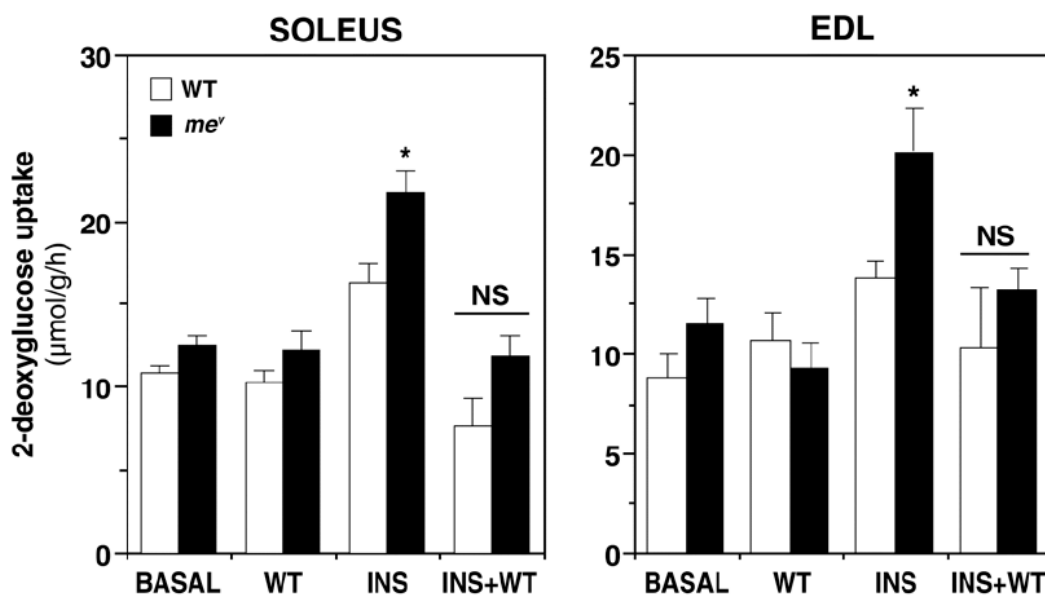
## Supplementary Figure 1



**SHP-1 immunoreactivity in liver and skeletal muscle of wild-type (WT) and motheaten (*me*) mice.** Liver and muscle tissues from 4-week old mice were processed for immunofluorescence microscopy using a polyclonal SHP-1 antibody. Some sections were incubated with secondary antibody alone (IgG). Sections were then rinsed, mounted onto gelatin-coated slides and images were obtained using a Nikon Eclipse 80i microscope with 60X objectives. SHP-1 immunoreactivity was negligible in tissues of SHP-1 null *me* mice.

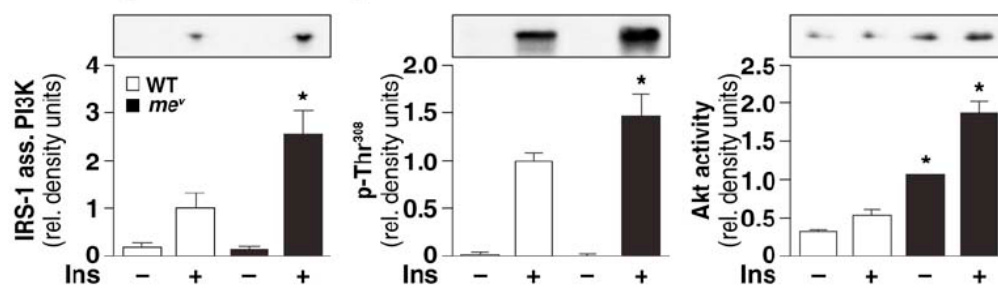
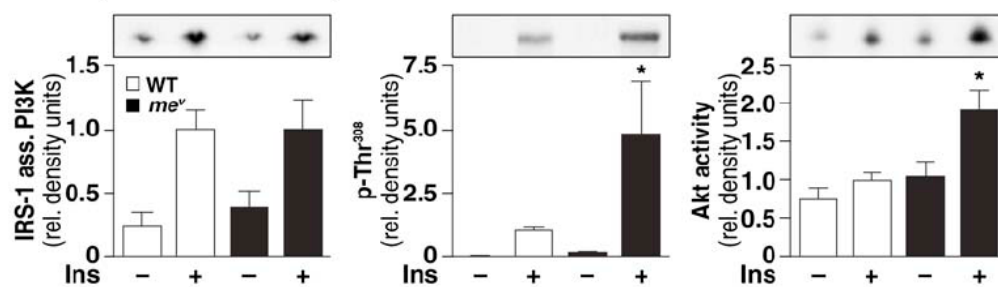
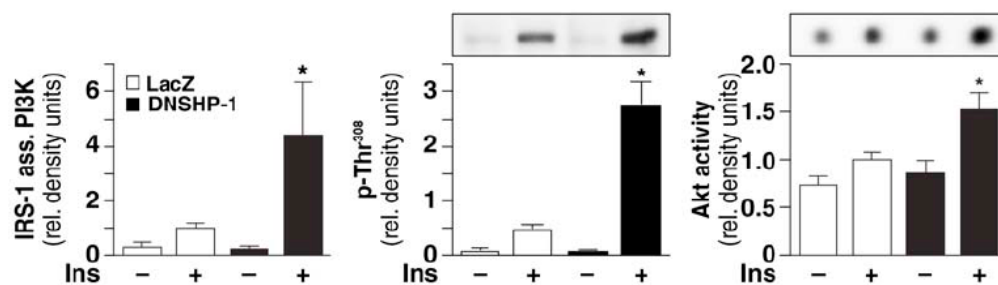
Supplementary figure 1

## Supplementary Figure 2



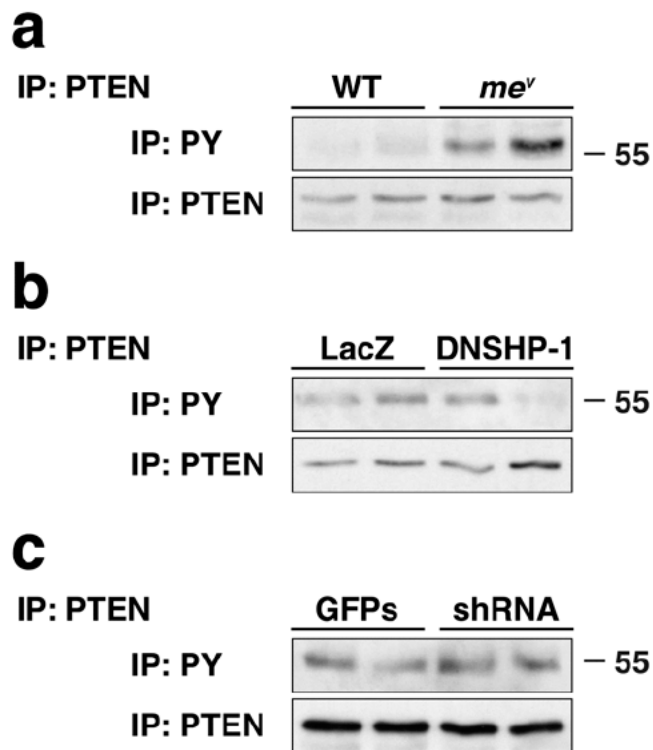
**Effect of wortmannin on 2-DG uptake by soleus and EDL muscles of wild-type (WT) and SHP-1-deficient *me<sup>v</sup>* mice.** Muscles were incubated with or without 100 nM wortmannin or vehicle (DMSO) for 20 min before addition of insulin (10 nM) for 30 min. 2-[<sup>3</sup>H]-deoxyglucose uptake was measured as described in Methods. Insulin-induced glucose uptake was greater ( $P < 0.05$ ) in muscles not pre-incubated with wortmannin but not (NS) in muscles pre-incubated with the PI3K inhibitor.

## Supplementary Figure 3

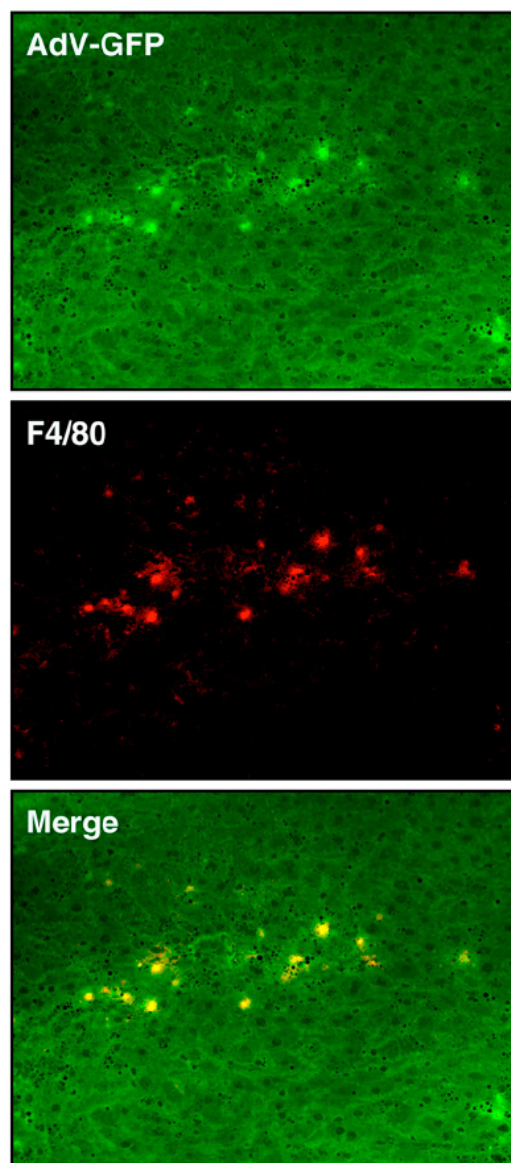
**a** Muscle (WT and *me<sup>v</sup>* mice)**b** Liver (WT and *me<sup>v</sup>* mice)**c** Liver (LacZ and DNSHP-1 mice)

**Insulin signaling in muscle and liver of WT and *me<sup>v</sup>* or LacZ and DNSHP-1 mice.** Animals were injected with insulin (+) or saline (-). Insulin-induced IRS-1 and IRS-2 associated PI3-kinase activity, AktThr<sup>308</sup> phosphorylation, and Akt kinase activity were measured as described. Open bars = WT (a,b) or LacZ (c), filled bars = *me<sup>v</sup>* (a,b) or DNSHP-1 (c). Data are mean  $\pm$  SE of 4–5 independent determinations. \*,  $P < 0.05$  vs WT or LacZ values.

## Supplementary Figure 4



**PTEN tyrosine phosphorylation in liver of animal models of SHP-1 deficiency.** PTEN was immunoprecipitated using a polyclonal antibody (Santa Cruz) from liver lysates of (a) wild-type (WT) and *me<sup>v</sup>* mice, mice transduced with (b) LacZ or DNSHP-1, or (c) GFP or shRNASHP-1. Immunoblotting was then carried out using either PTEN antibody or 4G10 anti-phosphotyrosine antibody. Results are representative of at least three mice per experimental group.

**Supplementary Figure 5**

***In vivo* transduction of liver after systemic delivery of AdV GFP.** 72 h after intravenous AdV injection, livers were recovered and serial sections of acetone-fixed tissues were prepared. Green fluorescence from AdV-GFP expression is shown in the upper panel. To visualize Kupffer cells, fixed liver sections were stained with anti-F4/80 antibody (red, middle panel). Images of representative fields were taken and then were superimposed to reveal the association of GFP with Kupffer cells (yellow, bottom panel). Magnification, x40.

### Supplementary Table 1

Physiological parameters of wild-type (WT) and SHP-1-deficient ( <i>me<sup>v</sup></i> ) mice		
	WT	<i>me<sup>v</sup></i>
Body weight (g)	21.25 ± 0.68	11.67 ± 1.09 *
Body fat mass (g) **	2.26 ± 0.24	1.09 ± 0.07 *
Triglycerides (mM)	0.77 ± 0.06	0.48 ± 0.06 *
Glycemia (mM)	7.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2 *
Insulinemia (pM)	50 ± 7	46 ± 10
<b>Clamp period</b>		
Glycemia (mM)	6.0 ± 0.4	6.2 ± 0.4
Insulinemia (pM)	445 ± 68	435 ± 84

\*\* Lean body mass was also reduced in *me<sup>v</sup>* mice, but proportional to the diminished body weight

Data are mean ± SE of at least 7-12 mice. \*  $P < 0.05$  vs WT values

## Supplementary Table 2

Quantification of changes in insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin signaling proteins in tissues of <i>mev</i> and DNSHP-1 mice			
Protein	<i>me<sup>v</sup></i> (fold-over WT)		DNSHP-1 (fold-over LacZ)
	Muscle	Liver	Liver
IR	4.5 ± 1.1*	1.7 ± 0.2*	3.9 ± 0.9*
IRS-1	3.0 ± 0.3*	1.4 ± 0.7	3.2 ± 0.9*
IRS-2	nd	2.0 ± 0.2*	2.1 ± 0.4*
p85	2.8 ± 0.4*	1.8 ± 0.4*	3.3 ± 0.1*

Results are expressed as fold-changes in insulin-induced tyrosine phosphorylation of the proteins relative to insulin-stimulated values in WT or LacZ-transduced mice performed on the same experiment. Data are mean ± SE of at least three independent experiments using tissues from 2-4 mice for each group. nd: not determined \*  $P < 0.05$  vs WT or LacZ controls.

## Supplementary methods

### Adenoviruses preparation

Dominant negative SHP-1 (DNSHP-1, C453S mutation) cDNA was subcloned into pShuttle-CMV vector. Control vector encoding LacZ (pShuttle-CMV-lacZ) was supplied by Stratagene. For generation of adenoviral shRNA construct, H1 promoter followed by the shRNA sequence (with the 19-nt complementary antiparallel oligonucleotides underlined) 5'-ACGCGTCGAAACTGGAGATCA-TACAATTCAAGAGATTGTATGATCTCCAGTTTCTTTTTTCCAACTCGAG-3' was inserted into pAdTrack vector by Genscript Corporation. Viral stocks were amplified into HEK293 cells cultured in D-MEM high-glucose, supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic/antimycotic, and maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. AdV were purified by a double round of CsCl ultracentrifugation and desalted with NAP<sup>TM</sup> 10 columns (Amersham Biosciences).

### Generation of CEACAM1-expressing BNL-CL2 hepatocytes

We used BNL-CL2 mouse embryonic hepatocytes (from ATCC) to stably express CEACAM1. The CEACAM1-L cDNA was cloned into the pLXSN vector<sup>1</sup> and transfected in psi2 packaging cells by calcium phosphate co-precipitation. Introduction of the CEACAM1-L cDNA in BNL-CL2 cells was accomplished by retroviral-mediated infections<sup>1</sup>. G418 selection was applied on cell populations 48 h post-infection. CEACAM1-expressing cell populations were immunoselected using a anti-CEACAM1 rabbit polyclonal antibody and Dynabeads (Dyna). FACS and western analyses were carried out to confirm the expression of CEACAM1 in the immunoselected populations.

### Northern blot analysis

We prepared total RNA from hindlimb skeletal muscles, rapidly harvested from anesthetized mice, using Trizol reagent (Gibco BRL). 10 µg of RNA were electrophoresed over 1% agarose gel, transferred onto Hybond-N filters, hybridized with a random primer-labeled SHP-1 cDNA probe and then visualized by autoradiography. We used a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA probe kindly provided by Dr. D. Radzioch (McGill University, Montreal, Canada) as a loading control.



### Analytical methods

We measured plasma glucose levels by the glucose oxidase method (kit from Sigma), plasma insulin and C-peptide levels by RIA (kits from Linco), triglycerides levels by an enzymatic method (kit from Roche Diagnostics) and IL-6 levels by ELISA (kit from BD Biosciences).

### Antibodies

Polyclonal antibodies to insulin receptor  $\beta$ -subunit and p85 PI 3-kinase, and monoclonal SHP-1-specific antibody were obtained from BD Biosciences. Monoclonal antiphosphotyrosine antibodies was purchased from Upstate Biotechnology and New England Biolabs. Polyclonal antibodies against SHP-1, Akt-1/2, IRS-1, IRS-2 and PTEN were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Phosphospecific antibodies against Ser473-Akt and Thr308-Akt were from New England Biolabs. CEACAM1 polyclonal antibody was previously described<sup>2</sup>. Polyclonal antibody against SHP-1 used for immunocytochemistry was a kind gift of Dr. A. Veillette, Institut de Recherche Cliniques de Montréal, Canada, and Dr. N. Rivard, University of Sherbrooke, Canada. Monoclonal antibodies to detect macrophages<sup>3</sup> and Kupffer cells<sup>4</sup> were purchased from Serotec (F4/80) and Cedarlane (MOMA-1, CL89149). Secondary goat anti-rabbit Alexa Fluor® 488 antibody (green) was from Molecular Probes, rat anti-mouse biotin-linked antibody from Amersham and CY3-coupled streptavidin (red) from Sigma-Aldrich.

### References for supplementary methods

1. Kunath, T., Ordonez-Garcia, C., Turbide, C. & Beauchemin, N. Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* **11**, 2375-82 (1995).
2. Izzi, L., Turbide, C., Houde, C., Kunath, T. & Beauchemin, N. cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* **18**, 5563-72 (1999).
3. Shayakhmetov, D.M., Li, Z.Y., Ni, S. & Lieber, A. Analysis of adenovirus sequestration in the liver, transduction of hepatic cells, and innate toxicity after injection of fiber-modified vectors. *J Virol* **78**, 5368-81 (2004).
4. Leenen, P.J., de Bruijn, M.F., Voerman, J.S., Campbell, P.A. & van Ewijk, W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **174**, 5-19 (1994).

## Chapitre II

SHP-1 RÉGULE LA SIGNALISATION DE L'INSULINE ET LA  
GLYCOGÈNE SYNTHASE DANS LES HÉPATOCTES FAO

## **Résumé**

Nous avons récemment rapporté que la PTP SHP-1 module négativement l'action de l'insuline sur la production hépatique de glucose. Cependant, il est toujours incertain si SHP-1 exerce cette régulation en modulant l'entreposage du glycogène et/ou la production de glucose. Ici, nous avons utilisé le transfert de gène par adénovirus pour exprimer un mutant catalytiquement inerte (DNSHP-1) dans les hépatocytes Fao pour clarifier le rôle de SHP-1 dans le foie. L'expression de DNSHP-1 augmente la phosphorylation d'Akt stimulée par l'insuline comparativement aux cellules infectées avec l'adénovirus contrôle. Cet effet est associé à une diminution de la phosphorylation et une augmentation de l'activation de la glycogène synthase (GS). Par contre, l'expression de DNSHP-1 n'est pas apte à améliorer l'habileté de l'insuline à diminuer l'expression des ARNm de PEPCK et G6Pase. Le manque d'effet sur la gluconéogenèse a été confirmé par la mesure de la production de glucose *in vitro*. Nos résultats indiquent que SHP-1 est un modulateur négatif de l'activité de GS, ce qui représente un mécanisme cellulaire indépendant par lequel la PTP réduit l'action de l'insuline sur la libération de glucose hépatique.

**SHP-1 negatively modulates insulin signaling and glycogen synthase in Fao hepatoma cells**

Sébastien Bergeron and André Marette\*

*Department of Anatomy-Physiology and Lipid Research Unit, Laval University Hospital Research Center, Québec, Canada.*

Running title: SHP-1 modulates glycogen synthase

\*Address correspondence to: Dr. André Marette

Lipid Research Unit  
Laval University Hospital Research Center  
2705, Laurier Blvd  
Ste-Foy, (Québec), Canada, G1V 4G2  
Tel: (418) 656-4141 (47549)  
Fax: (418) 654-2176  
email: [andre.marette@crchul.ulaval.ca](mailto:andre.marette@crchul.ulaval.ca)

## ***Abstract***

We have recently reported that the PTPase SHP-1 negatively modulates insulin action on hepatic glucose output. However, it is not clear if SHP-1 exerts this regulation by modulating glycogen storage and/or glucose production. Here, we used adenoviral gene transfer to overexpress a catalytically inert mutant (DNSHP-1) into rat hepatoma cells to further clarify the role of SHP-1 in liver. DNSHP-1 expression markedly increased insulin-stimulated Akt phosphorylation as compared to cells transduced with a control adenovirus. This was associated with decreased phosphorylation and increased activation of glycogen synthase. In contrast, expression of DNSHP-1 failed to affect insulin's ability to reduce PEPCK and G6Pase mRNA expression. Lack of effect on gluconeogenesis was confirmed by hepatocellular glucose production assay. Our results indicate that SHP-1 is a negative modulator of GS activity, representing a cell autonomous mechanism by which the PTPase reduces insulin action on hepatic glucose output.

## ***Introduction***

Insulin action on hepatic glucose metabolism is crucial to whole body glucose homeostasis. Recently, we have identified the protein tyrosine phosphatase SHP-1 as a novel modulator of insulin sensitivity. Insulin's ability to suppress hepatic glucose production is decreased in *viable motheaten* mice ( $me^v$ ) bearing a functionally-deficient SHP-1 protein compared to their wild type littermates<sup>1</sup>. Furthermore, inhibition of SHP-1 action by overexpression of a dominant-interfering mutant (mutation C453S, DNSHP-1) in liver of normal mice also increased hepatic insulin signaling and glucose tolerance<sup>1</sup>. However, it is still unclear how SHP-1 modulates insulin action on liver glucose metabolism.

Insulin stimulates glycogen synthesis while suppressing *de novo* glucose production by the liver, two important processes that are known to decrease hepatic glucose output. Rate of net glycogenolysis is determined by glycogen synthase (GS) and glycogen phosphorylase flux, where insulin essentially controls GS activity<sup>2</sup>. Insulin stimulates the inhibitory phosphorylation of the Akt substrate GSK-3 which prevents phosphorylation and inactivation of GS<sup>3</sup>. The hierarchical phosphorylation of GS marks its fine regulation where phosphorylation of sites 3a and 3b present in a cluster of 5 serines residues is highly associated with its inactivation<sup>4,5</sup>. On the other hand, insulin suppresses gluconeogenesis by transcriptional regulation of key gluconeogenic enzymes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) which produce phosphoenol pyruvate as glucose precursor and glucose, respectively<sup>6</sup>.

In this paper we used a cellular model in order to precisely determine the mechanisms of action of SHP-1 and to confirm that modulation of hepatic insulin action by SHP-1 is a cell autonomous process rather than the result of whole body influences or other SHP-1 functions that are perturbed in animal models of altered SHP-1 activity. We show that SHP-1 modulates GS phosphorylation and expression representing a key mechanism by which the PTPase modulates insulin action on hepatic glucose metabolism.

## Results

**Expression of DNSHP-1 in Fao cells.** Endogenous expression of SHP-1 was analysed in different hepatic cell lines (Fig. 1A). Fao cells showed higher expression of SHP-1 as compared to other cell lines and was therefore used in further studies. We used an adenoviral expression system to mediate gene transfer into Fao cells. Transduction of LacZ as control gene and X-Gal staining (Fig. 1B) confirmed a transduction efficiency of >95%. Fao cells were then infected with adenovirus (AdV) encoding a catalytically inert mutant (DNSHP-1) and its expression was confirmed by western blot analysis (Fig. 1C). We have previously shown that this DNSHP-1 mutant acts as a dominant negative mutant in multiple cell/tissue systems<sup>1</sup>.

**Increased CEACAM1 phosphorylation by DNSHP-1.** Cells were infected with adenovirus encoding GFP and DNSHP-1 to evaluate their impact on the phosphorylation of CEACAM1, a specific target of SHP-1 in liver<sup>1</sup>. We incubated cells or not with insulin for 10 min before immunoprecipitation of CEACAM1 from cell lysate. Western blot analysis revealed an increased tyrosine phosphorylation of CEACAM1 when DNSHP-1 was expressed, as compared to GFP expression (Fig. 2), thus confirming SHP-1 inhibition.

**SHP-1 modulates glycogen synthase.** We have recently shown that SHP-1 negatively modulates Akt phosphorylation and insulin action on hepatic glucose production (HGP) *in vivo*<sup>1</sup>. Akt controls glycogen synthesis through inhibition of glycogen synthase kinase-3 and subsequent activation of GS. Western blot analysis using phosphospecific antibodies showed that DNSHP-1 expression increases insulin-induced Akt phosphorylation (Fig. 3A-B) and reduces GS phosphorylation (Fig. 4A) in Fao cells expressing DNSHP-1, as compared to cells expressing control vectors. Decreased GS phosphorylation at detected serine residues (645/649/653/657) suggests an increased GS activity<sup>3,4</sup>. In addition, anti-GS immunoblotting revealed that DNSHP-1 also enhances GS expression (Fig. 4B). GS activity index, determined by the ratio GS/pGS, was markedly increased by DNSHP-1 expression (Fig. 4C).

**DNSHP-1 does not modulate gluconeogenesis.** We measured hepatocellular glucose production in transduced Fao cells treated with an increasing dose of insulin for 16 h (Fig. 5A). Insulin robustly inhibited glucose production, but its effect was not further enhanced by DNSHP-1 expression. The removal of the gluconeogenic substrates pyruvate and lactate revealed that Fao cells produces glucose mainly through gluconeogenesis. Hence, to further describe the role of SHP-1 in this process, we evaluated mRNA expression of PEPCK and G6Pase in basal and insulin-stimulated Fao cells expressing LacZ or DNSHP-1 (Fig. 4B-C). As expected, insulin strongly decreased expression of both transcripts but these effects were not modulated by DNSHP-1 expression. Consistent with those observations, the expression of the gluconeogenic transcription cofactor PGC-1<sup>7,8</sup> was not altered by DNSHP-1 either (Fig. 5D).

## ***Discussion***

We recently found that SHP-1 is an important player in the regulation of glucose homeostasis in part through inhibition of insulin action on HGP. However, it is still unclear how SHP-1 affects liver glucose metabolism and whether this is a cell autonomous regulated process. Here, we analysed the role of SHP-1 in Fao rat hepatoma cells and found that the PTPase modulates insulin signaling to Akt and GS phosphorylation. This represents a novel and cell autonomous mechanism of regulation of hepatic insulin action by SHP-1.

Insulin regulation of GS activity and glycogen synthesis is an important determinant of HGP in healthy patients<sup>9</sup> and its impairment can contribute to the development of type 2 diabetes<sup>10</sup>. Here, we demonstrate that insulin action on GS phosphorylation was increased by the expression of DNSHP-1. In addition, GS protein expression was found to be upregulated. These results strongly suggest that SHP-1 modulates HGP at least in part by inhibiting GS activity and glycogen synthesis.

Glucose output from Fao cells and their parental cell line<sup>11</sup> is mainly mediated by gluconeogenesis, as determined by the hepatocellular glucose production assay in the absence of gluconeogenic substrates. To further evaluate the role of SHP-1 in the regulation of HGP, we therefore investigated



its effect on gluconeogenesis. mRNA expression of both PEPCK and G6Pase as well as glucose production was not found to be modulated by the expression of DNSHP-1. We also evaluated PEPCK and G6Pase mRNA abundance in liver of post glucose challenged test mice where insulin is expected to suppress HGP (model previously used in <sup>1</sup>) and observed that DNSHP-1 expression was still without effect (data not shown). Thus, these results suggest that the liver action of insulin to suppress gluconeogenesis is not modulated by SHP-1. However, we cannot rule out that SHP-1 regulated gluconeogenesis through other mechanism *in vivo*. SHP-1 may control gluconeogenesis also through modulation of secretion of glucagon by pancreatic alpha cells or via a central effect involving SHP-1 action on STAT-3 as recently suggested by Rossetti and Kamga's independent works<sup>12,13</sup>. SHP-1 could also influence HGP by modulating the net output of amino acids, glycerol and NEFA from skeletal muscle and adipose tissues, which supply gluconeogenic substrates to the liver<sup>14,15</sup>.

In conclusion, this study shows that SHP-1 is a negative modulator of GS protein expression and activity. This represents a novel and cell autonomous mechanism by which SHP-1 reduces insulin action in liver. Thus, SHP-1 could represent a key therapeutic target to combat hepatic insulin resistance and glucose intolerance in type 2 diabetic subjects.

## **Methods**

### **Materials**

Reagents for SDS-PAGE and immunoblotting were from Bio-Rad (ON, Canada). Enhanced chemiluminescence reagent was from Millipore (MA, United States). [<sup>125</sup>I]-insulin, protein A-Sepharose and anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to horseradish peroxidase were purchased from GE Healthcare Bio-Sciences Corp. (NJ, United States). All other chemicals were of the highest analytical grade.

### **Antibodies**

Monoclonal SHP-1-specific antibody was obtained from BD Biosciences (ON, Canada). Polyclonal SHP-1, Akt 1/2 (recognizing both Akt 1 and 2 [H-136]) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, United States). Anti-phosphospecific antibody against Akt (Ser473) was from Cell Signaling (Danvers, MA). Antibodies against phosphotyrosine were obtained from Upstate Biotechnology (NY, United States) and New England Biolabs. Glycogen synthase antibody was from AbD Serotec (NC, United States), and phosphospecific-glycogen synthase antibody (Ser645 / Ser649 / Ser653 / Ser657) was from Calbiochem (CA, United States). CEACAM1 polyclonal antibody was previously described<sup>16</sup>.

### **Adenoviral preparation**

We generated adenovirus encoding LacZ, GFP and a dominant negative SHP-1 (DNSHP-1, C453S mutation) using the AdEasy system according to the manufacturer's instructions (Stratagene, TX, United States). Briefly, control vectors encoding LacZ (pShuttle-CMV-LacZ) and GFP (pAdTrack) was supplied by Stratagene. DNSHP-1 cDNA was subcloned into pShuttle-CMV vector. Homologous recombination of pShuttle vectors with pAdEasy-1 occurs in *E.coli* BJ5183 strain. Viral stocks were amplified into 293ad. Adenovirus were purified by a double round of CsCl ultracentrifugation and desalted with NAP<sup>TM</sup> 10 columns (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, United States).

### **Cell culture and treatment**

Fao cells, derived from the H4IIE rat hepatoma cell line<sup>17</sup>, were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen, CA, United States) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were plated and grown to subconfluence. Adenovirus was added to the cells and incubated 6-8 h, and then incubated overnight in serum-free medium. Experiments were done 24 h after adenoviral transduction. 293ad cells (Stratagene, TX, United States) were cultured in D-MEM high-glucose, supplemented with 10% heat-inactivated FBS and maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **X-Gal staining**

Transduced Fao cells were rinsed once with PBS and then fixed with 2% formaldehyde and 0.2% gluteraldehyde for 5 min. The cells were then washed three times with PBS and stained in PBS containing 1 mg/mL X-Gal, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM potassium ferrocyanide and 5 mM potassium ferricyanide for 2 h at 37 °C.

### **Hepatocellular glucose production**

Transduced Fao cells were incubated overnight in serum-free medium, with or without insulin at the indicated concentration. The next day, cells were rinsed three times with PBS and then incubated in phenol- and glucose-free DMEM supplemented or not with the gluconeogenic substrates, 20 mM sodium L-lactate and 2 mM sodium pyruvate. The cells were incubated 5 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in the presence or absence of insulin. Glucose concentration was measured using the Amplex-Red Glucose assay kit (Invitrogen, CA, United States) following manufacturer's instructions. Cell monolayers were lysed with 50 mM NaOH and protein concentration was determined using BCA protein assay kit (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, United States) to normalize glucose production.

### **Western Blot**

Cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were then blocked for 1 h at room temperature in wash buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.04% Igepal CA-630 and 0.02% Tween 20) containing 5% nonfat milk followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies

in wash buffer supplemented with 1% BSA. The PVDF membranes were then washed for 30 min followed by a 1-h incubation with either anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated antibody in wash buffer containing 5% nonfat milk. The PVDF membranes were washed for 30 min and the immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence method.

### Reverse Transcription real-time PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Plus mini kit (Qiagen, ON, Canada) and reverse transcribed with poly-dT primers. The resultant cDNA was processed to real-time PCR (Rotor-Gene RG3000A, Corbett Research, Australia) and analysed by comparative quantification. GAPDH gene expression measurement was used to normalize gene expression. Primers used are (**gene**/forward primer/reverse primer, 5' to 3') **PEPCK** / GAGTGCCCATCGAAGGCAT / CCAGTGCGCCAGGTAAGTTC, **G6P** / TCCTCTTTCCCATCTGGTTC / TATACACCTGCTGCGCCCAT, **PGC-1 $\alpha$**  / GGTACCCAAGGCAGCCACT / GTGTCCTCGGCTGAGCACT, **SHP-1** / CACATCAAGGTCATGTGCGAGGGT / CCTTCCAGACGCTGGTGCAAGTTC, **GAPDH** / CCACCACCCTGTTGCTGTAG / CTTGGGCTACACTGAGGACC.

### Statistical analysis

The effects of DNSHP-1 and insulin were compared by t-test analysis using StatView 5.0. Differences were considered to be statistically significant at  $p < 0.05$ .

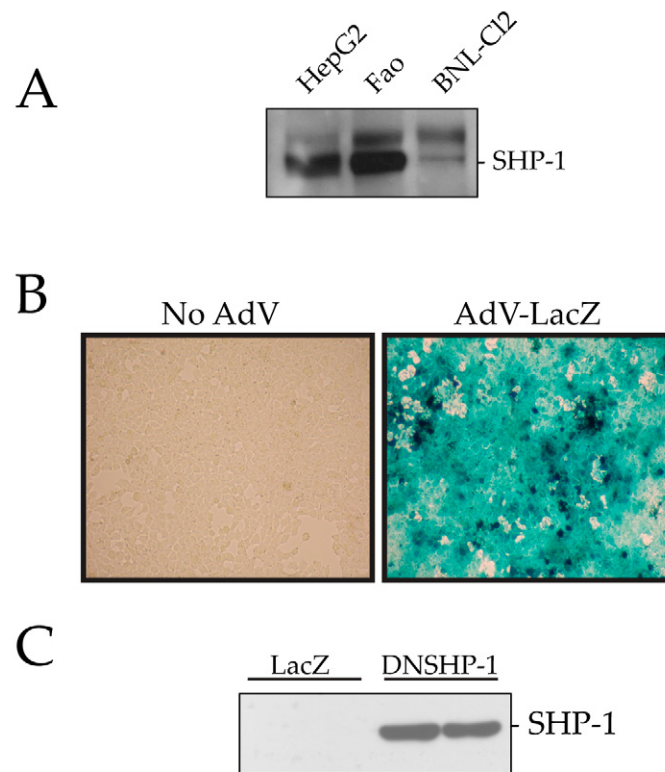
### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association and the Canadian Institute for Health Research (CIHR). A.M. was the recipient of a CIHR Investigator Award and currently holds a FRSQ national scientist award. S.B. and M.-J.D. were supported by studentships from the Canadian Diabetes Association and Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Bruno Marcotte for technical assistance and Kerstin Bellmann for critical reading of the manuscript.

## References

1. Dubois, M.J. *et al.* The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat. Med.* **12**, 549-556 (2006).
2. Petersen, K.F., Laurent, D., Rothman, D.L., Cline, G.W. & Shulman, G.I. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J. Clin. Invest* **101**, 1203-1209 (1998).
3. Cohen, P. Dissection of the protein phosphorylation cascades involved in insulin and growth factor action. *Biochem. Soc. Trans.* **21 ( Pt 3)**, 555-567 (1993).
4. Roach, P.J. Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *FASEB J.* **4**, 2961-2968 (1990).
5. Roach, P.J. Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. Med.* **2**, 101-120 (2002).
6. Barthel, A. & Schmolz, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **285**, E685-E692 (2003).
7. Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature* **423**, 550-555 (2003).
8. Zhou, X.Y. *et al.* Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nat. Med.* **10**, 633-637 (2004).
9. Petersen, K.F., Price, T., Cline, G.W., Rothman, D.L. & Shulman, G.I. Contribution of net hepatic glycogenolysis to glucose production during the early postprandial period. *Am. J. Physiol* **270**, E186-E191 (1996).
10. Giaccari, A. *et al.* Relative contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to hepatic glucose production in control and diabetic rats. A re-examination in the presence of euglycaemia. *Diabetologia* **41**, 307-314 (1998).
11. Zhou, H. *et al.* Adiponectin represses gluconeogenesis independent of insulin in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 793-799 (2005).
12. Buettner, C. *et al.* Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* **4**, 49-60 (2006).
13. Inoue, H. *et al.* Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* **3**, 267-275 (2006).
14. Cherrington, A.D., Edgerton, D. & Sindelar, D.K. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* **41**, 987-996 (1998).

15. Girard,J. The inhibitory effects of insulin on hepatic glucose production are both direct and indirect. *Diabetes* **55 Suppl 2**, S65-S69 (2006).
16. Izzi,L., Turbide,C., Houde,C., Kunath,T. & Beauchemin,N. cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* **18**, 5563-5572 (1999).
17. Deschatrette,J. & Weiss,M.C. Characterization of differentiated and dedifferentiated clones from a rat hepatoma. *Biochimie* **56**, 1603-1611 (1974).

**Figures****Figure 1**

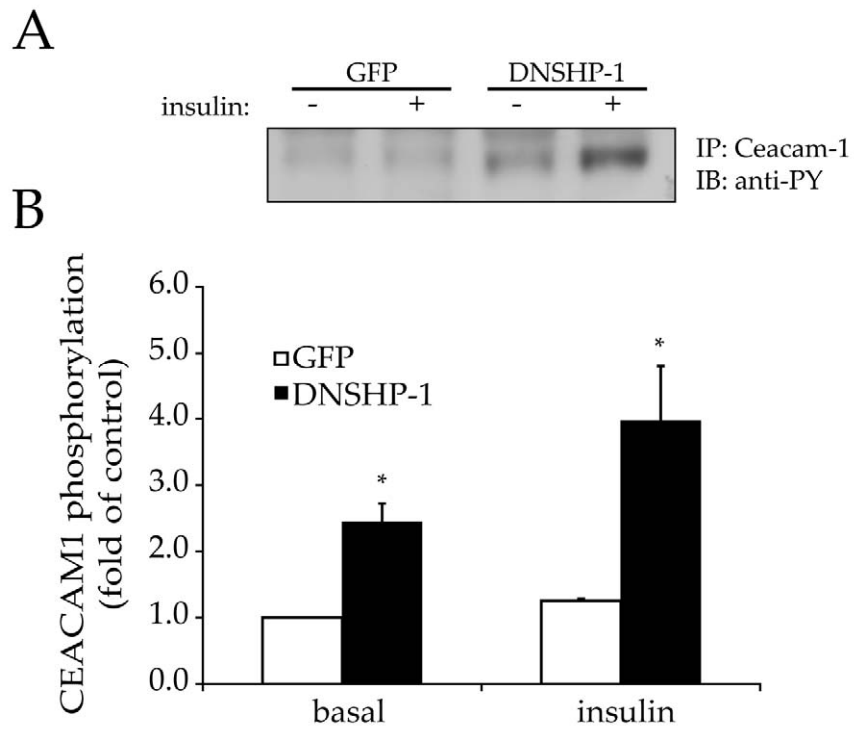


Figure 2



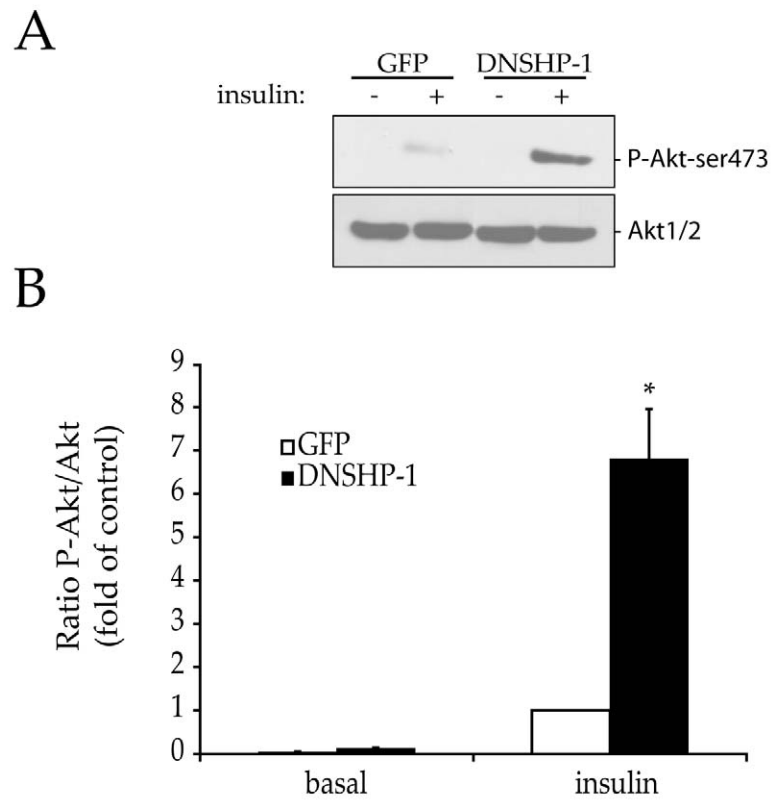


Figure 3

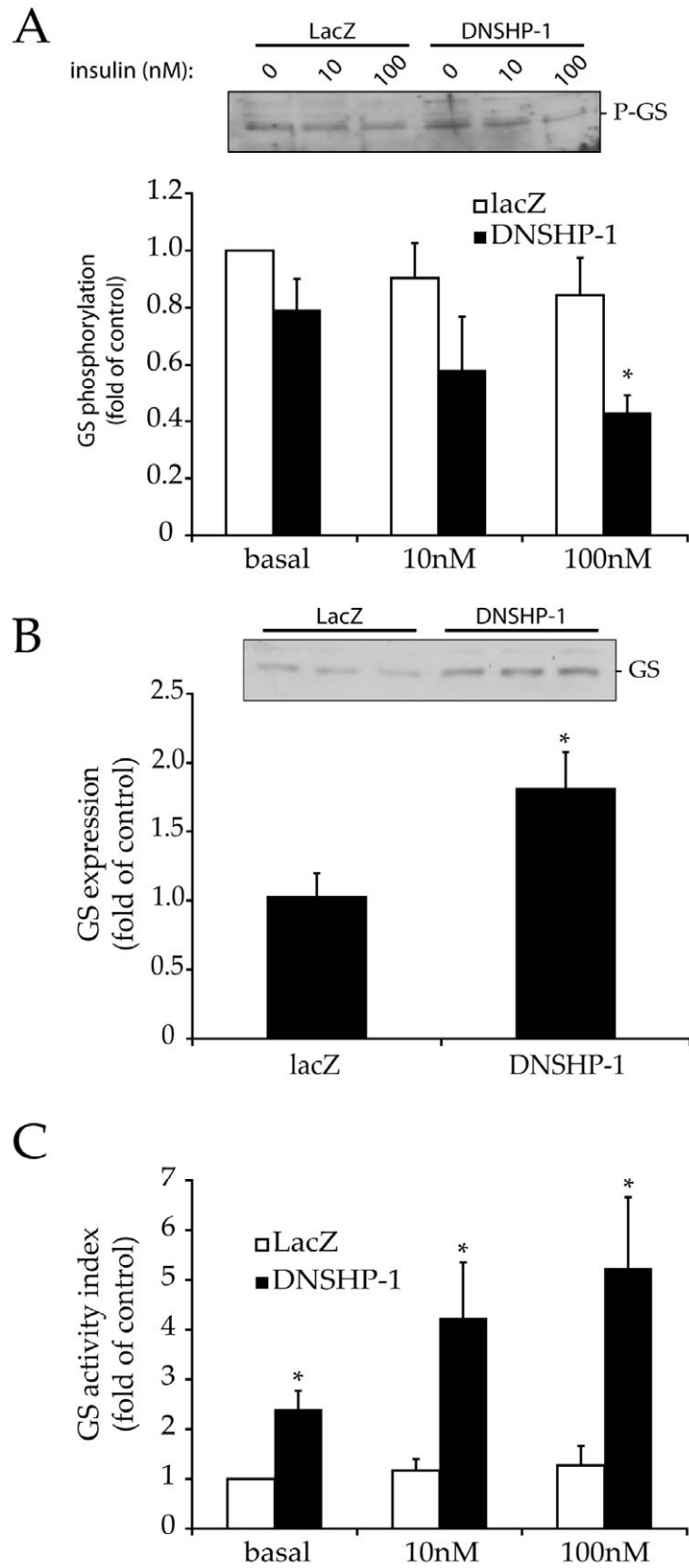


Figure 4

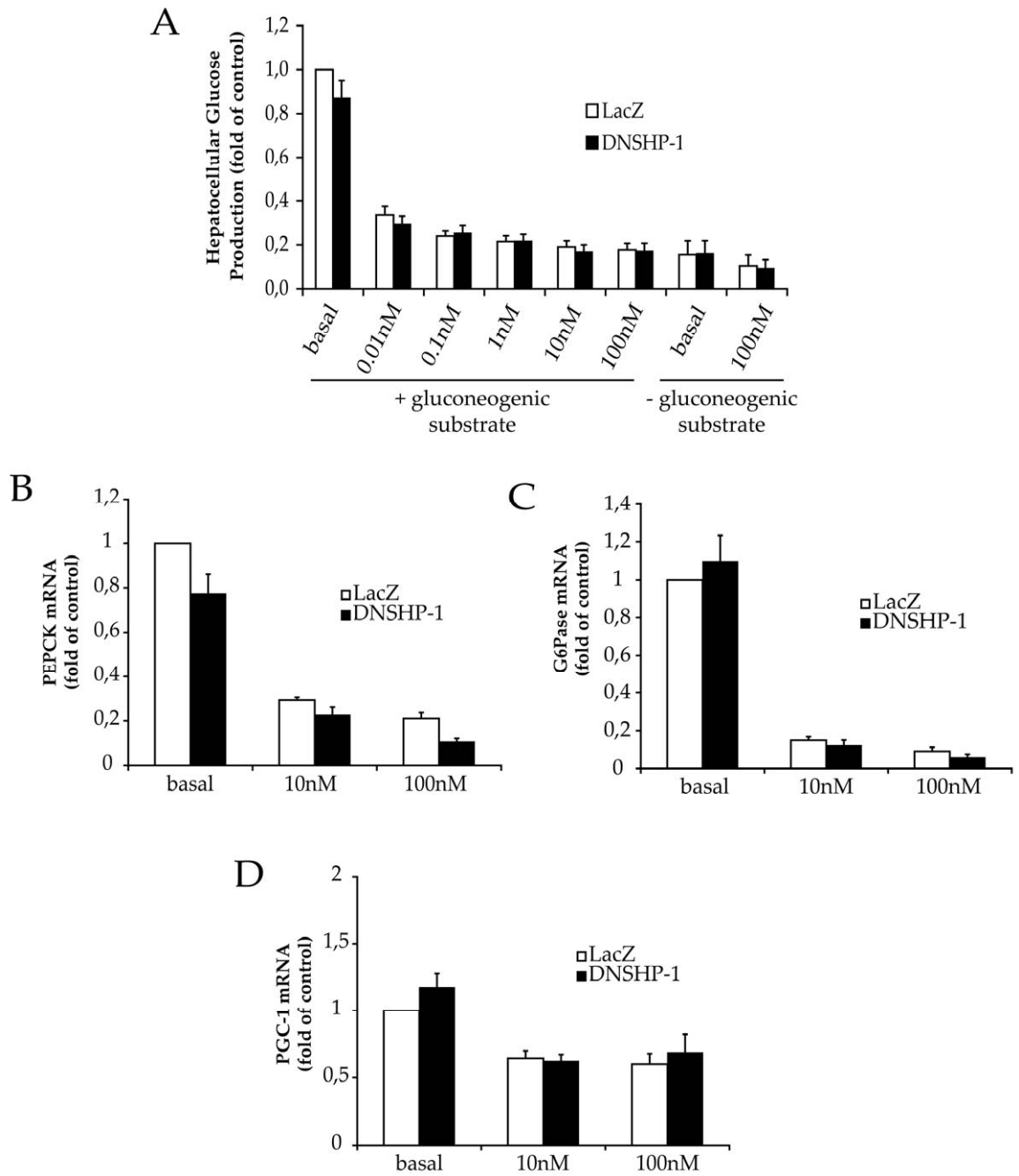


Figure 5

## ***Legends to figures***

Figure 1. **Expression of SHP-1 in Fao cells.** (A) Protein lysates (50µg) from HepG2, Fao and BNL-C12 cells were subjected to western blot analysis using anti-SHP-1 antibody. (B) X-Gal staining of Fao cells infected or not with adenovirus encoding LacZ 24 h post-infection. (C) Western blot analysis of protein lysates from transduced Fao with adenovirus encoding for LacZ or DNSHP-1 using anti-SHP-1 antibody.

Figure 2. **Effect of SHP-1 on CEACAM1 phoshorylation.** Transduced Fao cells expressing LacZ or DNSHP-1 were stimulated or not with 100 nM insulin during 10 min before lysis. CEACAM1 was immunoprecipitated from lysates and immunoprecipitates were subjected to western blot analysis using anti-PY antibody. Results are the means  $\pm$  S.E.M. of 4 different experiments. \*  $p \leq 0,05$  compared to LacZ.

Figure 3. **Effect of SHP-1 on insulin signaling.** (A) Fao cells were infected with adenovirus encoding GFP or DNDHP-1. 24 h post-infection, cells were incubated for 10 min in the absence or presence of 100 nM insulin. Lysates were subjected to western blot analysis with anti-Akt and phospho-specific (ser473) antibody. (B) Graphical representation of means  $\pm$  S.E.M of densitometric analysis from 3 different experiments expressed as a ratio P-Akt/Akt. \*  $p \leq 0,05$  compared to GFP.

Figure 4. **Effect of SHP-1 on glycogen synthase.** Fao cells were infected with adenovirus encoding LacZ or DNSHP-1. 24 h post-infection, cells were incubated for 10 min in the absence or presence of 10 or 100 nM insulin. Lysates were subjected to western blot analysis with (A) anti-GS phospho-specific (Ser645 / Ser649 / Ser653 / Ser657) and (B) anti-GS antibodies. (C) Results expressed as a ratio GS/P-GS (=activity index) are the means  $\pm$  S.E.M. of 3-5 different experiments. \*  $p \leq 0,05$  compared to LacZ.

Figure 5. **Lack of gluconeogenic modulation by SHP-1.** (A) Fao cells infected with adenovirus encoding LacZ or DNSHP-1 were incubated with or without insulin during an overnight serum

starvation period. Cells were then incubated with or without insulin for 5 h in glucose-free DMEM in the presence or absence of gluconeogenic substrates. At the end, glucose concentration in the medium was measured and normalized to protein concentration. (B, C, D) Transduced Fao cells were incubated with or without insulin during an O.N. serum starvation. 24 h post-infection, expression of PEPCK, G6P and PGC-1 $\alpha$  was assessed by reverse transcription reaction followed by real-time PCR (RT-QPCR). Results are the means  $\pm$  S.E.M. of 4-17 different experiments.

## Chapitre III

L'INHIBITION DE LA PROTÉINE TYROSINE PHOSPHATASE  
SHP-1 DANS LES CELLULES MUSCULAIRES ACCROÎT LE  
TRANSPORT DU GLUCOSE EN AUGMENTANT LA  
SIGNALISATION VIA AKT ET L'EXPRESSION DE GLUT4

## **Résumé**

Il est maintenant bien établi que la protéine tyrosine phosphatase SHP-1 est un modulateur important de l'action de l'insuline. Ici, nous avons utilisé des adénovirus pour exprimer un mutant interférant de SHP-1 (DNSHP-1; mutation C453S) dans les myocytes L6 pour évaluer le rôle de cette phosphatase dans un modèle cellulaire de muscle squelettique. La phosphorylation de Akt en réponse à l'insuline apparaît amplifiée lorsque DNSHP-1 est exprimé, comparativement à celles exprimant lacZ. De plus, la pertinence physiologique est démontrée par une augmentation de transport du glucose et de son incorporation aux réserves de glycogène. L'inhibition pharmacologique de GLUT4 avec l'indinavir a permis de révéler l'importance de la contribution de ce transporteur dans l'amélioration de l'action de l'insuline par DNSHP-1. Nous avons constaté que l'ARNm de GLUT4 et sa protéine sont spécifiquement surabondants dans les cellules qui expriment DNSHP-1. Des souris surexprimant CAR dans le muscle ont été utilisées pour y tester notre construction adénovirale, et l'augmentation de l'expression de GLUT4 fût confirmée in vivo lorsque DNSHP-1 est exprimé dans le tibialis antérieur. Ensemble, nos trouvailles confirment que DNSHP-1 régule l'action de l'insuline de façon intrinsèque dans les cellules du muscle squelettique. Enfin, l'augmentation de l'expression de GLUT4 représente un nouveau mécanisme d'amélioration de la sensibilité à l'insuline dirigé par une protéine tyrosine phosphatase.

**Inhibition of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in skeletal muscle cells increases glucose uptake by augmenting insulin signaling to Akt and GLUT4 expression**

Sébastien Bergeron<sup>1</sup>, Marie-Julie Dubois<sup>1</sup>, Nancy Larochelle<sup>2</sup>, Joséphine Nalbantoglu<sup>2</sup> and André Marette<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy-Physiology and Lipid Research Unit, Laval University Hospital Research Center, Québec, Canada. <sup>2</sup>Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University and Montreal Neurological Institute, Montreal, Quebec, Canada

Running title: SHP-1 modulates insulin signaling and Glut-4 expression

\*Address correspondence to: Dr. André Marette

Lipid Research Unit  
Laval University Hospital Research Center  
2705, Laurier Blvd  
Ste-Foy, (Québec), Canada, G1V 4G2  
Tel: (418) 656-4141 (47549)  
Fax: (418) 654-2176  
email: [andre.marette@crchul.ulaval.ca](mailto:andre.marette@crchul.ulaval.ca)



## ***Abstract***

The protein tyrosine phosphatase (PTPase) SHP-1 was recently reported to be a novel regulator of insulin action. Using adenovirus (AdV)-mediated gene transfer, we express an interfering mutant of SHP-1 (DNSHP-1; mutation C453S) in L6 myocytes to examine the role of this PTPase in skeletal muscle cells. Expression of DNSHP-1 increased insulin-induced Akt phosphorylation and augmented glucose uptake and glycogen synthesis. Pharmacological inhibition of GLUT4 activity using indinavir revealed an important role for this transporter in the increased insulin-induced glucose uptake in DNSHP-1 expressing myocytes. Both GLUT4 mRNA and protein expression were found to be increased by DNSHP-1 expression. In vivo we found that injection of AdV-DNSHP-1 in skeletal muscle of transgenic mice overexpressing Cocksackie and AdV receptor also enhanced GLUT4 protein expression. Together, these findings confirm that SHP-1 regulates muscle insulin action in a cell autonomous manner and further show that the PTPase negatively modulates insulin action through down regulation of both insulin signaling and GLUT4 expression.

## ***Introduction***

Insulin binding to the insulin receptor (IR) induces its autophosphorylation and enzymatic activity, which catalyzes the phosphorylation of specific tyrosine residues on downstream molecules, such as insulin receptor substrate (IRS) proteins to initiate the PI3K/Akt pathway<sup>1</sup>. In adipose and muscle cells, this results in the stimulation of glucose uptake mainly through the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. On the other hand, protein tyrosine phosphatases (PTPases) also modulate insulin signaling through dephosphorylation of key tyrosine residues in both the insulin receptor and IRS-1<sup>2-5</sup>. Among them, PTP-1B and LAR have certainly attracted a lot of attention, as manipulating their expression in transgenic mouse models modulates insulin sensitivity for glucose metabolism<sup>3,5-7</sup>.

Recently, we identified a new role for the Src-homology 2-domain-containing phosphatase (SHP)-1 in the modulation of insulin action on glucose metabolism<sup>8</sup>. SHP-1 is a well known PTPase for its immune function as a negative regulator of the T cell receptor (TCR)<sup>9</sup>. However, we showed that viable motheaten (*me<sup>v</sup>*) mice expressing catalytically deficient SHP-1<sup>10,11</sup> exhibited increased whole-body insulin sensitivity compared to their wild-type littermates. This was associated with increased insulin signaling to Akt in both liver and muscle leading to reduced hepatic glucose production and improved glucose uptake in skeletal muscle. Furthermore, adenoviral-mediated hepatic expression of a dominant negative SHP-1 (DNSHP-1, C453S mutation) increased both insulin signaling and glucose tolerance, confirming a cell-autonomous role of SHP-1 in liver. However, whether SHP-1 directly modulates insulin action in skeletal muscle remains to be established.

In the present study, we used L6 myocytes to further investigate the role of SHP-1 in skeletal muscle. We found that inhibition of SHP-1 activity by adenoviral-mediated expression of DNSHP-1 increases insulin signaling to Akt and glucose utilization in the muscle cells. Unexpectedly, we also observed a transcriptional upregulation of GLUT4 which was confirmed *in vivo* by injection of the DNSHP-1 mutant directly in the tibialis anterior muscle of mice. These results indicate that SHP-1 is a cell autonomous modulator of insulin signaling and GLUT4 expression in skeletal muscle.

## Results

**Expression of DNSHP-1 in L6 muscle cells.** Adenoviral-mediated gene transfer was used to express DNSHP-1 into L6 myocytes. Incubation of cells with the appropriate viral particle concentration allowed 95-100% transduction efficiency ( $4 \times 10^{10}$  adenoviral particles were used throughout the study), as confirmed by lacZ gene transfer and X-gal staining (Fig. 1A). Robust expression of DNSHP-1 was revealed by western blot analysis (Fig. 1B). Lack of effect of DNSHP-1 overexpression on cell viability and differentiation was confirmed by visual inspection (Fig. 1A) and desmin determination (Fig. 1B), a marker of myogenic development<sup>12</sup>.

**DNSHP-1 improves insulin signaling.** Insulin augments glucose metabolism in muscle through activation of the PI3K/Akt pathway. To assess the effect of SHP-1 on insulin signaling, we treated L6 myocytes expressing either lacZ or DNSHP-1 with an increasing dose of insulin and analyzed the phosphorylation of Akt by western blot analysis (Fig. 2A). DNSHP-1 expression increased Akt-ser<sup>473</sup> phosphorylation by insulin. When results were quantified and expressed in relation to the total amount of Akt protein, a significant increase was observed at 1 nM (+58%) and 100nM (+64%) insulin concentrations (Fig. 2B) confirming that SHP-1 inhibits insulin signaling to Akt in myocytes.

**DNSHP-1 augments glucose uptake and glycogen synthesis.** Insulin-induced activation of Akt ultimately results in enhanced glucose transport in muscle<sup>1</sup>. Expression of DNSHP-1 significantly increased both basal (+43%) and insulin-stimulated (+34%) glucose transport in L6 cells (Fig. 3A). We next used indinavir, an HIV protease inhibitor, known to selectively inhibit the insulin sensitive glucose transporter GLUT4<sup>13</sup>. Addition of indinavir to lacZ as well as DNSHP-1 expressing cells caused a strong inhibition of both basal and insulin-stimulated glucose transport. Interestingly, indinavir caused a more potent inhibition of glucose transport in L6 myotubes expressing DNSHP-1, suggesting a specific involvement of the GLUT4 isoform in the enhanced glucose transport in these cells (Fig. 3B). The metabolic fate of this additional glucose availability was analysed by a 2 h glycogen incorporation assay. As expected, DNSHP-1 expression culminated in enhanced production of glycogen as compared to control cells (Fig. 3C).

**Regulation of GLUT4 expression by DNSHP-1.** Since GLUT4 expression is a major determinant of muscle glucose transport, we next tested the possibility that improved glucose transport in DNSHP-1 expressing muscle cells resulted from increased GLUT4 expression. Reverse transcription/real-time PCR analysis revealed that GLUT4 mRNA was increased whereas GLUT1 expression was not (Fig. 4A). Furthermore, western blot analysis confirmed that inhibition of SHP-1 increased GLUT4 protein expression (Fig. 4B).

**DNSHP-1 increases GLUT4 expression in mouse skeletal muscle.** We next determined whether SHP-1 also controls GLUT4 expression in adult mouse skeletal muscle. Efficient adenoviral transduction of skeletal muscle occurs only in immature or in regenerating muscle<sup>14-17</sup>. To overcome this limitation, we used transgenic mice overexpressing CAR allowing adenoviral-transfer in mature muscle cells by a single injection of adenovirus<sup>18</sup>. We confirmed the transduction efficiency of our adenoviral construction by X-Gal staining of muscle cryosections (Fig. 5A), and determined SHP-1 protein expression from total muscle lysate (Fig. 5B). Although transduction efficiency *in vivo* ( $\approx 50\%$ , Fig. 5A) was lower compared to L6 cells ( $\geq 95\%$ , Fig. 1A), we confirmed that DNSHP-1 expression significantly reduced SHP-1 activity in tibialis muscle (fig 5C). Importantly, we found that the expression of GLUT4, but not GLUT1, was significantly increased in DNSHP-1-transduced muscle compared to muscle transduced with the LacZ control AdV (Fig. 6) confirming that SHP-1 plays an important role in the modulation of GLUT4 expression in adult mouse skeletal muscle.

## **Discussion**

We have recently reported that SHP-1 dysfunction in *me<sup>v</sup>* mice improves whole body insulin sensitivity in these animals. Moreover, isolated skeletal muscle from these mice showed improved insulin-stimulated glucose uptake compared to their littermate controls<sup>8</sup>. However, these mice also have a reduced fat mass and develop immune disorders<sup>19,20</sup>, which complicates the interpretation of the muscle phenotype in this complex model. In the present study, we therefore decided to use L6 myocytes to confirm the autonomous role of SHP-1 in muscle and to rule out the contribution of secondary phenotypes observed in the *me<sup>v</sup>* model.

In L6 myocytes, inhibition of SHP-1 by the expression of DNSHP-1 was found to augment Akt phosphorylation, as well as basal and insulin-stimulated glucose transport. This was accompanied by an improvement of insulin-stimulated glycogen incorporation. To assess the contribution of GLUT4 in DNSHP-1-mediated glucose uptake, indinavir was added to the cells during glucose uptake measurements to specifically inhibit this transporter. This study revealed that DNSHP-1 expression increased glucose uptake at least in part via a GLUT4-dependent mechanism. Indeed, both GLUT4 mRNA and protein were increased by DNSHP-1 while GLUT1 expression was not affected. Together these results suggest that DNSHP-1 augments GLUT4 expression by a transcriptional mechanism. Finally, DNSHP-1 AdV was directly injected in skeletal muscle of transgenic mice overexpressing CAR<sup>18</sup> and confirmed that SHP-1 modulates GLUT4 expression in muscle in vivo. The regulation of GLUT4 expression thus represents a novel mechanism by which SHP-1 negatively modulates insulin action in skeletal muscle.

Further studies will be required to delineate the transcriptional mechanism by which SHP-1 controls GLUT4 expression. In this regard, it is interesting to note that  $\beta$ -catenin is overexpressed and hyperphosphorylated in the intestinal epithelium of *me<sup>v</sup>* mice compared to their littermates<sup>21</sup>. The same group demonstrated that SHP-1 could bind and dephosphorylate  $\beta$ -catenin thus reducing its transcriptional activity<sup>21</sup>. In the nucleus,  $\beta$ -catenin forms a transcriptional regulatory complex with any member of the lymphoid enhancer factor/T cell factor (LEF/TCF) family<sup>22</sup>. However, two conserved amino acid motifs on some LEF/TCF isoforms seem to be essential to activate the *LEF1* promoter in a  $\beta$ -catenin dependent manner. GenBank search revealed that two other DNA-binding proteins are containing these motifs. One of them is the GLUT4-enhancer factor (G4EF)<sup>23</sup>, which recognizes the enhancer for the human GLUT4 transporter gene<sup>24</sup>. These results suggest a possible interaction between  $\beta$ -catenin and G4EF, but the modulation of  $\beta$ -catenin/G4EF transcriptional activity by SHP-1 remains to be confirmed.

In conclusion, this study demonstrates that SHP-1 modulates insulin action in skeletal muscle cells by a cell autonomous mechanism. The PTPase exerts its modulatory effect on glucose transport by decreasing both insulin signaling to Akt and GLUT4 expression. Since both Akt activation and GLUT4 expression are key determinants of glucose metabolism in skeletal muscle and loci of insulin

resistance in obese type 2 diabetics, our data suggest that SHP-1 might represent a potential target to combat muscle insulin resistance.

## **Methods**

### **Materials**

All cell culture solutions and supplements were purchased from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from Bio-Rad (CA, United States), and ECL reagent was from Millipore (ON, Canada). Protein A-Sepharose and  $^{14}\text{C}$ -glucose were obtained from GE Healthcare (Little Chalfont, U.K.) and  $^3\text{H}$ -glucose from Perkin Elmer Life Sciences (Wellesley, MA). Human insulin was obtained from Eli Lilly (ON, Canada). X-Gal was purchased from Roche (Qc, Canada). Indinavir was a kind gift of Merck Froost (Qc, Canada). All other chemicals were of the highest analytical grade.

### **Antibodies**

Anti-SHP-1 for immunoprecipitation and immunoblotting was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and BD Biosciences (Qc, Canada), respectively. Anti-GLUT4 was obtained from Millipore (ON, Canada) and anti-GLUT1 was a kind gift of Dr. Amira Klip (Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada). A polyclonal antibody against Akt (C-20) was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and anti-phospho-specific antibody against Akt (Ser-473) and Src (Tyr-416) were from Cell Signaling (Danvers, MA). Antibody against desmin was obtained from AbCam (Cambridge, U.K.). Anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G conjugated to horseradish peroxidase were purchased from GE Healthcare (Little Chalfont, U.K.).

### **Adenoviral preparation**

We generated adenoviruses encoding lacZ and DNSHP1 using the AdEasy system according to the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, CA). Briefly, dominant negative SHP-1 (DNSHP-1, C453S mutation) cDNA was subcloned into pShuttle-CMV vector. Control vector encoding LacZ (pShuttle-CMV-lacZ) was supplied by Stratagene. Homologous recombination of pShuttle vectors with pAdEasy-1 was done in *E.coli* BJ5183 strain. Viral stocks were amplified in 293ad cells. Adenovirus were purified by a double round of CsCl ultracentrifugation and desalted with NAP<sup>TM</sup> 10 columns (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.).

### **Cell culture and treatment**

L6 skeletal muscle cells (kind gift of Dr. Amira Klip) were maintained in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were plated and differentiation was induced by reducing the FBS concentration to 2%. After 5 days, adenoviral particles were added to the cells and incubated overnight, and then replaced by fresh differentiation medium. Experiments were conducted after 7 days in differentiation medium. 293ad cells (Stratagene, La Jolla, CA) were cultured in D-MEM high-glucose, supplemented with 10% heat-inactivated FBS and maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

### **X-Gal staining**

Transduced and fully differentiated L6 cells and 10  $\mu$ m thick muscle cryosections were rinsed once with PBS and then fixed with 2% formaldehyde 0.2% gluteraldehyde for 5 min. The cells and cryosections were then washed three times with PBS and stained in PBS containing 1 mg/mL X-Gal, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM K-ferrocyanide and 5 mM K-ferricyanide for 2 h at 37 °C. Pictures were taken on a Nikon Eclipse TE300 microscope with a Nikon digital camera and X-Gal positive cells were counted.

### **SHP-1 activity assay**

SHP-1 phosphatase activity was measured using the RediPlate™ 96 EnzChek® Tyrosine Phosphatase Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), as described in the manufacturer's manual. In brief, SHP-1 was immunoprecipitated from cellular lysate with 2 $\mu$ g anti-SHP-1 polyclonal antibody (Santa Cruz) prebound to protein A-Sepharose beads. After an overnight rotation at 4°C, beads were washed three times with PBS containing 1% Igepal CA-630 as detergent (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) and 5 mM DTT. Finally, beads were placed into a well of the RediPlate™, and incubated 30 min at room temperature before reading the fluorescence with a microplate reader VICTOR<sup>3</sup>™V (Perkin Elmer Life Sciences, Wellesley, MA). Aliquots of beads were kept to evaluate the amount of SHP-1 immunoprecipitated by western blot analysis.



### **Western Blot**

Cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in wash buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.04% Igepal CA-630 and 0.02 % Tween 20) containing 5 % nonfat milk powder followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies in wash buffer supplemented with 1% BSA. The PVDF membranes were washed for 30 min followed by a 1 h incubation with either anti-mouse or anti-rabbit HRP-conjugated antibody in wash buffer containing 5 % nonfat milk. The PVDF membranes were washed for 30 min and the immunoreactive bands were detected by the enhanced chemiluminescence method.

### **2-deoxyglucose uptake**

2-Deoxyglucose uptake was determined as previously described<sup>25</sup>. Briefly, after experimental treatments, cells were rinsed once with pre-warmed HEPES-buffered solution (20 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) and were subsequently incubated for 8 min in HEPES-buffered solution containing 10 μM 2-deoxyglucose, 0.3 μCi/ml 2-deoxy-[<sup>3</sup>H]glucose and 100 μM indinavir where indicated. Glucose uptake was stopped by washing three times with ice-cold 0.9% NaCl solution and by lysis in 50 mM NaOH. 40 μL were aliquoted for protein determination and cell-associated radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

### **Glycogen Synthesis**

Myocytes were serum-starved for 3 h and then placed into α-MEM containing 0.5 μCi/mL of [<sup>14</sup>C]D-glucose (300 mCi/mmol). Insulin was added or not, and cells were incubated for 2 h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The reaction was stopped by washing three times with ice-cold PBS. Cells were disrupted by rocking 1 h in KOH 10 N. Four mg of glycogen was added as carrier and the solution was boiled for 30 min. 3 aliquots of 10 μL were taken for protein determination and glycogen was precipitated overnight at 4 °C with 2 vol. of 100% ethanol. The tubes were centrifuged at 10 000 g for 10 min. Pellets were washed three times with ethanol 66% and dissolved in water. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

### Reverse Transcription real-time PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Plus mini kit (Qiagen, ON, Canada) and reverse transcribed with poly-dT primers. The resultant cDNA was processed to real-time PCR (Rotor-Gene RG3000A, Corbett Research) and analysed by comparative quantification. Primers used are (**gene**/forward primer/reverse primer, 5' to 3')

**GLUT1**/GATGATGAACCTGTTGGCCT/AGCGGAACAGCTCCAAGATG,  
**GLUT4**/CTCAGCTGTGCTTGGCTCCCTTCAGTTTGGC/GATGGAGTCCGGTCCCCCAGGACCCTG  
 CCTAC, and **GAPDH**/CCACCACCCTGTTGCTGTAG/CTTGGGCTACACTGAGGACC.

### Statistical analysis

The effects of DNSHP-1 and insulin were compared by t-test analysis using StatView 5.0. Differences were considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ .

### Acknowledgments

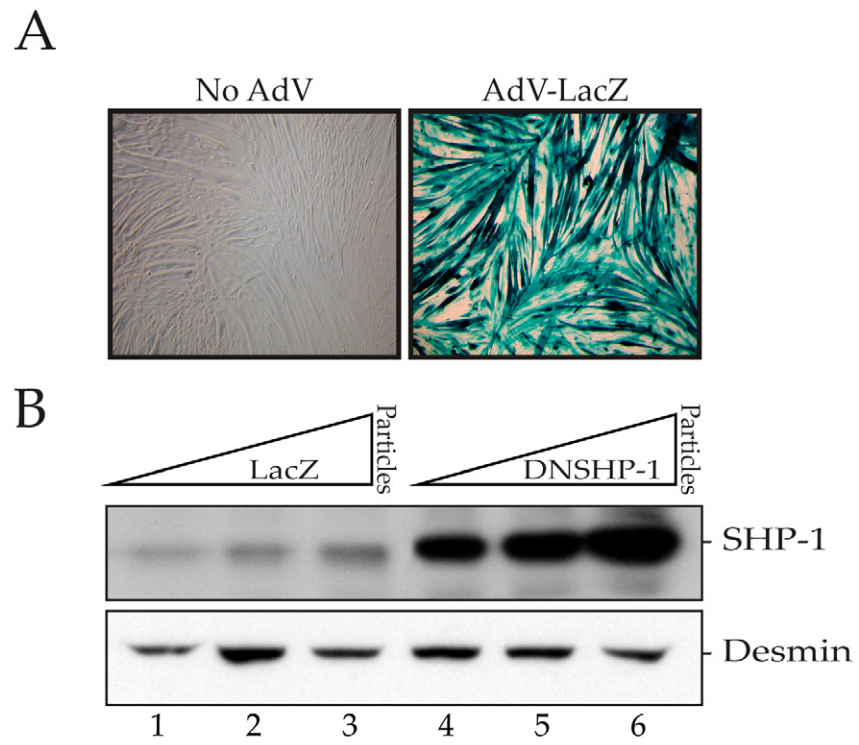
This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association and Canadian Institute for Health Research (CIHR). A.M. is the recipient of a CIHR Investigator Award. S.B. and M.-J.D. were supported by studentships from the Canadian Diabetes Association and Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Bruno Marcotte for technical assistance and Dr Kerstin Bellmann for critical reading of the manuscript. We thank also Dr Katherine Siminovitch for providing plasmids containing DNSHP-1 cDNA.

## References

1. Chang,L., Chiang,S.H. & Saltiel,A.R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol. Med.* 10, 65-71 (2004).
2. Zabolotny,J.M. *et al.* Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J. Biol. Chem.* 279, 24844-24851 (2004).
3. Elchebly,M. *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544-1548 (1999).
4. Ahmad,F. & Goldstein,B.J. Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells. *J. Biol. Chem.* 272, 448-457 (1997).
5. Klamann,L.D. *et al.* Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 20, 5479-5489 (2000).
6. Zabolotny,J.M. *et al.* Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5187-5192 (2001).
7. Ren,J.M. *et al.* Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. *Diabetes* 47, 493-497 (1998).
8. Dubois,M.J. *et al.* The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nat. Med.* 12, 549-556 (2006).
9. Zhang,J., Somani,A.K. & Siminovitch,K.A. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin. Immunol.* 12, 361-378 (2000).
10. Kozlowski,M. *et al.* Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J. Exp. Med.* 178, 2157-2163 (1993).
11. Shultz,L.D. *et al.* Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 73, 1445-1454 (1993).
12. Haider,S.R., Wang,W. & Kaufman,S.J. SV40 T antigen inhibits expression of MyoD and myogenin, up-regulates Myf-5, but does not affect early expression of desmin or alpha 7 integrin during muscle development. *Exp. Cell Res.* 210, 278-286 (1994).

13. Murata,H., Hruz,P.W. & Mueckler,M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* 16, 859-863 (2002).
14. Acsadi,G. *et al.* A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum. Mol. Genet.* 3, 579-584 (1994).
15. Feero,W.G. *et al.* Viral gene delivery to skeletal muscle: insights on maturation-dependent loss of fiber infectivity for adenovirus and herpes simplex type 1 viral vectors. *Hum. Gene Ther.* 8, 371-380 (1997).
16. Huard,J. *et al.* Differential short-term transduction efficiency of adult versus newborn mouse tissues by adenoviral recombinants. *Exp. Mol. Pathol.* 62, 131-143 (1995).
17. Kass-Eisler,A. *et al.* The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 1, 395-402 (1994).
18. Nalbantoglu,J. *et al.* Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle. *J. Virol.* 75, 4276-4282 (2001).
19. Green,M.C. & Shultz,L.D. Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J. Hered.* 66, 250-258 (1975).
20. Shultz,L.D., Coman,D.R., Bailey,C.L., Beamer,W.G. & Sidman,C.L. "Viable motheaten," a new allele at the motheaten locus. I. Pathology. *Am. J. Pathol.* 116, 179-192 (1984).
21. Duchesne,C., Charland,S., Asselin,C., Nahmias,C. & Rivard,N. Negative regulation of beta-catenin signaling by tyrosine phosphatase SHP-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 14274-14283 (2003).
22. Henderson,B.R. & Fagotto,F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* 3, 834-839 (2002).
23. Atcha,F.A., Munguia,J.E., Li,T.W., Hovanes,K. & Waterman,M.L. A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *J. Biol. Chem.* 278, 16169-16175 (2003).
24. Oshel,K.M., Knight,J.B., Cao,K.T., Thai,M.V. & Olson,A.L. Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275, 23666-23673 (2000).
25. Bedard,S., Marcotte,B. & Marette,A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 325 ( Pt 2), 487-493 (1997).



**Figures****Figure 1**

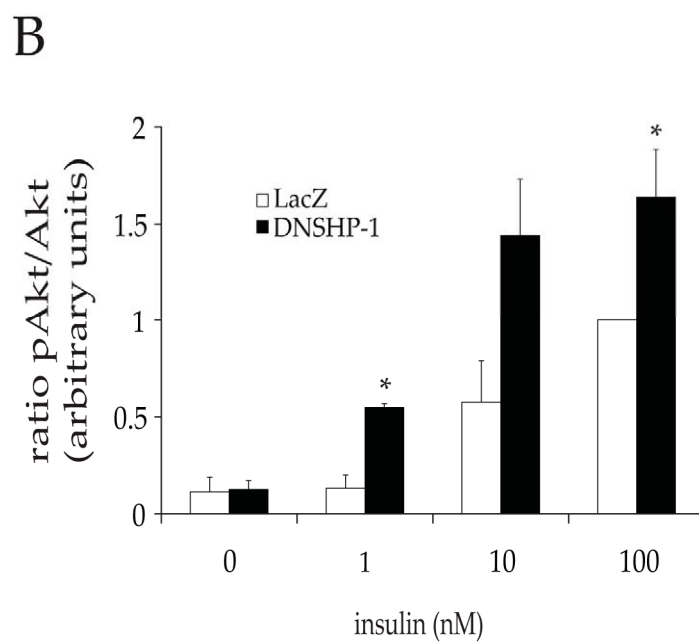
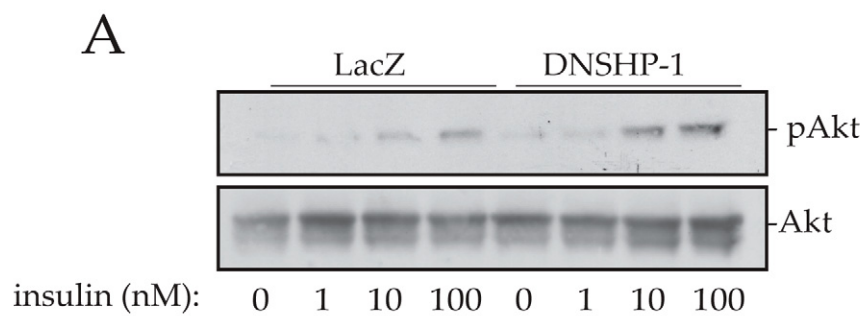


Figure 2

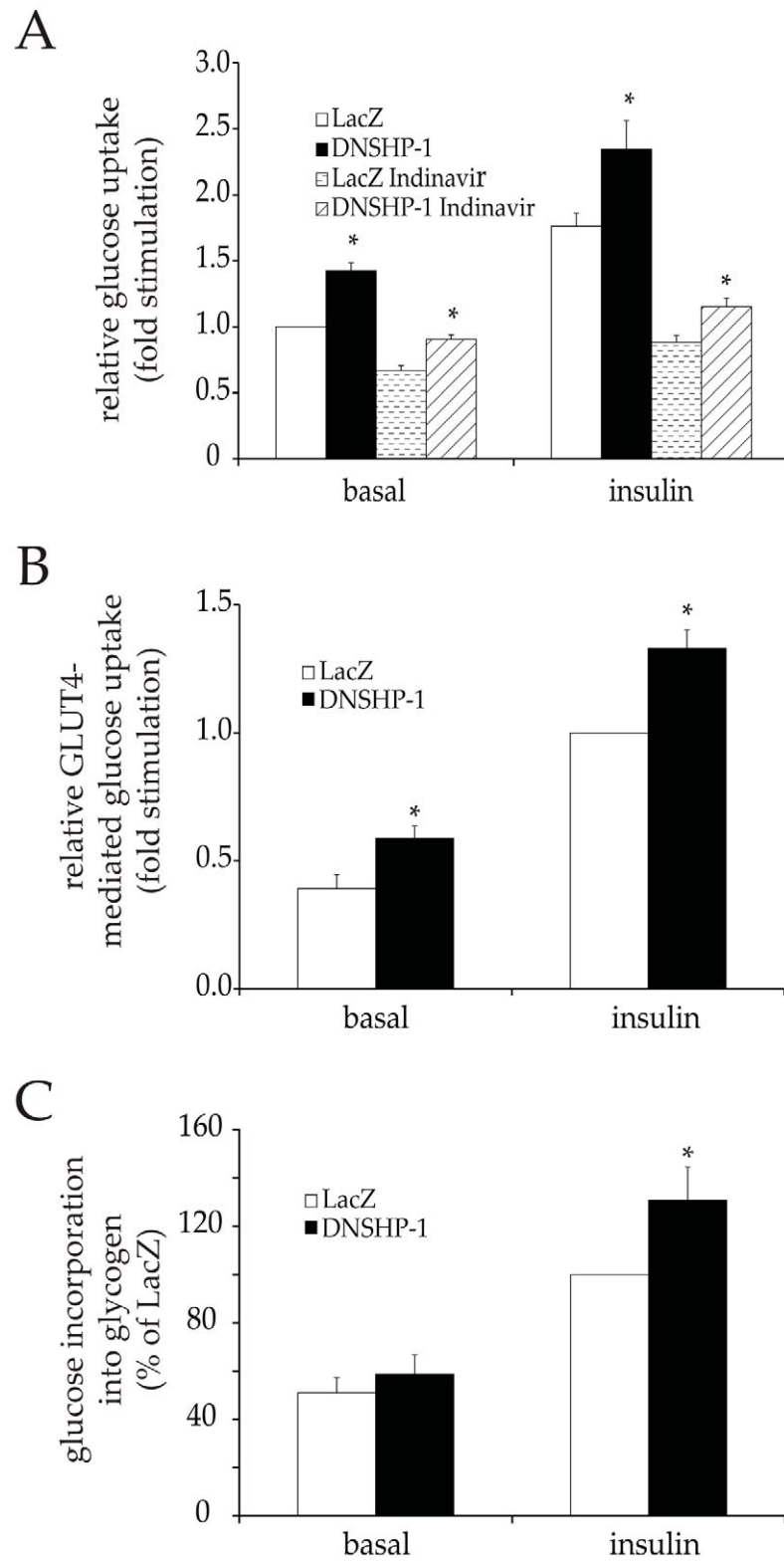


Figure 3



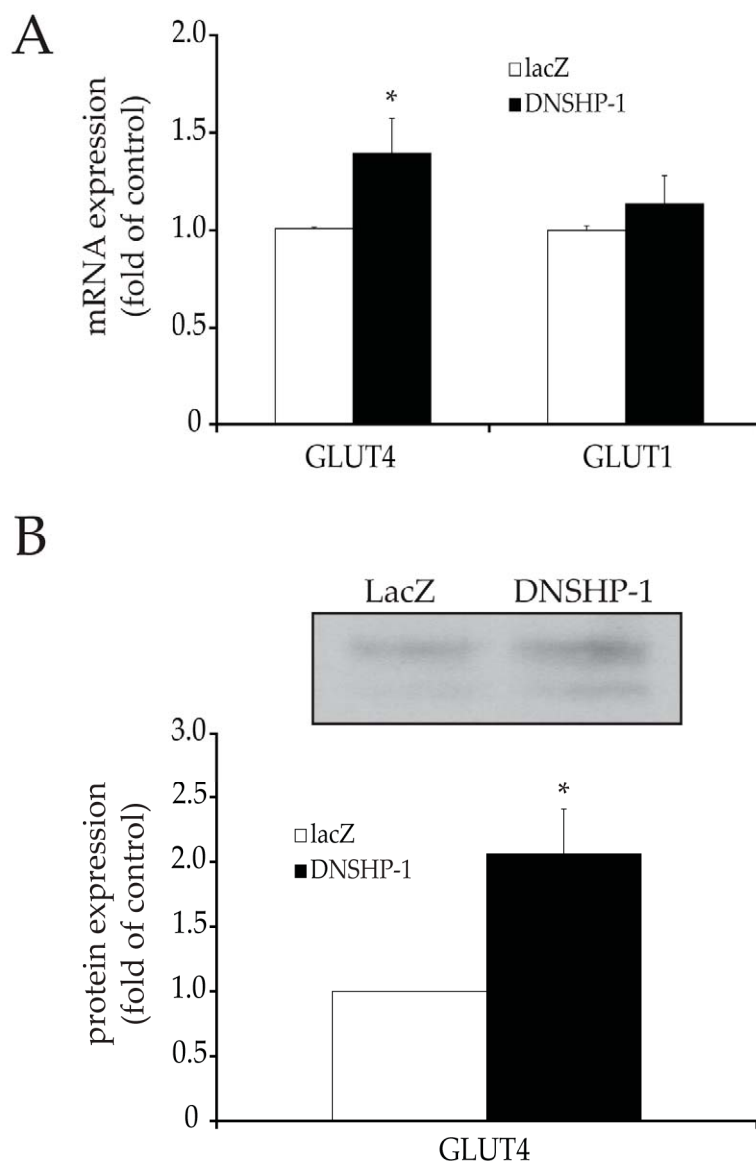


Figure 4

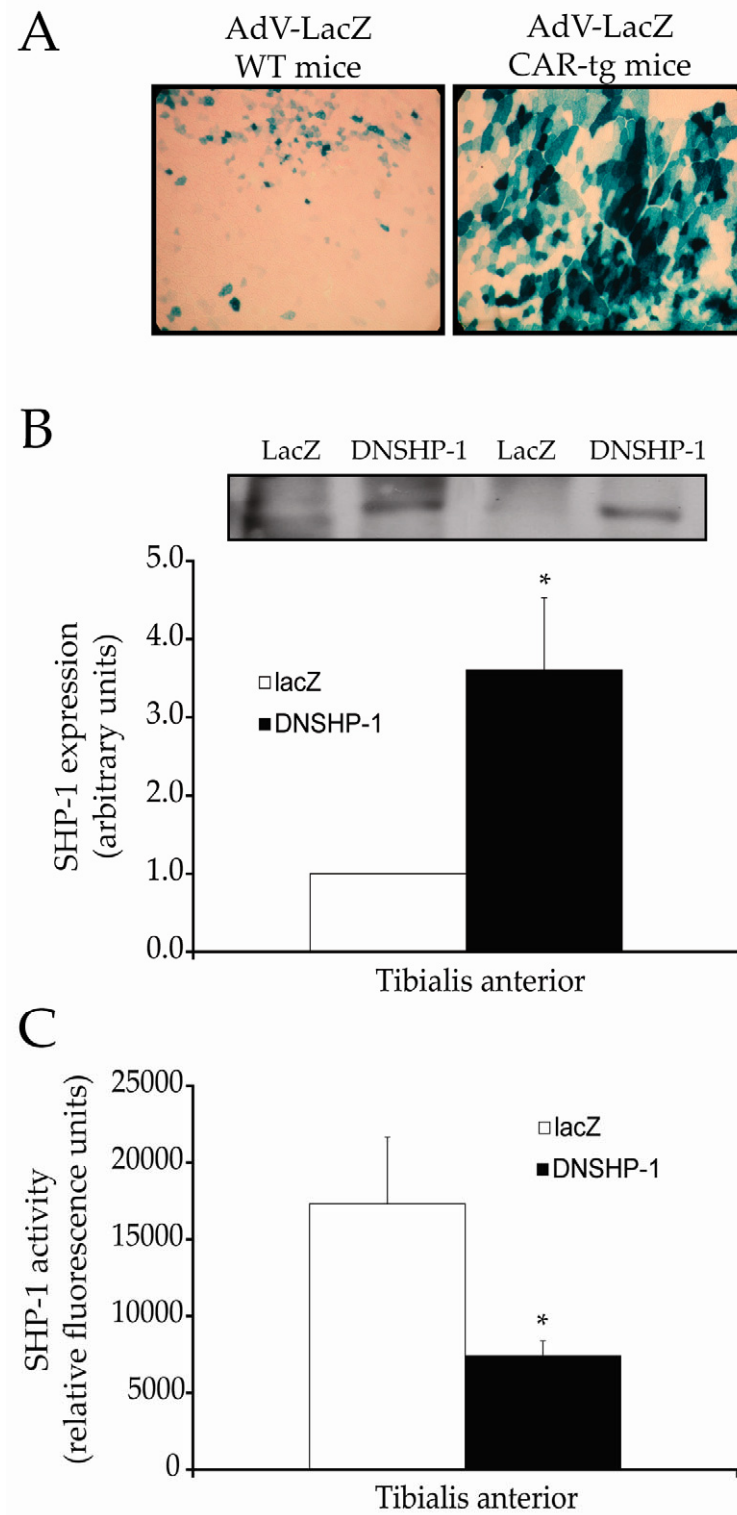


Figure 5

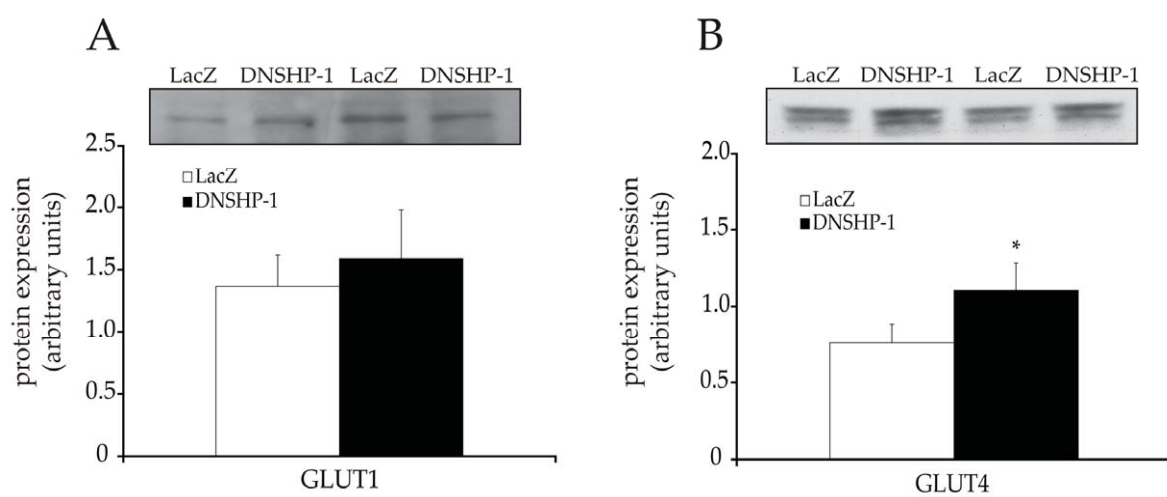


Figure 6

## ***Legends to figures***

**Figure 1.** Expression of DNSHP-1. After 5 days in differentiation medium, L6 cells grown in 6-well culture dishes were incubated 24 h with  $2 \times 10^{10}$  (lane 1 and 4),  $4 \times 10^{10}$  (lane 2 and 5) and  $6 \times 10^{10}$  (lane 3 and 6) adenoviral particles encoding lacZ or DNSHP-1. Following an additional 24 h in fresh medium, fully differentiated myotubes were subjected to X-Gal staining (**A**) and western blot analysis (**B**) with anti-SHP-1 and anti-desmin antibody.

**Figure 2.** Effect of DNSHP-1 on insulin signaling. L6 cells were infected with adenovirus encoding lacZ or DNSHP-1. Myotubes were serum-starved for 4 h and then incubated for 10 min in the absence or presence of increasing dose of insulin. Lysates were subjected to western blot analysis with anti-Akt and phospho-specific (ser473) antibody (**A**). Results are expressed as a ratio P-Akt/Akt (**B**) and are the means  $\pm$  SD of 2-5 different experiments. \*  $p < 0.05$  compared to lacZ.

**Figure 3.** Effect of DNSHP-1 on glucose transport and glycogen synthesis. L6 cells were infected with adenovirus encoding lacZ or DNSHP-1. Myotubes were serum-starved for 4 h prior to a 30 min-incubation with or without insulin (100 nM) followed by [ $^3\text{H}$ ]2-deoxy-glucose uptake determination in the absence or presence of 100  $\mu\text{M}$  indinavir (**A**). Relative inhibition of glucose transport by indinavir was calculated and expressed as GLUT4-mediated glucose transport (**B**). Subsequent to starvation, assessment of [ $^{14}\text{C}$ ]D-glucose incorporation into glycogen (**C**) during a 2-h period was performed in the absence or presence of insulin (100 nM). Results are means  $\pm$  SD of 7-10 different experiments. \*  $p < 0.05$  compared to lacZ.

**Figure 4.** Regulation of GLUT4 expression by DNSHP-1. L6-G4myc cells were infected with adenovirus encoding lacZ or DNSHP-1. Expression of GLUT1 and GLUT4 was assessed by reverse transcription reaction followed by real-time quantitative PCR (**A**) and/or by western blot analysis (**B**) with anti-GLUT4 antibody. Results are means  $\pm$  SD of 4-7 different experiments. \*  $p < 0.05$  compared to lacZ.

**Figure 5.** Expression of DNSHP-1 in skeletal muscle of CAR-mice. Tibialis anterior muscle of mice overexpressing CAR were injected with adenovirus encoding lacZ or DNSHP-1. After 7 days, mice were fasted for 5 h before sacrifice. Some muscles were mounted for cryosection and subjected to X-Gal staining **(A)**. Muscle lysates were analysed by western blot with anti-SHP-1 antibody **(B)**. SHP-1 was immunoprecipitated from 250µg of muscle lysate to assess PTPase activity using RediPlate® **(C)**. Results are the means  $\pm$  SD of 12 different animals. \*  $p < 0.05$  compared to lacZ.

**Figure 6.** Regulation of GLUT4 expression in vivo. Tibialis anterior muscle of mice overexpressing CAR were injected with adenovirus encoding lacZ or DNSHP-1. Muscle lysates were subjected to western blot analysis using anti-GLUT1 **(A)** and anti-GLUT4 **(B)** antibodies. Results are the means  $\pm$  SD of 12 different animals. \*  $p < 0.05$  compared to lacZ.

## Conclusion générale

Pour remplir ses fonctions comme entre autre maintenir l'homéostasie glycémique, l'insuline emprunte plusieurs sentiers de signalisation. Dès la liaison à son récepteur, l'insuline initie différentes cascades de phosphorylation qui mèneront à diverses réponses cellulaires. Brièvement, la voie PI3K diminue la production hépatique de glucose et augmente le transport du glucose dans le muscle et le tissu adipeux. Parallèlement, l'activation de la p38 MAPK est aussi nécessaire à l'augmentation de l'activité intrinsèque de GLUT4 pour maximiser le transport du glucose. De cette façon, l'insuline favorise l'utilisation du glucose et son entreposage sous forme d'acide gras, dans le tissu adipeux, ou de glycogène, dans le foie et le muscle squelettique.

Le contrôle de l'ampleur et de la durée du signal insulinique est tout aussi important que son initiation et sa propagation. En effet, une signalisation exagérée provoquera des réponses cellulaires et physiologiques tout aussi néfastes qu'un signal insuffisant. De plus, une voie d'activation trop longuement activée s'atténue et se désensibilise, ce qui pourrait en rendre difficile l'initiation à des moments (*i.e.* des glycémies) plus importants.

Plusieurs éléments de signalisation sont donc mandatés pour modérer la cascade de signalisation. Des boucles de rétroaction négative permettent entre autre une autorégulation de l'insuline. Par exemple, la voie PI3K/Akt exploite les protéines mTOR et S6K1 pour mener la phosphorylation et l'inactivation des fonctions d'IRS-1. De plus, la signalisation de l'insuline, grandement propagée par l'action de kinases, est freinée par des lipides phosphatases (SHIP-1, PTEN et SKIP) et des PTPs (LAR, PTP-1B et LMW-PTP). Nos études ont permis d'établir que la PTP SHP-1 est aussi un régulateur négatif de l'action de l'insuline dans le métabolisme du glucose.

C'est au premier chapitre que nous apportons les premières évidences que SHP-1 régule l'action de l'insuline sur l'utilisation du glucose. Nous avons d'abord montré que les souris *me<sup>x</sup>*, qui expriment une protéine SHP-1 fonctionnellement déficiente, sont particulièrement tolérantes au glucose et sensibles à l'insuline comparativement aux souris contrôles. Pour expliquer ce gain, nous avons

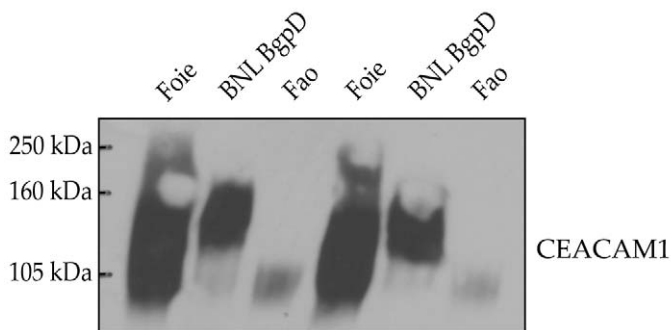
ensuite mis en évidence l'augmentation de la signalisation du récepteur de l'insuline via la voie IRS/PI3K/Akt dans le foie et le muscle squelettique. Ensuite, pour isoler l'effet métabolique de SHP-1 des complications immunitaires des souris *me<sup>v</sup>*, nous avons profité de l'hépatotropisme des AdV pour diminuer l'activité SHP-1 spécifiquement dans le foie de souris normales par l'expression d'un mutant catalytiquement inerte de SHP-1 (DNSHP-1) ou par interférence des ARNs. En plus d'appuyer le phénotype *me<sup>v</sup>*, ce transfert de gènes nous a permis de démontrer qu'une déficience en activité SHP-1 augmente aussi la phosphorylation sur des résidus tyrosine de CEACAM1, et la clairance de [<sup>125</sup>I]-insuline dans les souris, et *in vitro*, dans une lignée d'hépatocytes. Ces découvertes décrivent un nouveau rôle pour SHP-1 dans la régulation de l'homéostasie du glucose par la modulation de la signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique, mais aussi par la clairance de l'insuline.

Dans l'optique où nous voudrions éventuellement traiter un patient diabétique en inhibant d'une quelconque façon l'activité SHP-1 dans le foie, il est indéniable que l'amélioration de la signalisation de l'insuline lui procurerait bien des avantages. Par contre, les bienfaits de l'augmentation de l'internalisation et de la clairance de l'insuline sont moins évidents. D'un côté, nous pouvons supposer qu'une augmentation de l'internalisation favoriserait la signalisation de l'insuline en permettant la pleine activation du récepteur, tout en lui permettant de rejoindre plus efficacement ses substrats<sup>49</sup>. En ce sens, l'équipe du Dr Robert Faure a récemment démontré que, chez les souris *me<sup>v</sup>*, l'accumulation du récepteur de l'insuline phosphorylé dans le compartiment endosomal semble être maximale sur une plus longue période (15 min versus 2 min chez les souris contrôles), ce qui pourrait permettre de prolonger et d'accentuer la propagation du signal insulinaire (Fiset *et al.* manuscrit non publié). Ainsi, le défaut de clairance de l'insuline observé chez les patients obèses pourrait donc en partie expliquer la résistance à l'insuline<sup>70</sup>. De plus, il est logique de croire que cette diminution de la clairance contribue à l'apparition, ou du moins à la progression de l'hyperinsulinémie. Toutefois, est-ce que cette contribution à l'augmentation de l'insulinémie favorise la désensibilisation du récepteur de l'insuline, et donc l'état de résistance à l'insuline, ou est-ce simplement un effort légitime secourant la masse  $\beta$  pancréatique qui tente de compenser pour la résistance à l'insuline? On peut donc se demander : Si nous augmentons la clairance de l'insuline chez un patient diabétique ou intolérant au glucose, allons-nous améliorer sa condition en ramenant à la normale une fonction hépatique altérée, ou allons-nous plutôt aggraver le développement de son

diabète en augmentant la demande face aux cellules  $\beta$  déjà en décompensation (voir physiopathologie du diabète de type 2, section 4.1.1). Il serait donc intéressant d'approfondir nos connaissances de l'internalisation de l'insuline pour distinguer son importance dans la signalisation versus la clairance proprement dite. Pour ce faire, nous pourrions, d'une part, tenter de contrebalancer la clairance, *i.e.* la diminution de l'insulinémie, par une infusion constante d'insuline pour écarter son rôle dans la signalisation, et d'autre part, inhiber la signalisation par les récepteurs internalisés sans affecter l'internalisation et la clairance. Cette dernière proposition est certainement un peu plus difficile à concevoir *in vivo*. Nous pourrions possiblement y arriver en surexprimant une PTP exclusivement endosomales, mais qui devrait d'abord être identifiée. *In vitro*, nous pourrions inhiber l'acidification vacuolaire avec de la bafilomycin<sup>56</sup>, démanteler l'appareil endosomal par l'utilisation d'agents endosomolytiques (exemple dans <sup>566</sup>), ou plus simplement, exprimer un récepteur de l'insuline muté, incapable d'internaliser<sup>57</sup>.

Au chapitre II, nous nous sommes attardés à mieux caractériser les mécanismes de régulations de la sensibilité à l'insuline par SHP-1 dans le foie. Nous avons d'abord confirmé que CEACAM1 est hyperphosphorylé lorsque DNSHP-1 est exprimé dans les Fao, le modèle hépatocellulaire que nous avons choisi. Par contre, aucune modulation de l'internalisation du récepteur de l'insuline n'a pu être observée (résultats non-présentés). Nous croyons que CEACAM1 n'est pas suffisamment abondant dans cette lignée pour y exercer un rôle important (figure 9). Aussi, CEACAM1 provenant de l'extrait de Fao est détecté à un plus faible poids moléculaire, ce qui suggère une glycosylation alternative de son domaine extracellulaire<sup>567</sup> qui peut influencer la régulation de l'internalisation du récepteur de l'insuline dans cette lignée cellulaire. Enfin, nous savons que les deux isoformes du récepteur de l'insuline possèdent des cinétiques d'internalisation distinctes<sup>44-46</sup>, et que CEACAM1 exerce principalement ses effets via la récepteur-A<sup>568</sup>. Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité qu'un profil d'expression du récepteur de l'insuline différent dans ce type cellulaire puisse expliquer l'absence de modulation. Puisque l'activité de la synthase d'acide gras est aussi affectée par la phosphorylation de CEACAM1<sup>80</sup>, peut-être trouverions-nous là une implication physiologique d'une augmentation de la phosphorylation de CEACAM1 dans cette lignée cellulaire.



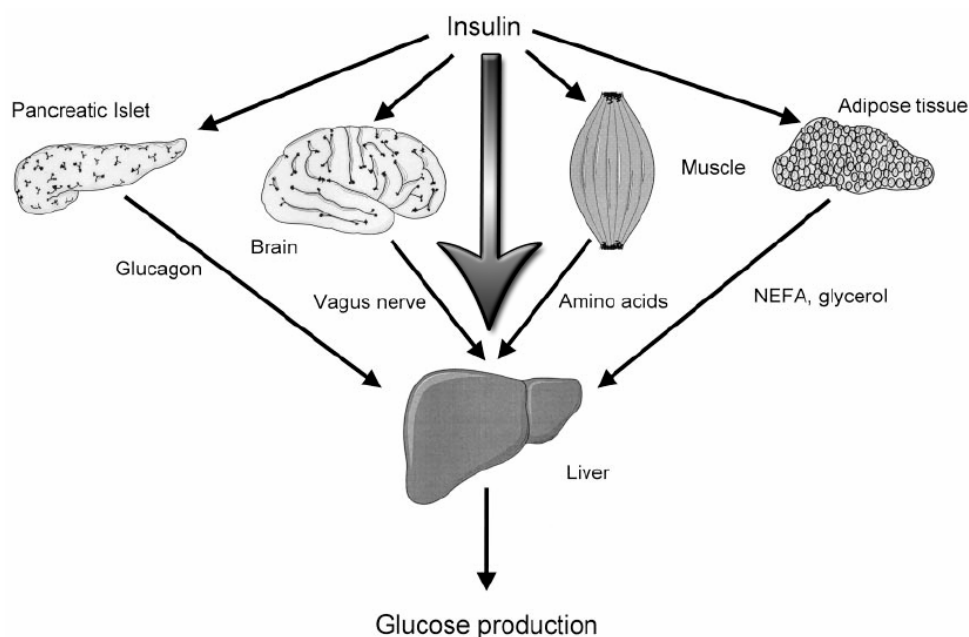


**Figure 9.** Expression de CEACAM1 analysée par immunobuvardage dans les Fao comparée au foie et aux hépatocytes BNL-CL2 stablement transfectées avec CEACAM1 (BNL BgpD : modèle cellulaire utilisé au chapitre 1).

D'un autre côté, il est bien connu que les Fao sont capables de croître en absence de glucose, ce qui confirme la capacité d'en produire, et donc la présence des enzymes gluconéogéniques, PEPCK et G6P par exemple. Plusieurs pistes nous ont poussés à croire que DNSHP-1 pouvait moduler l'expression de ces enzymes. Premièrement, de tous les tissus sensibles à l'insuline, c'est dans le foie que SHP-1 est le plus fortement exprimée<sup>515</sup>, lui suggérant un rôle important. En ce sens, nous avons montré au chapitre I que la production hépatique de glucose est réduite dans les souris *me<sup>v</sup>*. Enfin, nous savions que STAT3, un facteur de transcription très important dans la régulation de la gluconéogenèse<sup>520,521</sup>, est modulé par SHP-1<sup>522,523</sup>. Par contre, dans les conditions où nous avons examiné l'expression des ARNm de PEPCK et G6P, DNSHP-1 n'a montré aucun effet. En contrepartie, nous avons remarqué une augmentation de la quantité de glycogène synthase ainsi qu'une diminution de sa phosphorylation (synonyme d'activation). Nous avons donc proposé qu'une augmentation de la synthèse de glycogène, et donc une diminution de la glycogénolyse, puisse expliquer la diminution de la production hépatique de glucose observée dans les souris *me<sup>v</sup>* plutôt qu'une diminution de la gluconéogenèse.

Toutefois, nous ne pouvons complètement exclure la possibilité que la gluconéogenèse ne puisse corrélée aussi avec une diminution de l'activité SHP-1. En effet, nous avons comparé des niveaux d'ARNm à un seul moment, alors de la production, l'accumulation, voire même la dégradation d'ARNm est un processus qui peut s'étaler sur plusieurs heures. De plus, les ARNm sont en soit

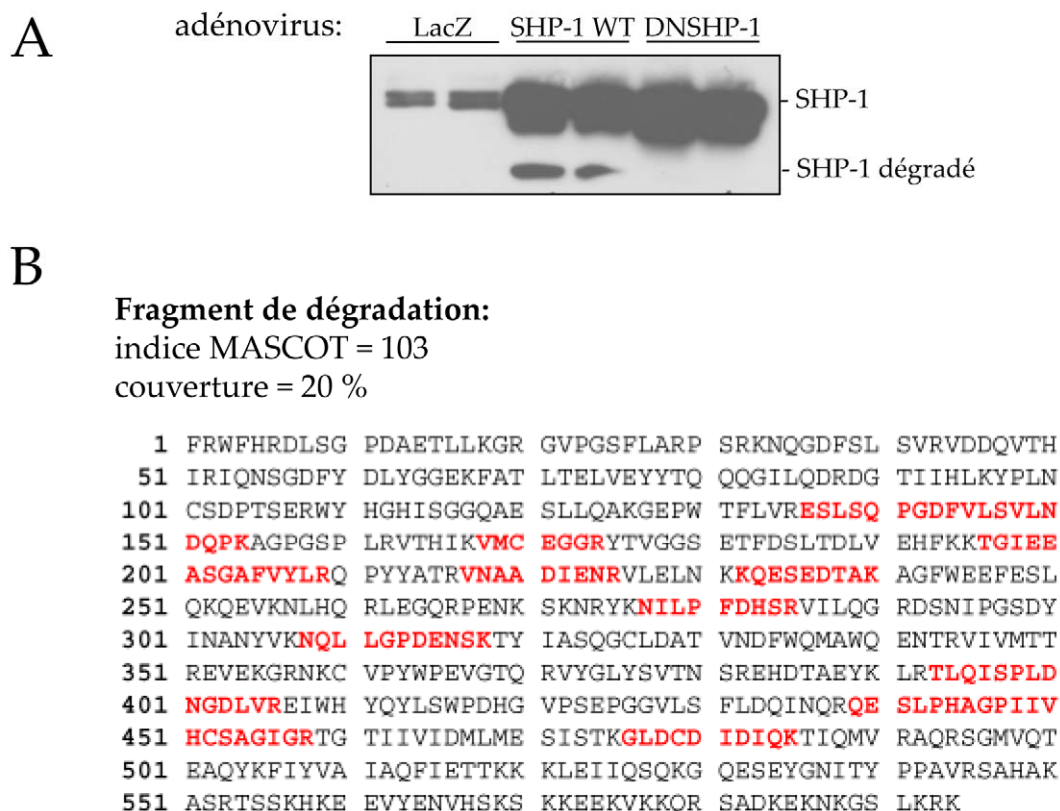
inopérants, n'étant seulement que les précurseurs de protéines. Donc, entre la synthèse d'un ARNm et la production de glucose, il est possible que la traduction, l'activation et la dégradation de la protéine fassent varier la réponse cellulaire. Enfin, la gluconéogenèse n'est pas seulement régulée par une action directe de l'insuline. En agissant sur les organes périphériques, l'insuline réussit à moduler la production hépatique de glucose (voir figure 10). En effet, son action sur le muscle squelettique et le tissu adipeux peut faire varier l'apport en substrats gluconogéniques au foie, tel les acides aminés, les acides gras et le glycérol. Puisque les souris *me<sup>v</sup>* possèdent très peu de tissu adipeux, cette hypothèse prend un deuxième sens. De plus, en inhibant la sécrétion de glucagon par le pancréas, l'insuline peut aussi réduire la production hépatique de glucose. Enfin, une action centrale de l'insuline sur la production hépatique de glucose a plus récemment été démontrée<sup>12</sup>. Il est donc probable que la diminution de la production hépatique de glucose observée chez les souris *me<sup>v</sup>* soit, en plus d'une diminution de la glycogénolyse, une conséquence de la sensibilité périphérique et centrale à l'insuline, surtout si on se rappelle que la déficience en activité SHP-1 chez ces souris rayonne dans tout l'organisme.



**Figure 10.** Action de l'insuline sur la production hépatique de glucose. L'insuline inhibe la production de glucose par une action directe, et indirecte. La sensibilité à l'insuline du cerveau et des tissus périphériques influence aussi la production hépatique de glucose. Tiré et adapté de Girard, 2006 <sup>12</sup>

Dans cette étude, nous avons testé en parallèle l'effet de la surexpression de SHP-1 sous sa forme sauvage. Bien sûr, nous attendions des effets contraires à ceux observés lors de l'expression de DNSHP-1. À notre surprise, la surexpression de SHP-1 ne causa aucun effet significatif, et avait plutôt une faible tendance à mimer les effets de DNSHP-1. Puisque l'activité SHP-1 est régulée de diverses façons (interaction intramoléculaire, phosphorylation, localisation subcellulaire et interaction avec des lipides) il est probable que son niveau d'expression ne suffise à augmenter son activité. Nous avons même constaté une forte dégradation de SHP-1 lors de sa surexpression, suggérant un nouveau mécanisme d'autorégulation de son activité puisque cette dégradation n'est pas observée lors de la surexpression du mutant inactif DNSHP-1 (voir figure 11). Il serait donc très intéressant de surexprimer un mutant constitutivement actif de notre PTP. Dans le cas de SHP-2 par exemple, une mutation dans le domaine SH2<sub>N</sub> d'un résidu impliqué dans son interaction avec le domaine PTP a rompu l'inhibition intramoléculaire par ce domaine (mutation du glutamate 76 pour une alanine (E76A))<sup>569</sup>. Dans le cas de SHP-1, la mutation équivalente est E74A. Nous supposons donc que son expression, à l'inverse de DNSHP-1, limiterait efficacement l'action de l'insuline. De plus, si notre hypothèse d'autorégulation est bonne, nous devrions observer une très forte dégradation de ce mutant SHP-1. Aussi, puisque SHP-1 est un substrat de la calpaïne<sup>570</sup>, et semble lié à la dégradation par les protéasome<sup>523</sup>, il serait très intéressant d'essayer de limiter la dégradation de SHP-1 avec de la calpeptin et du MG132, des inhibiteurs de la calpaïne et des protéasomes, respectivement.

Enfin, sans le négliger, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline a aussi été observée dans le muscle squelettique des souris *me<sup>v</sup>*. Nous avons démontré que la signalisation via la voie PI3K est augmentée, ainsi que le transport du glucose *ex vivo*, lorsque comparé aux souris contrôles. Par contre, en repensant à la résistance à l'insuline observée dans le muscle des souris invalidées pour le récepteur de l'insuline spécifiquement dans le foie<sup>106</sup>, nous nous sommes demandé si ces bienfaits ne pouvaient être, à l'inverse, qu'une répercussion de l'augmentation de la sensibilité dans le foie, où SHP-1 y est plus abondant<sup>515</sup>.



**Figure 11.** Dégradation de SHP-1. (A) L'analyse de SHP-1 par immunobuvardage a révélé une bande de faible poids moléculaire lors de la surexpression de SHP-1 sous sa forme sauvage (SHP-1 WT). (B) Une digestion à la trypsine et l'analyse par spectrométrie de masse a permis de confirmer que cette bande est un produit de dégradation de SHP-1. Les fragments tryptiques retrouvés sont représentés en rouge sur la séquence complète de SHP-1.

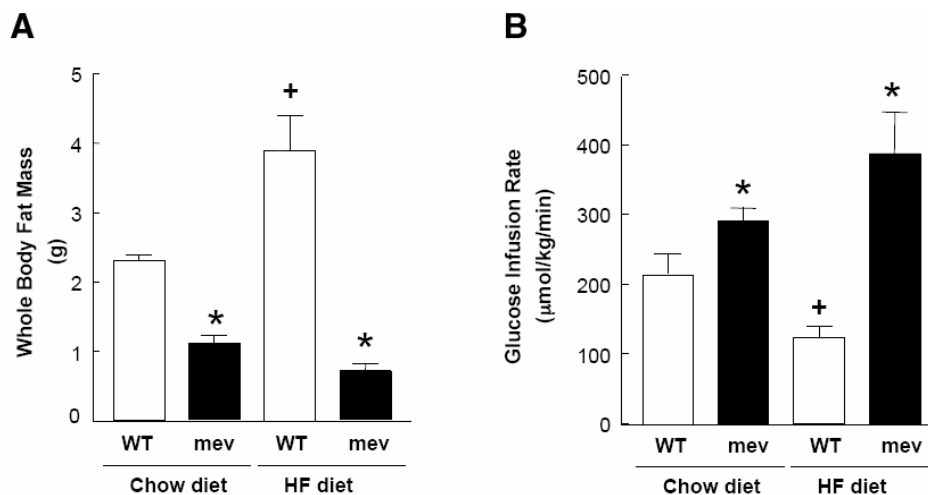
Nous avons donc voulu confirmer, au troisième chapitre, s'il existait un mécanisme indépendant de sensibilisation à l'insuline par SHP-1 dans le muscle squelettique. Nous avons exprimé DNSHP-1 dans les myocytes L6, une lignée cellulaire déjà bien caractérisée. Dans un premier temps, nous avons pu observer que l'expression de DNSHP-1, comparée à l'expression du gène contrôle lacZ, favorisait la signalisation de l'insuline via Akt, et augmentait subséquemment le transport du glucose et la synthèse du glycogène. De plus, nous avons identifié un nouveau mécanisme de sensibilisation à l'insuline emprunté par une PTP. En effet, nous avons observé que DNSHP-1 provoquait l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine GLUT4, le principal transporteur de glucose sensible à l'insuline. Les souris transgéniques CAR<sup>565</sup> nous ont permis de tester notre

construction virale dans le muscle *in vivo*, et ainsi confirmer cette augmentation de l'expression de GLUT4.

Dans le but de vérifier si la translocation de GLUT4, une étape importante à l'augmentation du transport du glucose, est augmentée par l'expression de DNSHP-1, nous l'avons aussi exprimé dans les myocytes L6-GLUT4myc<sup>354,355</sup>. De façon surprenante, nous n'avons observé aucune modulation de la translocation par notre mutant DNSHP-1, malgré l'augmentation de la signalisation via Akt. Cependant, il faut garder en tête que la mesure de la translocation de GLUT4 dans les L6-GLUT4myc concerne la translocation de GLUT4myc exogène. Donc, dans un système où l'expression de GLUT4 endogène est affectée, cette méthode perd beaucoup de rigueur. Donc, avant de conclure que l'augmentation de l'expression de GLUT4 est le seul mécanisme expliquant l'augmentation du transport du glucose, il faudra mesurer la translocation par une méthode plus appropriée. De plus, il faudra examiner l'activation de la voie p38 MAPK pour évaluer l'activité intrinsèque de ce transporteur. Une analyse de la voie TC10 pourrait aussi apporter des indices intéressants puisque cette voie de signalisation est impliquée dans la translocation de GLUT4, mais aussi dans l'internalisation du récepteur de l'insuline, où c-Cbl est responsable de l'ubiquitination qui régule ce processus<sup>248,571-573</sup>.

En conclusion, nos travaux permettent d'inscrire officiellement SHP-1 à la liste des régulateurs de l'action de l'insuline et du métabolisme du glucose. Nous avons pu démontrer, tant *in vitro* qu'*in vivo*, que cette PTP régule la réponse insulinique dans différents tissus, par différents mécanismes. Toutefois, il est toujours incertain si, comme dans le cas de LAR et PTP-1B<sup>430-434,492</sup>, SHP-1 participe à la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Malgré tout, il nous est permis de croire que SHP-1 représente une cible thérapeutique très intéressante pour traiter la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 secondaire à l'obésité. Par exemple, pour évaluer l'impact de la déficience en activité SHP-1 sur la sensibilité à l'insuline durant l'obésité, des souris *me<sup>v</sup>* ont été soumises à un régime riche en gras, reconnu pour induire l'obésité et le diabète. Des résultats préliminaires montrent que ni l'adiposité, ni la résistance à l'insuline ne sont augmentées par ce régime diabétogénique (voir figure 12). Comparé aux souris contrôles, l'augmentation de la dépense énergétique, mesurée par calorimétrie indirecte, explique en partie cette « inertie métabolique » qui leur permet de maintenir une homéostasie glycémique et lipidique. En attendant de mieux comprendre les mécanismes

impliqués, nous pouvons penser que la sensibilité à la leptine, connue pour contrôler la dépense énergétique, est augmentée par la déficience en activité SHP-1. D'ailleurs, une étude récente démontre bien que STAT3 est essentiel à l'action métabolique de la leptine<sup>521</sup>, et nous savons que l'activité de ce facteur de transcription est régulée par SHP-1<sup>522,523</sup>.



**Figure 12.** Sensibilité à l'insuline de souris *meV* soumise à un régime riche en gras. (A) Masse adipeuse totale (B) Taux d'infusion de glucose pendant un clamp hyperinsulinémique/ euglycémique. WT : souris contrôles, *meV* : souris *meV*, Chow diet : régime standard, HF diet : régime riche en gras. Tiré et adapté de Kim *et al.* 2004<sup>574</sup>

La déficience en SHP-1 permet donc d'éviter l'apparition des troubles liés à un régime riche en gras. Chez un patient déjà obèse et diabétique, l'inhibition de l'activité SHP-1 pourrait rétablir directement sa sensibilité à l'insuline, par les mécanismes proposés aux chapitres I-III, mais aussi indirectement en diminuant sa masse adipeuse. De plus, il est reconnu que la sécrétion de TNF- $\alpha$  par le tissu adipeux est augmentée chez les sujets obèses<sup>402</sup>. Cet excès de TNF- $\alpha$  est un médiateur important de la désensibilisation à l'insuline en provoquant la phosphorylation incontrôlée de certains résidus sérine d'IRS-1<sup>415-417</sup>. Des études effectuées sur des cellules endothéliales permettent de croire que l'activité de SHP-1 est aussi augmentée par le TNF- $\alpha$ , ce qui représenterait un second mécanisme de désensibilisation par le TNF- $\alpha$ . En effet, dans les cellules endothéliales HUVEC, le TNF- $\alpha$  réduit la phosphorylation du récepteur au VEGF, possiblement en augmentant l'association de SHP-1 à ce récepteur<sup>575</sup>. La démonstration est plus évidente dans les cellules endothéliales BAEC,

où le TNF- $\alpha$  augmente l'activité de SHP-1<sup>576</sup>. Si nous pouvions confirmer cette relation de causalité dans les tissus sensibles à l'insuline, nous pourrions présumer que la réduction de l'activité SHP-1 pourrait permettre d'améliorer la sensibilité à l'insuline des patients obèses efficacement en s'attaquant entre autre à cette facette du problème.

SHP-1 est donc une cible très intéressante pour le traitement du diabète de type 2 qui, toutefois, demandera une certaine finesse thérapeutique. Tout d'abord, SHP-1 possède une homologie de séquence de 55% avec SHP-2, une seconde PTP qui possède deux domaines SH2. Contrairement à SHP-1, SHP-2 est plus souvent vue comme un régulateur positif de différentes voies de signalisation<sup>577,578</sup>. Chez la souris, l'expression d'un dominant négatif de SHP-2 a provoqué la diminution de la signalisation de l'insuline dans la plupart des tissus sensibles à l'insuline et, par conséquent, l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline systémique<sup>579</sup>. Il est donc évident que d'envisager d'améliorer la sensibilité à l'insuline en inhibant SHP-1 demandera une considération envers SHP-2 qui devra être épargné par l'approche thérapeutique choisie. D'autre part, puisque SHP-1 possède des fonctions importantes dans le système immunitaire, il faudra cibler l'activité SHP-1 des tissus sensibles à l'insuline sans affecter celle des lignées hématopoïétiques. Présentement en cours, la génération de souris Cre/lox va permettre d'invalider SHP-1 dans différents tissus, un seul à la fois. Ainsi, nous pourrons mieux caractériser les mécanismes indépendants, différents et/ou similaires à chaque tissu, et en évaluer l'importance sur le métabolisme du glucose de l'organisme entier. À plus long terme, cette meilleure compréhension permettra de mieux cibler la thérapie. Éventuellement, avec l'avenue et les possibilités de la thérapie génique, nous pourrions judicieusement choisir d'exprimer un transgène thérapeutique sous la gouverne d'un promoteur spécifique au tissu qui apporterait le plus de bienfaits, tout en évitant les effets secondaires de son expression dans les cellules hématopoïétiques par exemple. De plus, ce type d'approche permettrait plus facilement d'éviter d'interférer avec les fonctions de SHP-2 qu'une approche pharmacologique plus classique.

## Bibliographie

### (pour l'introduction et la conclusion générale)

1. Jeremy M.Berg, John L.Tymoczko, Lubert Stryer & Neil D.Clarke. *In Biochemistry*. (2002).
2. James,D.E., Burleigh,K.M. & Kraegen,E.W. Time dependence of insulin action in muscle and adipose tissue in the rat in vivo. An increasing response in adipose tissue with time. *Diabetes* **34**, 1049-1054 (1985).
3. Jessen,N. & Goodyear,L.J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* **99**, 330-337 (2005).
4. Cahill,G.F., Jr. Starvation in man. *Clin. Endocrinol. Metab* **5**, 397-415 (1976).
5. Gerich,J.E., Meyer,C., Woerle,H.J. & Stumvoll,M. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* **24**, 382-391 (2001).
6. Petersen,K.F., Price,T., Cline,G.W., Rothman,D.L. & Shulman,G.I. Contribution of net hepatic glycogenolysis to glucose production during the early postprandial period. *Am. J. Physiol* **270**, E186-E191 (1996).
7. Petersen,K.F., Laurent,D., Rothman,D.L., Cline,G.W. & Shulman,G.I. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J. Clin. Invest* **101**, 1203-1209 (1998).
8. Sasaki,K. & Granner,D.K. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by insulin and cAMP: reciprocal actions on initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 2954-2958 (1988).
9. Streeper,R.S. *et al.* A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 11698-11701 (1997).
10. Dickens,M., Svitek,C.A., Culbert,A.A., O'Brien,R.M. & Tavaré,J.M. Central role for phosphatidylinositide 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J. Biol. Chem.* **273**, 20144-20149 (1998).
11. Cherrington,A.D., Edgerton,D. & Sindelar,D.K. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* **41**, 987-996 (1998).
12. Girard,J. The inhibitory effects of insulin on hepatic glucose production are both direct and indirect. *Diabetes* **55 Suppl 2**, S65-S69 (2006).
13. Kim,J.B. & Spiegelman,B.M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.* **10**, 1096-1107 (1996).
14. Le Lay,S., Lefrère,I., Trautwein,C., Dugail,I. & Krief,S. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J. Biol. Chem.* **277**, 35625-35634 (2002).
15. Diraison,F. *et al.* Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *J. Lipid Res.* **44**, 846-853 (2003).
16. Zhang,B. *et al.* Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **271**, 31771-31774 (1996).



17. Rosen,E.D. & Spiegelman,B.M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J. Biol. Chem.* **276**, 37731-37734 (2001).
18. Wu,Z., Xie,Y., Morrison,R.F., Bucher,N.L. & Farmer,S.R. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest* **101**, 22-32 (1998).
19. Holm,C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1120-1124 (2003).
20. Rebrin,K., Steil,G.M., Mittelman,S.D. & Bergman,R.N. Causal linkage between insulin suppression of lipolysis and suppression of liver glucose output in dogs. *J. Clin. Invest* **98**, 741-749 (1996).
21. Drivas,G.T., Shih,A., Coutavas,E., Rush,M.G. & D'Eustachio,P. Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol. Cell Biol.* **10**, 1793-1798 (1990).
22. Tremblay,F., Dubois,M.J. & Marette,A. Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci.* **8**, d1072-d1084 (2003).
23. Bass,J., Chiu,G., Argon,Y. & Steiner,D.F. Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J. Cell Biol.* **141**, 637-646 (1998).
24. Shoelson,S.E., White,M.F. & Kahn,C.R. Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J. Biol. Chem.* **263**, 4852-4860 (1988).
25. Herrera,R., Lebwohl,D., Garcia,d.H., Kallen,R.G. & Rosen,O.M. Synthesis, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of the human insulin receptor using a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* **263**, 5560-5568 (1988).
26. Villalba,M. *et al.* Another version of the human insulin receptor kinase domain: expression, purification, and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 7848-7852 (1989).
27. Vogt,B., Carrascosa,J.M., Ermel,B., Ullrich,A. & Haring,H.U. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 1013-1018 (1991).
28. Wilden,P.A. *et al.* The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J. Biol. Chem.* **267**, 13719-13727 (1992).
29. Kharitonov,A. *et al.* Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J. Biol. Chem.* **270**, 29189-29193 (1995).
30. Moodie,S.A., Alleman-Sposeto,J. & Gustafson,T.A. Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 11186-11193 (1999).
31. White,M.F. *et al.* Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* **54**, 641-649 (1988).
32. Kaburagi,Y. *et al.* Site-directed mutagenesis of the juxtamembrane domain of the human insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 16610-16622 (1993).
33. Levy-Toledano,R., Taouis,M., Blaettler,D.H., Gorden,P. & Taylor,S.I. Insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase. Demonstration that the p85 subunit binds directly to the COOH terminus of the insulin receptor in intact cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 31178-31182 (1994).

34. Van Horn,D.J., Myers,M.G., Jr. & Backer,J.M. Direct activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase by the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 29-32 (1994).
35. Myers,M.G., Jr. *et al.* Insulin receptor substrate-1 mediates phosphatidylinositol 3'-kinase and p70S6k signaling during insulin, insulin-like growth factor-1, and interleukin-4 stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 28783-28789 (1994).
36. Yamamoto-Honda,R. *et al.* Normal insulin receptor substrate-1 phosphorylation in autophosphorylation-defective truncated insulin receptor. Evidence that phosphorylation of substrates might be sufficient for certain biological effects evoked by insulin. *J. Biol. Chem.* **268**, 16859-16865 (1993).
37. Kaliman,P. *et al.* The insulin receptor C-terminus is involved in regulation of the receptor kinase activity. *Biochemistry* **32**, 9539-9544 (1993).
38. White,M.F. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40 Suppl 2**, S2-17 (1997).
39. Heidenreich,K.A. & Brandenburg,D. Oligosaccharide heterogeneity of insulin receptors. Comparison of N-linked glycosylation of insulin receptors in adipocytes and brain. *Endocrinology* **118**, 1835-1842 (1986).
40. Issad,T., Tavare,J.M. & Denton,R.M. Analysis of insulin receptor phosphorylation sites in intact rat liver cells by two-dimensional phosphopeptide mapping. Predominance of the tris-phosphorylated form of the kinase domain after stimulation by insulin. *Biochem. J.* **275 ( Pt 1)**, 15-21 (1991).
41. Fehlmann,M., Morin,O., Kitabgi,P. & Freychet,P. Insulin and glucagon receptors of isolated rat hepatocytes: comparison between hormone binding and amino acid transport stimulation. *Endocrinology* **109**, 253-261 (1981).
42. Gammeltoft,S. & Gliemann,J. Binding and degradation of 125I-labelled insulin by isolated rat fat cells. *Biochim. Biophys. Acta* **320**, 16-32 (1973).
43. Gammeltoft,S., Kristensen,L.O. & Sestoft,L. Insulin receptors in isolated rat hepatocytes. Reassessment of binding properties and observations of the inactivation of insulin at 37 degrees C. *J. Biol. Chem.* **253**, 8406-8413 (1978).
44. Breiner,M. *et al.* Heterogeneity of insulin receptors in rat tissues as detected with the partial agonist B29,B29'-suberoyl-insulin. *Mol. Pharmacol.* **44**, 271-276 (1993).
45. Yamaguchi,Y. *et al.* Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* **129**, 2058-2066 (1991).
46. Vogt,B., Carrascosa,J.M., Ermel,B., Ullrich,A. & Haring,H.U. The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 1013-1018 (1991).
47. Foti,M., Moukil,M.A., Dudognon,P. & Carpentier,J.L. Insulin and IGF-1 receptor trafficking and signalling. *Novartis. Found. Symp.* **262**, 125-141 (2004).
48. Bergeron,J.J., Cruz,J., Khan,M.N. & Posner,B.I. Uptake of insulin and other ligands into receptor-rich endocytic components of target cells: the endosomal apparatus. *Annu. Rev. Physiol* **47**, 383-403 (1985).
49. Di Guglielmo,G.M. *et al.* Insulin receptor internalization and signalling. *Mol. Cell Biochem.* **182**, 59-63 (1998).
50. Authier,F., Rachubinski,R.A., Posner,B.I. & Bergeron,J.J. Endosomal proteolysis of insulin by an acidic thiol metalloprotease unrelated to insulin degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* **269**, 3010-3016 (1994).

51. Levy, J.R. & Olefsky, J.M. Retroendocytosis of insulin in rat adipocytes. *Endocrinology* **119**, 572-579 (1986).
52. McClain, D.A. & Olefsky, J.M. Evidence for two independent pathways of insulin-receptor internalization in hepatocytes and hepatoma cells. *Diabetes* **37**, 806-815 (1988).
53. Knutson, V.P., Ronnett, G.V. & Lane, M.D. Rapid, reversible internalization of cell surface insulin receptors. Correlation with insulin-induced down-regulation. *J. Biol. Chem.* **258**, 12139-12142 (1983).
54. Doherty, J.J., Kay, D.G., Lai, W.H., Posner, B.I. & Bergeron, J.J. Selective degradation of insulin within rat liver endosomes. *J. Cell Biol.* **110**, 35-42 (1990).
55. Backer, J.M., Kahn, C.R. & White, M.F. The dissociation and degradation of internalized insulin occur in the endosomes of rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 14828-14835 (1990).
56. Balbis, A., Baquiran, G., Dumas, V. & Posner, B.I. Effect of inhibiting vacuolar acidification on insulin signaling in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 12777-12785 (2004).
57. Hamer, I. *et al.* An arginine to cysteine(252) mutation in insulin receptors from a patient with severe insulin resistance inhibits receptor internalisation but preserves signalling events. *Diabetologia* **45**, 657-667 (2002).
58. Li, C. *et al.* Insulin receptor kinase-associated phosphotyrosine phosphatases in hepatic endosomes: assessing the role of phosphotyrosine phosphatase-1B. *Endocrinology* **147**, 912-918 (2006).
59. Burgess, J.W. *et al.* Decrease in beta-subunit phosphotyrosine correlates with internalization and activation of the endosomal insulin receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 10077-10086 (1992).
60. Bernier, M., Liotta, A.S., Kole, H.K., Shock, D.D. & Roth, J. Dynamic regulation of intact and C-terminal truncated insulin receptor phosphorylation in permeabilized cells. *Biochemistry* **33**, 4343-4351 (1994).
61. Tavare, J.M., Ramos, P. & Ellis, L. An assessment of human insulin receptor phosphorylation and exogenous kinase activity following deletion of 69 residues from the carboxyl-terminus of the receptor beta-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 86-93 (1992).
62. Benzi, L. *et al.* Insulin degradation in vitro and in vivo: a comparative study in men. Evidence that immunoprecipitable, partially rebindable degradation products are released from cells and circulate in blood. *Diabetes* **43**, 297-304 (1994).
63. Duckworth, W.C., Fawcett, J., Tsui, B.T., Bennett, R.G. & Hamel, F.G. Biological activity of a fragment of insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 1019-1024 (2004).
64. Sato, H., Terasaki, T., Mizuguchi, H., Okumura, K. & Tsuji, A. Receptor-recycling model of clearance and distribution of insulin in the perfused mouse liver. *Diabetologia* **34**, 613-621 (1991).
65. Duckworth, W.C., Hamel, F.G. & Peavy, D.E. Hepatic metabolism of insulin. *Am. J. Med.* **85**, 71-76 (1988).
66. Harada, S., Loten, E.G., Smith, R.M. & Jarett, L. Nonreceptor mediated nuclear accumulation of insulin in H35 rat hepatoma cells. *J. Cell Physiol* **153**, 607-613 (1992).
67. Petruzzelli, L., Herrera, R., Garcia-Arenas, R. & Rosen, O.M. Acquisition of insulin-dependent protein tyrosine kinase activity during Drosophila embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **260**, 16072-16075 (1985).
68. Duckworth, W.C., Bennett, R.G. & Hamel, F.G. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr. Rev.* **19**, 608-624 (1998).

69. Yoshii,H. *et al.* Effects of portal free fatty acid elevation on insulin clearance and hepatic glucose flux. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **290**, E1089-E1097 (2006).
70. Valera Mora,M.E., Scarfone,A., Calvani,M., Greco,A.V. & Mingrone,G. Insulin clearance in obesity. *J. Am. Coll. Nutr.* **22**, 487-493 (2003).
71. Boden,G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **5**, 545-549 (2002).
72. Mittelman,S.D. *et al.* Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes* **49**, 2116-2125 (2000).
73. Han,E. *et al.* Differences in tissue-specific and embryonic expression of mouse Ceacam1 and Ceacam2 genes. *Biochem. J.* **355**, 417-423 (2001).
74. Najjar,S.M. *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of recombinant pp120/HA4, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* **34**, 9341-9349 (1995).
75. Soni,P., Lakkis,M., Poy,M.N., Fernstrom,M.A. & Najjar,S.M. The differential effects of pp120 (Ceacam 1) on the mitogenic action of insulin and insulin-like growth factor 1 are regulated by the nonconserved tyrosine 1316 in the insulin receptor. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3896-3905 (2000).
76. Najjar,S.M., Choice,C.V., Soni,P., Whitman,C.M. & Poy,M.N. Effect of pp120 on receptor-mediated insulin endocytosis is regulated by the juxtamembrane domain of the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 12923-12928 (1998).
77. Choice,C.V., Howard,M.J., Poy,M.N., Hankin,M.H. & Najjar,S.M. Insulin stimulates pp120 endocytosis in cells co-expressing insulin receptors. *J. Biol. Chem.* **273**, 22194-22200 (1998).
78. Formisano,P. *et al.* Receptor-mediated internalization of insulin. Potential role of pp120/HA4, a substrate of the insulin receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24073-24077 (1995).
79. Poy,M.N. *et al.* CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat. Genet.* **30**, 270-276 (2002).
80. Najjar,S.M. *et al.* Insulin acutely decreases hepatic fatty acid synthase activity. *Cell Metab* **2**, 43-53 (2005).
81. Park,S.Y. *et al.* Mechanism of glucose intolerance in mice with dominant negative mutation of CEACAM1. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **291**, E517-E524 (2006).
82. Dai,T. *et al.* Interaction between altered insulin and lipid metabolism in CEACAM1-inactive transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **279**, 45155-45161 (2004).
83. Maccari,F. *et al.* L-carnitine effect on plasma lipoproteins of hyperlipidemic fat-loaded rats. *Lipids* **22**, 1005-1008 (1987).
84. Accili,D. *et al.* Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* **12**, 106-109 (1996).
85. Joshi,R.L. *et al.* Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J.* **15**, 1542-1547 (1996).
86. Louvi,A., Accili,D. & Efstratiadis,A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev. Biol.* **189**, 33-48 (1997).

87. Nakae, J., Kido, Y. & Accili, D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr. Rev.* **22**, 818-835 (2001).
88. Duvillie, B. *et al.* Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 5137-5140 (1997).
89. Taylor, S.I. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* **41**, 1473-1490 (1992).
90. Wertheimer, E., Lu, S.P., Backeljauw, P.F., Davenport, M.L. & Taylor, S.I. Homozygous deletion of the human insulin receptor gene results in leprechaunism. *Nat. Genet.* **5**, 71-73 (1993).
91. Psiachou, H. *et al.* Leprechaunism and homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene. *Lancet* **342**, 924 (1993).
92. Krook, A., Brueton, L. & O'Rahilly, S. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with leprechaunism. *Lancet* **342**, 277-278 (1993).
93. Jospe, N., Kaplowitz, P.B. & Furlanetto, R.W. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene of a patient with severe congenital insulin resistance: leprechaunism and the role of the insulin-like growth factor receptor. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **45**, 229-235 (1996).
94. Taylor, S.I. *et al.* Extreme insulin resistance in association with abnormally high binding affinity of insulin receptors from a patient with leprechaunism: evidence for a defect intrinsic to the receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **55**, 1108-1113 (1982).
95. Bier, D.M. *et al.* Glucose kinetics in leprechaunism: accelerated fasting due to insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **51**, 988-994 (1980).
96. Backeljauw, P.F. *et al.* Effect of intravenous insulin-like growth factor I in two patients with leprechaunism. *Pediatr. Res.* **36**, 749-754 (1994).
97. Desbois-Mouthon, C. *et al.* Major circadian variations of glucose homeostasis in a patient with Rabson-Mendenhall syndrome and primary insulin resistance due to a mutation (Cys284-->Tyr) in the insulin receptor alpha-subunit. *Pediatr. Res.* **42**, 72-77 (1997).
98. Kitamura, T., Kahn, C.R. & Accili, D. Insulin receptor knockout mice. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 313-332 (2003).
99. Bruning, J.C. *et al.* A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* **2**, 559-569 (1998).
100. Shefi-Friedman, L. *et al.* Increased IGFR activity and glucose transport in cultured skeletal muscle from insulin receptor null mice. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **281**, E16-E24 (2001).
101. Wojtaszewski, J.F. *et al.* Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *J. Clin. Invest* **104**, 1257-1264 (1999).
102. Kim, J.K. *et al.* Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J. Clin. Invest* **105**, 1791-1797 (2000).
103. Lauro, D. *et al.* Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat. Genet.* **20**, 294-298 (1998).
104. Bluher, M. *et al.* Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* **3**, 25-38 (2002).

105. Abel, E.D. *et al.* Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729-733 (2001).
106. Michael, M.D. *et al.* Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* **6**, 87-97 (2000).
107. Fisher, S.J. & Kahn, C.R. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J. Clin. Invest* **111**, 463-468 (2003).
108. White, M.F., Maron, R. & Kahn, C.R. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* **318**, 183-186 (1985).
109. Araki, E. *et al.* Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1. Characterization of the cDNA, gene, and chromosomal localization. *Diabetes* **42**, 1041-1054 (1993).
110. Myers, M.G., Jr. *et al.* The pleckstrin homology domain in insulin receptor substrate-1 sensitizes insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **270**, 11715-11718 (1995).
111. Burks, D.J. *et al.* Heterologous pleckstrin homology domains do not couple IRS-1 to the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, 27716-27721 (1997).
112. Farhang-Fallah, J. *et al.* The pleckstrin homology (PH) domain-interacting protein couples the insulin receptor substrate 1 PH domain to insulin signaling pathways leading to mitogenesis and GLUT4 translocation. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7325-7336 (2002).
113. Songyang, Z. *et al.* Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536-539 (1995).
114. Sun, X.J. *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77 (1991).
115. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 85-96 (2006).
116. Sun, X.J. *et al.* Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* **377**, 173-177 (1995).
117. Inoue, G., Cheatham, B., Emkey, R. & Kahn, C.R. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J. Biol. Chem.* **273**, 11548-11555 (1998).
118. He, W. *et al.* Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 11641-11645 (1996).
119. Sawka-Verhelle, D., Tartare-Deckert, S., White, M.F. & Van Obberghen, E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J. Biol. Chem.* **271**, 5980-5983 (1996).
120. Valverde, A.M., Lorenzo, M., Pons, S., White, M.F. & Benito, M. Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **12**, 688-697 (1998).
121. Sciacchitano, S. & Taylor, S.I. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology* **138**, 4931-4940 (1997).

122. Fantin, V.R., Wang, Q., Lienhard, G.E. & Keller, S.R. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **278**, E127-E133 (2000).
123. Yamauchi, T. *et al.* Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **16**, 3074-3084 (1996).
124. Tamemoto, H. *et al.* Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182-186 (1994).
125. Araki, E. *et al.* Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **372**, 186-190 (1994).
126. Kulkarni, R.N. *et al.* Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J. Clin. Invest* **104**, R69-R75 (1999).
127. Withers, D.J. *et al.* Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900-904 (1998).
128. Higaki, Y. *et al.* Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **274**, 20791-20795 (1999).
129. Taniguchi, C.M., Ueki, K. & Kahn, R. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J. Clin. Invest* **115**, 718-727 (2005).
130. Katso, R. *et al.* Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 615-675 (2001).
131. Engelman, J.A., Luo, J. & Cantley, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 606-619 (2006).
132. Suire, S. *et al.* p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr. Biol.* **15**, 566-570 (2005).
133. Voigt, P., Dorner, M.B. & Schaefer, M. Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J. Biol. Chem.* **281**, 9977-9986 (2006).
134. Reif, K., Nobes, C.D., Thomas, G., Hall, A. & Cantrell, D.A. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr. Biol.* **6**, 1445-1455 (1996).
135. von Willebrand, M. *et al.* Modification of phosphatidylinositol 3-kinase SH2 domain binding properties by Abl- or Lck-mediated tyrosine phosphorylation at Tyr-688. *J. Biol. Chem.* **273**, 3994-4000 (1998).
136. Cuevas, B.D. *et al.* Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 27455-27461 (2001).
137. Yu, J. *et al.* Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell Biol.* **18**, 1379-1387 (1998).
138. Krystal, G. Lipid phosphatases in the immune system. *Semin. Immunol.* **12**, 397-403 (2000).
139. Arcaro, A. & Wymann, M.P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* **296 ( Pt 2)**, 297-301 (1993).

140. Thelen,M., Wymann,M.P. & Langen,H. Wortmannin binds specifically to 1-phosphatidylinositol 3-kinase while inhibiting guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor signaling in neutrophil leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 4960-4964 (1994).
141. Vlahos,C.J., Matter,W.F., Hui,K.Y. & Brown,R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241-5248 (1994).
142. Jiang,T. *et al.* Membrane-permeant esters of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 11017-11024 (1998).
143. Terauchi,Y. *et al.* Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* **21**, 230-235 (1999).
144. Ueki,K. *et al.* Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol. Cell Biol.* **22**, 965-977 (2002).
145. Jackson,S.P., Schoenwaelder,S.M., Matzaris,M., Brown,S. & Mitchell,C.A. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate is a substrate for the 75 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase and a novel 5-phosphatase which forms a complex with the p85/p110 form of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* **14**, 4490-4500 (1995).
146. Munday,A.D. *et al.* The inositol polyphosphate 4-phosphatase forms a complex with phosphatidylinositol 3-kinase in human platelet cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3640-3645 (1999).
147. Gupta,N. *et al.* The SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during FcgammaRIIb1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 7489-7494 (1999).
148. Bouscary,D. *et al.* Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood* **101**, 3436-3443 (2003).
149. Okkenhaug,K. & Vanhaesebroeck,B. New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci. STKE.* **2001**, E1 (2001).
150. Ueki,K. *et al.* Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 48453-48466 (2003).
151. Luo,J. *et al.* Loss of class IA PI3K signaling in muscle leads to impaired muscle growth, insulin response, and hyperlipidemia. *Cell Metab* **3**, 355-366 (2006).
152. Taniguchi,C.M. *et al.* Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKClambda/zeta. *Cell Metab* **3**, 343-353 (2006).
153. Bi,L., Okabe,I., Bernard,D.J., Wynshaw-Boris,A. & Nussbaum,R.L. Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 10963-10968 (1999).
154. Luo,J., Field,S.J., Lee,J.Y., Engelman,J.A. & Cantley,L.C. The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J. Cell Biol.* **170**, 455-464 (2005).
155. Foukas,L.C. *et al.* Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* **441**, 366-370 (2006).
156. Bi,L., Okabe,I., Bernard,D.J. & Nussbaum,R.L. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm. Genome* **13**, 169-172 (2002).



157. Pesesse,X., Deleu,S., De Smedt,F., Drayer,L. & Erneux,C. Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 697-700 (1997).
158. Ishihara,H. *et al.* Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) and its role in the regulation of insulin signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 265-272 (1999).
159. Ijuin,T. *et al.* Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10870-10875 (2000).
160. Maehama,T. & Dixon,J.E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 13375-13378 (1998).
161. Rohrschneider,L.R., Fuller,J.F., Wolf,I., Liu,Y. & Lucas,D.M. Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev.* **14**, 505-520 (2000).
162. Kalesnikoff,J. *et al.* The role of SHIP in cytokine-induced signaling. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **149**, 87-103 (2003).
163. Vollenweider,P. *et al.* An SH2 domain-containing 5' inositolphosphatase inhibits insulin-induced GLUT4 translocation and growth factor-induced actin filament rearrangement. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1081-1091 (1999).
164. Ishihara,H. *et al.* Membrane localization of Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase 2 via Shc association is required for the negative regulation of insulin signaling in Rat1 fibroblasts overexpressing insulin receptors. *Mol. Endocrinol.* **16**, 2371-2381 (2002).
165. Dyson,J.M. *et al.* The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP-2, binds filamin and regulates submembraneous actin. *J. Cell Biol.* **155**, 1065-1079 (2001).
166. Damen,J.E., Ware,M.D., Kalesnikoff,J., Hughes,M.R. & Krystal,G. SHIP's C-terminus is essential for its hydrolysis of PIP3 and inhibition of mast cell degranulation. *Blood* **97**, 1343-1351 (2001).
167. Liu,L. *et al.* The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 8983-8988 (1997).
168. Dyson,J.M. *et al.* The SH2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase-2: SHIP2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2260-2265 (2005).
169. Backers,K., Blero,D., Paternotte,N., Zhang,J. & Erneux,C. The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-phosphatases. *Adv. Enzyme Regul.* **43**, 15-28 (2003).
170. Lazar,D.F. & Saltiel,A.R. Lipid phosphatases as drug discovery targets for type 2 diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 333-342 (2006).
171. Habib,T., Hejna,J.A., Moses,R.E. & Decker,S.J. Growth factors and insulin stimulate tyrosine phosphorylation of the 51C/SHIP2 protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 18605-18609 (1998).
172. Sasaoka,T. *et al.* SH2-containing inositol phosphatase 2 predominantly regulates Akt2, and not Akt1, phosphorylation at the plasma membrane in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 14835-14843 (2004).
173. Chen,W.S. *et al.* Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* **15**, 2203-2208 (2001).

174. Cho,H., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Feng,F. & Birnbaum,M.J. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 38349-38352 (2001).
175. Cho,H. *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**, 1728-1731 (2001).
176. Sasaoka,T. *et al.* SH2-containing inositol phosphatase 2 negatively regulates insulin-induced glycogen synthesis in L6 myotubes. *Diabetologia* **44**, 1258-1267 (2001).
177. Wada,T. *et al.* Overexpression of SH2-containing inositol phosphatase 2 results in negative regulation of insulin-induced metabolic actions in 3T3-L1 adipocytes via its 5'-phosphatase catalytic activity. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1633-1646 (2001).
178. Blero,D. *et al.* The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 controls phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate levels in CHO-IR cells stimulated by insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 839-843 (2001).
179. Wada,T. *et al.* Role of the Src homology 2 (SH2) domain and C-terminus tyrosine phosphorylation sites of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) in the regulation of insulin-induced mitogenesis. *Endocrinology* **140**, 4585-4594 (1999).
180. Sleeman,M.W. *et al.* Absence of the lipid phosphatase SHIP2 confers resistance to dietary obesity. *Nat. Med.* **11**, 199-205 (2005).
181. Marion,E. *et al.* The gene INPPL1, encoding the lipid phosphatase SHIP2, is a candidate for type 2 diabetes in rat and man. *Diabetes* **51**, 2012-2017 (2002).
182. Kaisaki,P.J. *et al.* Polymorphisms in type II SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (INPPL1, SHIP2) are associated with physiological abnormalities of the metabolic syndrome. *Diabetes* **53**, 1900-1904 (2004).
183. Gericke,A., Munson,M. & Ross,A.H. Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* **374**, 1-9 (2006).
184. Raftopoulou,M., Etienne-Manneville,S., Self,A., Nicholls,S. & Hall,A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* **303**, 1179-1181 (2004).
185. Tamura,M. *et al.* Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* **280**, 1614-1617 (1998).
186. Mahimainathan,L. & Choudhury,G.G. Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. *J. Biol. Chem.* **279**, 15258-15268 (2004).
187. Goberdhan,D.C. & Wilson,C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more. *Hum. Mol. Genet.* **12 Spec No 2**, R239-R248 (2003).
188. Leslie,N.R. & Downes,C.P. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. J.* **382**, 1-11 (2004).
189. Tang,X., Powelka,A.M., Soriano,N.A., Czech,M.P. & Guilherme,A. PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 22523-22529 (2005).
190. Di Cristofano,A., Pesce,B., Cordon-Cardo,C. & Pandolfi,P.P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat. Genet.* **19**, 348-355 (1998).

191. Stambolic,V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).
192. Horie,Y. *et al.* Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J. Clin. Invest* **113**, 1774-1783 (2004).
193. Stiles,B. *et al.* Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2082-2087 (2004).
194. Kurlawalla-Martinez,C. *et al.* Insulin hypersensitivity and resistance to streptozotocin-induced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue. *Mol. Cell Biol.* **25**, 2498-2510 (2005).
195. Wijesekara,N. *et al.* Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol. Cell Biol.* **25**, 1135-1145 (2005).
196. Ishihara,H. *et al.* Association of the polymorphisms in the 5'-untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population. *FEBS Lett.* **554**, 450-454 (2003).
197. Ijuin,T. & Takenawa,T. SKIP negatively regulates insulin-induced GLUT4 translocation and membrane ruffle formation. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1209-1220 (2003).
198. Osaki,M., Oshimura,M. & Ito,H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* **9**, 667-676 (2004).
199. Vanhaesebroeck,B. & Alessi,D.R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 561-576 (2000).
200. Masure,S. *et al.* Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur. J. Biochem.* **265**, 353-360 (1999).
201. Bellacosa,A. *et al.* Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* **17**, 313-325 (1998).
202. Bottomley,M.J., Salim,K. & Panayotou,G. Phospholipid-binding protein domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**, 165-183 (1998).
203. Alessi,D.R. *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15**, 6541-6551 (1996).
204. Toker,A. & Newton,A.C. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* **275**, 8271-8274 (2000).
205. Dong,L.Q. & Liu,F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **289**, E187-E196 (2005).
206. Hresko,R.C. & Mueckler,M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 40406-40416 (2005).
207. Sarbassov,D.D., Guertin,D.A., Ali,S.M. & Sabatini,D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005).
208. Delcommenne,M. *et al.* Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 11211-11216 (1998).

209. Conus,N.M., Hannan,K.M., Cristiano,B.E., Hemmings,B.A. & Pearson,R.B. Direct identification of tyrosine 474 as a regulatory phosphorylation site for the Akt protein kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 38021-38028 (2002).
210. Chen,R. *et al.* Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 31858-31862 (2001).
211. Welsh,G.I. *et al.* Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 346-349 (2005).
212. Zdychova,J. & Komers,R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res.* **54**, 1-16 (2005).
213. Cross,D.A., Alessi,D.R., Cohen,P., Andjelkovich,M. & Hemmings,B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789 (1995).
214. Frame,S. & Cohen,P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1-16 (2001).
215. Sano,H. *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* **278**, 14599-14602 (2003).
216. Egeuz,L. *et al.* Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* **2**, 263-272 (2005).
217. Berwick,D.C. *et al.* Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *J. Cell Sci.* **117**, 5985-5993 (2004).
218. Yamada,E. *et al.* Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles. *J. Cell Biol.* **168**, 921-928 (2005).
219. Sano,H., Kane,S., Sano,E. & Lienhard,G.E. Synip phosphorylation does not regulate insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 880-884 (2005).
220. Calera,M.R. *et al.* Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* **273**, 7201-7204 (1998).
221. Harris,T.E. & Lawrence,J.C., Jr. TOR signaling. *Sci. STKE.* **2003**, re15 (2003).
222. Taha,C. *et al.* Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **274**, 33085-33091 (1999).
223. Khamzina,L., Veilleux,A., Bergeron,S. & Marette,A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* **146**, 1473-1481 (2005).
224. Tremblay,F. & Marette,A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 38052-38060 (2001).
225. Tremblay,F., Gagnon,A., Veilleux,A., Sorisky,A. & Marette,A. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* **146**, 1328-1337 (2005).

226. Gottlob, K. *et al.* Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* **15**, 1406-1418 (2001).
227. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590 (2003).
228. Kimura, N. *et al.* A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 65-79 (2003).
229. Hahn-Windgassen, A. *et al.* Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 32081-32089 (2005).
230. Kovacina, K.S. *et al.* Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem.* **278**, 10189-10194 (2003).
231. Nascimento, E.B. *et al.* Insulin-mediated phosphorylation of the proline-rich Akt substrate PRAS40 is impaired in insulin target tissues of high-fat diet-fed rats. *Diabetes* **55**, 3221-3228 (2006).
232. Haar, E.V., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J. & Kim, D.H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* (2007).
233. Puigserver, P. *et al.* Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature* **423**, 550-555 (2003).
234. Nakae, J. *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* **4**, 119-129 (2003).
235. Franke, T.F., Kaplan, D.R. & Cantley, L.C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-437 (1997).
236. Standaert, M.L., Bandyopadhyay, G., Kanoh, Y., Sajan, M.P. & Farese, R.V. Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* **40**, 249-255 (2001).
237. Standaert, M.L., Sajan, M.P., Miura, A., Bandyopadhyay, G. & Farese, R.V. Requirements for pYXXM motifs in Cbl for binding to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and Crk, and activation of atypical protein kinase C and glucose transport during insulin action in 3T3/L1 adipocytes. *Biochemistry* **43**, 15494-15502 (2004).
238. Saltiel, A.R. & Pessin, J.E. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* **4**, 711-716 (2003).
239. Kotani, K. *et al.* Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* **18**, 6971-6982 (1998).
240. Zhou, Q.L. *et al.* Analysis of insulin signalling by RNAi-based gene silencing. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 817-821 (2004).
241. Leitges, M. *et al.* Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol. Cell* **8**, 771-780 (2001).
242. Farese, R.V., Sajan, M.P. & Standaert, M.L. Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 350-353 (2005).
243. Jiang, Z.Y. *et al.* Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 7569-7574 (2003).

244. Bae,S.S., Cho,H., Mu,J. & Birnbaum,M.J. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **278**, 49530-49536 (2003).
245. Tschopp,O. *et al.* Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943-2954 (2005).
246. George,S. *et al.* A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* **304**, 1325-1328 (2004).
247. Liu,J., Kimura,A., Baumann,C.A. & Saltiel,A.R. APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3599-3609 (2002).
248. Ahmed,Z., Smith,B.J. & Pillay,T.S. The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett.* **475**, 31-34 (2000).
249. Hu,J. & Hubbard,S.R. Structural characterization of a novel Cbl phosphotyrosine recognition motif in the APS family of adapter proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 18943-18949 (2005).
250. Liu,J., DeYoung,S.M., Hwang,J.B., O'Leary,E.E. & Saltiel,A.R. The roles of Cbl-b and c-Cbl in insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* **278**, 36754-36762 (2003).
251. Chiang,S.H., Hou,J.C., Hwang,J., Pessin,J.E. & Saltiel,A.R. Cloning and functional characterization of related TC10 isoforms, a subfamily of Rho proteins involved in insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* **277**, 13067-13073 (2002).
252. Chiang,S.H. *et al.* Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**, 944-948 (2001).
253. Schmidt,M.H. & Dikic,I. The Cbl interactome and its functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 907-919 (2005).
254. Swaminathan,G. & Tsygankov,A.Y. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J. Cell Physiol* **209**, 21-43 (2006).
255. Kanzaki,M. *et al.* Small GTP-binding protein TC10 differentially regulates two distinct populations of filamentous actin in 3T3L1 adipocytes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2334-2346 (2002).
256. Kanzaki,M., Mora,S., Hwang,J.B., Saltiel,A.R. & Pessin,J.E. Atypical protein kinase C (PKCzeta/lambda) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J. Cell Biol.* **164**, 279-290 (2004).
257. Inoue,M., Chang,L., Hwang,J., Chiang,S.H. & Saltiel,A.R. The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* **422**, 629-633 (2003).
258. Chang,L., Adams,R.D. & Saltiel,A.R. The TC10-interacting protein CIP4/2 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 12835-12840 (2002).
259. Chiang,S.H. *et al.* TCGAP, a multidomain Rho GTPase-activating protein involved in insulin-stimulated glucose transport. *EMBO J.* **22**, 2679-2691 (2003).
260. Kanzaki,M. & Pessin,J.E. Insulin signaling: GLUT4 vesicles exit via the exocyst. *Curr. Biol.* **13**, R574-R576 (2003).
261. Kanzaki,M. & Pessin,J.E. Caveolin-associated filamentous actin (Cav-actin) defines a novel F-actin structure in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **277**, 25867-25869 (2002).

262. Maffucci,T., Brancaccio,A., Piccolo,E., Stein,R.C. & Falasca,M. Insulin induces phosphatidylinositol-3-phosphate formation through TC10 activation. *EMBO J.* **22**, 4178-4189 (2003).
263. Mitra,P., Zheng,X. & Czech,M.P. RNAi-based analysis of CAP, Cbl, and CrkII function in the regulation of GLUT4 by insulin. *J. Biol. Chem.* **279**, 37431-37435 (2004).
264. Baumann,C.A. *et al.* CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202-207 (2000).
265. Baumann,C.A., Brady,M.J. & Saltiel,A.R. Activation of glycogen synthase by insulin in 3T3-L1 adipocytes involves c-Cbl-associating protein (CAP)-dependent and CAP-independent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 6065-6068 (2001).
266. Molero,J.C. *et al.* c-Cbl-deficient mice have reduced adiposity, higher energy expenditure, and improved peripheral insulin action. *J. Clin. Invest* **114**, 1326-1333 (2004).
267. Joost,H.G. *et al.* Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **282**, E974-E976 (2002).
268. Bell,G.I. *et al.* Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **13**, 198-208 (1990).
269. Asano,T. *et al.* The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 24632-24636 (1991).
270. Joost,H.G. & Thorens,B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol. Membr. Biol.* **18**, 247-256 (2001).
271. Watson,R.T., Kanzaki,M. & Pessin,J.E. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr. Rev.* **25**, 177-204 (2004).
272. Mori,H. *et al.* Substitution of tyrosine 293 of GLUT1 locks the transporter into an outward facing conformation. *J. Biol. Chem.* **269**, 11578-11583 (1994).
273. Hashiramoto,M. *et al.* Site-directed mutagenesis of GLUT1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding. *J. Biol. Chem.* **267**, 17502-17507 (1992).
274. Katagiri,H. *et al.* Substitution of leucine for tryptophan 412 does not abolish cytochalasin B labeling but markedly decreases the intrinsic activity of GLUT1 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **266**, 7769-7773 (1991).
275. Mueckler,M., Weng,W. & Kruse,M. Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 20533-20538 (1994).
276. Tamori,Y. *et al.* Substitution at Pro385 of GLUT1 perturbs the glucose transport function by reducing conformational flexibility. *J. Biol. Chem.* **269**, 2982-2986 (1994).
277. Oka,Y. *et al.* C-terminal truncated glucose transporter is locked into an inward-facing form without transport activity. *Nature* **345**, 550-553 (1990).
278. Harvey Lodish *et al.* In Molecular Cell Biology. (2000).
279. Kasahara,M. & Hinkle,P.C. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **252**, 7384-7390 (1977).

280. Mueckler,M., Hresko,R.C. & Sato,M. Structure, function and biosynthesis of GLUT1. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 951-954 (1997).
281. Vannucci,S.J., Maher,F. & Simpson,I.A. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* **21**, 2-21 (1997).
282. Gould,G.W., Thomas,H.M., Jess,T.J. & Bell,G.I. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* **30**, 5139-5145 (1991).
283. Colville,C.A., Seatter,M.J., Jess,T.J., Gould,G.W. & Thomas,H.M. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem. J.* **290** ( Pt 3), 701-706 (1993).
284. Koivisto,U.M. *et al.* Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture. *J. Biol. Chem.* **266**, 2615-2621 (1991).
285. Camps,M. *et al.* Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem. J.* **282** ( Pt 3), 765-772 (1992).
286. Burcelin,R. *et al.* Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am. J. Physiol* **265**, E392-E401 (1993).
287. Dimitrakoudis,D., Ramlal,T., Rastogi,S., Vranic,M. & Klip,A. Glycaemia regulates the glucose transporter number in the plasma membrane of rat skeletal muscle. *Biochem. J.* **284** ( Pt 2), 341-348 (1992).
288. Klip,A., Tsakiridis,T., Marette,A. & Ortiz,P.A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J.* **8**, 43-53 (1994).
289. Olson,A.L. & Pessin,J.E. Transcriptional regulation of the human GLUT4 gene promoter in diabetic transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 23491-23495 (1995).
290. Castello,A. *et al.* GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **268**, 14998-15003 (1993).
291. Block,N.E., Menick,D.R., Robinson,K.A. & Buse,M.G. Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J. Clin. Invest* **88**, 1546-1552 (1991).
292. Coderre,L. *et al.* Alteration in the expression of GLUT-1 and GLUT-4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscles. *Endocrinology* **131**, 1821-1825 (1992).
293. Etgen,G.J., Jr., Farrar,R.P. & Ivy,J.L. Effect of chronic electrical stimulation on GLUT-4 protein content in fast-twitch muscle. *Am. J. Physiol* **264**, R816-R819 (1993).
294. Hofmann,S. & Pette,D. Low-frequency stimulation of rat fast-twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose transporter 4 (GLUT-4). *Eur. J. Biochem.* **219**, 307-315 (1994).
295. Kong,X., Manchester,J., Salmons,S. & Lawrence,J.C., Jr. Glucose transporters in single skeletal muscle fibers. Relationship to hexokinase and regulation by contractile activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 12963-12967 (1994).
296. Lemieux,K., Konrad,D., Klip,A. & Marette,A. The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *FASEB J.* **17**, 1658-1665 (2003).



297. Buhl, E.S. *et al.* Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes* **50**, 12-17 (2001).
298. Zheng, D. *et al.* Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J. Appl. Physiol* **91**, 1073-1083 (2001).
299. Houmard, J.A. *et al.* Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. *Am. J. Physiol* **261**, E437-E443 (1991).
300. Dela, F., Handberg, A., Mikines, K.J., Vinten, J. & Galbo, H. GLUT 4 and insulin receptor binding and kinase activity in trained human muscle. *J. Physiol* **469**, 615-624 (1993).
301. Ren, J.M., Semenkovich, C.F., Gulve, E.A., Gao, J. & Holloszy, J.O. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J. Biol. Chem.* **269**, 14396-14401 (1994).
302. Liu, M.L. *et al.* Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 11346-11350 (1993).
303. Deems, R.O. *et al.* Expression of human GLUT4 in mice results in increased insulin action. *Diabetologia* **37**, 1097-1104 (1994).
304. Marshall, B.A. & Mueckler, M.M. Differential effects of GLUT-1 or GLUT-4 overexpression on insulin responsiveness in transgenic mice. *Am. J. Physiol* **267**, E738-E744 (1994).
305. Treadway, J.L. *et al.* Enhanced peripheral glucose utilization in transgenic mice expressing the human GLUT4 gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 29956-29961 (1994).
306. Ikemoto, S. *et al.* High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 3096-3099 (1995).
307. Ren, J.M. *et al.* Overexpression of Glut4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *J. Clin. Invest* **95**, 429-432 (1995).
308. Shepherd, P.R. *et al.* Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **268**, 22243-22246 (1993).
309. Tsao, T.S., Burcelin, R., Katz, E.B., Huang, L. & Charron, M.J. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes* **45**, 28-36 (1996).
310. Cushman, S.W. & Wardzala, L.J. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **255**, 4758-4762 (1980).
311. Suzuki, K. & Kono, T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 2542-2545 (1980).
312. Birnbaum, M.J. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* **57**, 305-315 (1989).
313. Fukumoto, H. *et al.* Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* **264**, 7776-7779 (1989).

314. James,D.E., Strube,M. & Mueckler,M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**, 83-87 (1989).
315. Kaestner,K.H. *et al.* Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 3150-3154 (1989).
316. Charron,M.J., Brosius,F.C., III, Alper,S.L. & Lodish,H.F. A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 2535-2539 (1989).
317. Garippa,R.J., Judge,T.W., James,D.E. & McGraw,T.E. The amino terminus of GLUT4 functions as an internalization motif but not an intracellular retention signal when substituted for the transferrin receptor cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* **124**, 705-715 (1994).
318. Al Hasani,H. *et al.* Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis. *J. Cell Sci.* **115**, 131-140 (2002).
319. Piper,R.C. *et al.* GLUT-4 NH2 terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestration. *J. Cell Biol.* **121**, 1221-1232 (1993).
320. Palacios,S., Lalioti,V., Martinez-Arca,S., Chattopadhyay,S. & Sandoval,I.V. Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5-Gln6-Gln7-Ile8 motif. *J. Biol. Chem.* **276**, 3371-3383 (2001).
321. Melvin,D.R., Marsh,B.J., Walmsley,A.R., James,D.E. & Gould,G.W. Analysis of amino and carboxy terminal GLUT-4 targeting motifs in 3T3-L1 adipocytes using an endosomal ablation technique. *Biochemistry* **38**, 1456-1462 (1999).
322. Hudson,A.W. *et al.* Targeting of the "insulin-responsive" glucose transporter (GLUT4) to the regulated secretory pathway in PC12 cells. *J. Cell Biol.* **122**, 579-588 (1993).
323. Garippa,R.J., Johnson,A., Park,J., Petrush,R.L. & McGraw,T.E. The carboxyl terminus of GLUT4 contains a serine-leucine-leucine sequence that functions as a potent internalization motif in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 20660-20668 (1996).
324. Subtil,A., Lampson,M.A., Keller,S.R. & McGraw,T.E. Characterization of the insulin-regulated endocytic recycling mechanism in 3T3-L1 adipocytes using a novel reporter molecule. *J. Biol. Chem.* **275**, 4787-4795 (2000).
325. Shewan,A.M. *et al.* The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. *Biochem. J.* **350 Pt 1**, 99-107 (2000).
326. Shewan,A.M. *et al.* GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. *Mol. Biol. Cell* **14**, 973-986 (2003).
327. Bryant,N.J., Govers,R. & James,D.E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 267-277 (2002).
328. Jhun,B.H., Rampal,A.L., Liu,H., Lachaal,M. & Jung,C.Y. Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling. *J. Biol. Chem.* **267**, 17710-17715 (1992).
329. Yang,J. & Holman,G.D. Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 4600-4603 (1993).

330. Czech, M.P. & Buxton, J.M. Insulin action on the internalization of the GLUT4 glucose transporter in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 9187-9190 (1993).
331. Huang, J., Imamura, T. & Olefsky, J.M. Insulin can regulate GLUT4 internalization by signaling to Rab5 and the motor protein dynein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13084-13089 (2001).
332. Furtado, L.M., Somwar, R., Sweeney, G., Niu, W. & Klip, A. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 569-578 (2002).
333. Marette, A., Burdett, E., Douen, A., Vranic, M. & Klip, A. Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle. *Diabetes* **41**, 1562-1569 (1992).
334. Cullen, M.J., Hollingworth, S. & Marshall, M.W. A comparative study of the transverse tubular system of the rat extensor digitorum longus and soleus muscles. *J. Anat.* **138 ( Pt 2)**, 297-308 (1984).
335. Franzini-Armstrong, C., Ferguson, D.G. & Champ, C. Discrimination between fast- and slow-twitch fibres of guinea pig skeletal muscle using the relative surface density of junctional transverse tubule membrane. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **9**, 403-414 (1988).
336. Munoz, P. *et al.* The T-tubule is a cell-surface target for insulin-regulated recycling of membrane proteins in skeletal muscle. *Biochem. J.* **312 ( Pt 2)**, 393-400 (1995).
337. Roy, D. & Marette, A. Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 147-152 (1996).
338. Wang, W., Hansen, P.A., Marshall, B.A., Holloszy, J.O. & Mueckler, M. Insulin unmasks a COOH-terminal Glut4 epitope and increases glucose transport across T-tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **135**, 415-430 (1996).
339. Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H. & Marette, A. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. *Diabetes* **50**, 1901-1910 (2001).
340. Dombrowski, L., Roy, D. & Marette, A. Selective impairment in GLUT4 translocation to transverse tubules in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **47**, 5-12 (1998).
341. Lauritzen, H.P., Ploug, T., Prats, C., Tavares, J.M. & Galbo, H. Imaging of insulin signaling in skeletal muscle of living mice shows major role of T-tubules. *Diabetes* **55**, 1300-1306 (2006).
342. Calakos, N., Bennett, M.K., Peterson, K.E. & Scheller, R.H. Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. *Science* **263**, 1146-1149 (1994).
343. Scales, S.J. *et al.* SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron* **26**, 457-464 (2000).
344. Grote, E., Hao, J.C., Bennett, M.K. & Kelly, R.B. A targeting signal in VAMP regulating transport to synaptic vesicles. *Cell* **81**, 581-589 (1995).
345. Watson, R.T. & Pessin, J.E. Functional cooperation of two independent targeting domains in syntaxin 6 is required for its efficient localization in the trans-golgi network of 3T3L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 1261-1268 (2000).
346. Mayer, A. Intracellular membrane fusion: SNAREs only? *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 447-452 (1999).
347. Pfeffer, S.R. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* **1**, E17-E22 (1999).

348. Rea,S. *et al.* Syndet, an adipocyte target SNARE involved in the insulin-induced translocation of GLUT4 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* **273**, 18784-18792 (1998).
349. Tellam,J.T. *et al.* Characterization of Munc-18c and syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. Putative role in insulin-dependent movement of GLUT-4. *J. Biol. Chem.* **272**, 6179-6186 (1997).
350. Thurmond,D.C. *et al.* Regulation of insulin-stimulated GLUT4 translocation by Munc18c in 3T3L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 33876-33883 (1998).
351. Thurmond,D.C., Kanzaki,M., Khan,A.H. & Pessin,J.E. Munc18c function is required for insulin-stimulated plasma membrane fusion of GLUT4 and insulin-responsive amino peptidase storage vesicles. *Mol. Cell Biol.* **20**, 379-388 (2000).
352. Min,J. *et al.* Synip: a novel insulin-regulated syntaxin 4-binding protein mediating GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell* **3**, 751-760 (1999).
353. Foster,L.J. & Klip,A. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **279**, C877-C890 (2000).
354. Ueyama,A., Yaworsky,K.L., Wang,Q., Ebina,Y. & Klip,A. GLUT-4myc ectopic expression in L6 myoblasts generates a GLUT-4-specific pool conferring insulin sensitivity. *Am. J. Physiol* **277**, E572-E578 (1999).
355. Wang,Q., Khayat,Z., Kishi,K., Ebina,Y. & Klip,A. GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. *FEBS Lett.* **427**, 193-197 (1998).
356. Wang,Q. *et al.* Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4008-4018 (1999).
357. Hausdorff,S.F. *et al.* Identification of wortmannin-sensitive targets in 3T3-L1 adipocytes. DissociationOf insulin-stimulated glucose uptake and glut4 translocation. *J. Biol. Chem.* **274**, 24677-24684 (1999).
358. Eyers,P.A., van den,I.J., Quinlan,R.A., Goedert,M. & Cohen,P. Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2a/p38 to validate the in vivo specificity of SB 203580. *FEBS Lett.* **451**, 191-196 (1999).
359. Somwar,R. *et al.* GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J.* **359**, 639-649 (2001).
360. Somwar,R. *et al.* A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* **277**, 50386-50395 (2002).
361. Michelle,F.L., Poon,V. & Klip,A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol Scand.* **178**, 287-296 (2003).
362. Lawrence,J.C., Jr., Hiken,J.F. & James,D.E. Phosphorylation of the glucose transporter in rat adipocytes. Identification of the intracellular domain at the carboxyl terminus as a target for phosphorylation in intact-cells and in vitro. *J. Biol. Chem.* **265**, 2324-2332 (1990).
363. Katz,E.B., Stenbit,A.E., Hatton,K., DePinho,R. & Charron,M.J. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* **377**, 151-155 (1995).
364. Wallberg-Henriksson,H. & Zierath,J.R. GLUT4: a key player regulating glucose homeostasis? Insights from transgenic and knockout mice (review). *Mol. Membr. Biol.* **18**, 205-211 (2001).

365. Zisman,A. *et al.* Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat. Med.* **6**, 924-928 (2000).
366. Stenbit,A.E. *et al.* GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat. Med.* **3**, 1096-1101 (1997).
367. Tsao,T.S. *et al.* Muscle-specific transgenic complementation of GLUT4-deficient mice. Effects on glucose but not lipid metabolism. *J. Clin. Invest* **100**, 671-677 (1997).
368. Shulman,G.I. *et al.* Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N. Engl. J. Med.* **322**, 223-228 (1990).
369. Kim,J.K. *et al.* Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J. Clin. Invest* **108**, 153-160 (2001).
370. Abel,E.D. *et al.* Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart. *J. Clin. Invest* **104**, 1703-1714 (1999).
371. Kahn,B.B. & Flier,J.S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest* **106**, 473-481 (2000).
372. Fruhbeck,G., Gomez-Ambrosi,J., Muruzabal,F.J. & Burrell,M.A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **280**, E827-E847 (2001).
373. DeFronzo,R.A., Gunnarsson,R., Bjorkman,O., Olsson,M. & Wahren,J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **76**, 149-155 (1985).
374. Zierath,J.R. *et al.* Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* **39**, 1180-1189 (1996).
375. Shepherd,P.R. & Kahn,B.B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **341**, 248-257 (1999).
376. Dohm,G.L. *et al.* Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. *Am. J. Physiol* **260**, E459-E463 (1991).
377. Handberg,A., Vaag,A., Damsbo,P., Beck-Nielsen,H. & Vinten,J. Expression of insulin regulatable glucose transporters in skeletal muscle from type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* **33**, 625-627 (1990).
378. DeFronzo,R.A., Ferrannini,E. & Simonson,D.C. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism* **38**, 387-395 (1989).
379. Consoli,A., Nurjhan,N., Capani,F. & Gerich,J. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* **38**, 550-557 (1989).
380. Baron,A.D., Schaeffer,L., Shragg,P. & Kolterman,O.G. Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* **36**, 274-283 (1987).
381. Scheen,A.J. From obesity to diabetes: why, when and who? *Acta Clin. Belg.* **55**, 9-15 (2000).
382. Kahn,S.E. The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **108 Suppl 6a**, 2S-8S (2000).

383. Weir,G.C., Laybutt,D.R., Kaneto,H., Bonner-Weir,S. & Sharma,A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S154-S159 (2001).
384. Clark,A., Jones,L.C., de Koning,E., Hansen,B.C. & Matthews,D.R. Decreased insulin secretion in type 2 diabetes: a problem of cellular mass or function? *Diabetes* **50 Suppl 1**, S169-S171 (2001).
385. Efrat,S. Prospects for treatment of type 2 diabetes by expansion of the beta-cell mass. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S189-S190 (2001).
386. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26 Suppl 1**, S5-20 (2003).
387. Porte,D., Jr. & Kahn,S.E. beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S160-S163 (2001).
388. Molina,J.M., Ciaraldi,T.P., Brady,D. & Olefsky,J.M. Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects. *Diabetes* **38**, 991-995 (1989).
389. Caro,J.F. *et al.* Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest* **79**, 1330-1337 (1987).
390. Arner,P., Einarsson,K., Ewerth,S. & Livingston,J. Studies of the human liver insulin receptor in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **77**, 1716-1718 (1986).
391. Lonroth,P., Digirolamo,M., Krotkiewski,M. & Smith,U. Insulin binding and responsiveness in fat cells from patients with reduced glucose tolerance and type II diabetes. *Diabetes* **32**, 748-754 (1983).
392. Youngren,J.F., Paik,J. & Barnard,R.J. Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fatted, insulin-resistant rats. *J. Appl. Physiol* **91**, 2240-2247 (2001).
393. Nyomba,B.L., Ossowski,V.M., Bogardus,C. & Mott,D.M. Insulin-sensitive tyrosine kinase: relationship with in vivo insulin action in humans. *Am. J. Physiol* **258**, E964-E974 (1990).
394. Freidenberg,G.R., Reichart,D., Olefsky,J.M. & Henry,R.R. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J. Clin. Invest* **82**, 1398-1406 (1988).
395. Barbour,L.A. *et al.* Human placental growth hormone increases expression of the p85 regulatory unit of phosphatidylinositol 3-kinase and triggers severe insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrinology* **145**, 1144-1150 (2004).
396. Cornier,M.A., Bessesen,D.H., Gurevich,I., Leitner,J.W. & Draznin,B. Nutritional upregulation of p85alpha expression is an early molecular manifestation of insulin resistance. *Diabetologia* **49**, 748-754 (2006).
397. Barbour,L.A. *et al.* Increased P85alpha is a potent negative regulator of skeletal muscle insulin signaling and induces in vivo insulin resistance associated with growth hormone excess. *J. Biol. Chem.* **280**, 37489-37494 (2005).
398. Bandyopadhyay,G.K., Yu,J.G., Ofrecio,J. & Olefsky,J.M. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphotydylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* **54**, 2351-2359 (2005).
399. Draznin,B. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* **55**, 2392-2397 (2006).

400. Cusi, K. *et al.* Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest* **105**, 311-320 (2000).
401. Tilg, H. & Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 772-783 (2006).
402. Park, H.S., Park, J.Y. & Yu, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **69**, 29-35 (2005).
403. Paz, K. *et al.* Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J. Biol. Chem.* **274**, 28816-28822 (1999).
404. Marette, A. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* **5**, 377-383 (2002).
405. Zick, Y. Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27 Suppl 3**, S56-S60 (2003).
406. RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N. & NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785-789 (1963).
407. RANDLE, P.J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* **14**, 263-283 (1998).
408. Griffin, M.E. *et al.* Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* **48**, 1270-1274 (1999).
409. Kim, J.K. *et al.* PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest* **114**, 823-827 (2004).
410. Gao, Z. *et al.* Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2024-2034 (2004).
411. Kim, J.K. *et al.* Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J. Clin. Invest* **108**, 437-446 (2001).
412. Rohl, M. *et al.* Conditional disruption of I kappa B kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest* **113**, 474-481 (2004).
413. Hirosumi, J. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-336 (2002).
414. Gual, P., Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J.F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**, 99-109 (2005).
415. Hotamisligil, G.S. The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* **245**, 621-625 (1999).
416. Kanety, H., Feinstein, R., Papa, M.Z., Hemi, R. & Karasik, A. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). Possible mechanism for suppression of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 23780-23784 (1995).
417. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. & White, M.F. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J. Biol. Chem.* **275**, 9047-9054 (2000).

418. Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W. & Hotamisligil, G.S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* **389**, 610-614 (1997).
419. Jaeschke, A., Czech, M.P. & Davis, R.J. An essential role of the JIP1 scaffold protein for JNK activation in adipose tissue. *Genes Dev.* **18**, 1976-1980 (2004).
420. Ozes, O.N. *et al.* A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 4640-4645 (2001).
421. Um, S.H. *et al.* Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200-205 (2004).
422. Ravichandran, L.V., Esposito, D.L., Chen, J. & Quon, M.J. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **276**, 3543-3549 (2001).
423. Liu, Y.F. *et al.* Insulin stimulates PKC $\zeta$ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 14459-14465 (2001).
424. Moeschel, K. *et al.* Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 25157-25163 (2004).
425. Gual, P., Marchand-Brustel, Y. & Tanti, J. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Diabetes Metab* **29**, 566-575 (2003).
426. Gual, P. *et al.* Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 26550-26557 (2003).
427. Bouzakri, K. *et al.* Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 1319-1325 (2003).
428. Koistinen, H.A., Chibalin, A.V. & Zierath, J.R. Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* **46**, 1324-1328 (2003).
429. Fujishiro, M. *et al.* Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* **17**, 487-497 (2003).
430. Ahmad, F., Considine, R.V. & Goldstein, B.J. Increased abundance of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR accounts for the elevated insulin receptor dephosphorylating activity in adipose tissue of obese human subjects. *J. Clin. Invest* **95**, 2806-2812 (1995).
431. Ahmad, F., Azevedo, J.L., Cortright, R., Dohm, G.L. & Goldstein, B.J. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J. Clin. Invest* **100**, 449-458 (1997).
432. Ahmad, F. & Goldstein, B.J. Increased abundance of specific skeletal muscle protein-tyrosine phosphatases in a genetic model of insulin-resistant obesity and diabetes mellitus. *Metabolism* **44**, 1175-1184 (1995).
433. Ahmad, F. *et al.* Improved sensitivity to insulin in obese subjects following weight loss is accompanied by reduced protein-tyrosine phosphatases in adipose tissue. *Metabolism* **46**, 1140-1145 (1997).



434. McGuire, M.C. *et al.* Abnormal regulation of protein tyrosine phosphatase activities in skeletal muscle of insulin-resistant humans. *Diabetes* **40**, 939-942 (1991).
435. Hunter, T. & Sefton, B.M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 1311-1315 (1980).
436. Keyse, S.M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 186-192 (2000).
437. Ramponi, G. & Stefani, M. Structural, catalytic, and functional properties of low M(r), phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 279-292 (1997).
438. Raugei, G., Ramponi, G. & Chiarugi, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 941-949 (2002).
439. Andersen, J.N. *et al.* Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7117-7136 (2001).
440. Tonks, N.K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 833-846 (2006).
441. Zhang, Z.Y. *et al.* The Cys(X)5Arg catalytic motif in phosphoester hydrolysis. *Biochemistry* **33**, 15266-15270 (1994).
442. Zhang, Z.Y. Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1-52 (1998).
443. Blanchetot, C., Chagnon, M., Dube, N., Halle, M. & Tremblay, M.L. Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* **35**, 44-53 (2005).
444. Denu, J.M. & Tanner, K.G. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**, 5633-5642 (1998).
445. Claiborne, A. *et al.* Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* **38**, 15407-15416 (1999).
446. Claiborne, A., Miller, H., Parsonage, D. & Ross, R.P. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J.* **7**, 1483-1490 (1993).
447. Skorey, K. *et al.* How does alendronate inhibit protein-tyrosine phosphatases? *J. Biol. Chem.* **272**, 22472-22480 (1997).
448. Barrett, W.C. *et al.* Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **274**, 34543-34546 (1999).
449. Goldstein, B.J., Mahadev, K. & Wu, X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* **54**, 311-321 (2005).
450. Mahadev, K. *et al.* The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol. Cell Biol.* **24**, 1844-1854 (2004).
451. Andersen, J.N. *et al.* Comparative study of protein tyrosine phosphatase-epsilon isoforms: membrane localization confers specificity in cellular signalling. *Biochem. J.* **354**, 581-590 (2001).

452. Fischer,E.H. Cell signaling by protein tyrosine phosphorylation. *Adv. Enzyme Regul.* **39**, 359-369 (1999).
453. Mauro,L.J. & Dixon,J.E. 'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 151-155 (1994).
454. Tonks,N.K., Diltz,C.D. & Fischer,E.H. CD45, an integral membrane protein tyrosine phosphatase. Characterization of enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 10674-10680 (1990).
455. Kulas,D.T., Freund,G.G. & Mooney,R.A. The transmembrane protein-tyrosine phosphatase CD45 is associated with decreased insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **271**, 755-760 (1996).
456. Cong,L.N. *et al.* Overexpression of protein tyrosine phosphatase-alpha (PTP-alpha) but not PTP-kappa inhibits translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 200-207 (1999).
457. Lammers,R., Moller,N.P. & Ullrich,A. The transmembrane protein tyrosine phosphatase alpha dephosphorylates the insulin receptor in intact cells. *FEBS Lett.* **404**, 37-40 (1997).
458. Nakagawa,Y. *et al.* Receptor-type protein tyrosine phosphatase epsilon (PTPepsilonM) is a negative regulator of insulin signaling in primary hepatocytes and liver. *Zoolog. Sci.* **22**, 169-175 (2005).
459. Lacasa,D., Boute,N. & Issad,T. Interaction of the insulin receptor with the receptor-like protein tyrosine phosphatases PTPalpha and PTPepsilon in living cells. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1206-1213 (2005).
460. Ponniah,S., Wang,D.Z., Lim,K.L. & Pallen,C.J. Targeted disruption of the tyrosine phosphatase PTPalpha leads to constitutive downregulation of the kinases Src and Fyn. *Curr. Biol.* **9**, 535-538 (1999).
461. Peretz,A. *et al.* Hypomyelination and increased activity of voltage-gated K(+) channels in mice lacking protein tyrosine phosphatase epsilon. *EMBO J.* **19**, 4036-4045 (2000).
462. Sully,V. *et al.* Functional abnormalities in protein tyrosine phosphatase epsilon-deficient macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 184-188 (2001).
463. Walchli,S., Curchod,M.L., Gobert,R.P., Arkininstall,S. & Hooft,v.H. Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. *J. Biol. Chem.* **275**, 9792-9796 (2000).
464. Galic,S. *et al.* Regulation of insulin receptor signaling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Mol. Cell Biol.* **23**, 2096-2108 (2003).
465. Meng,T.C., Buckley,D.A., Galic,S., Tiganis,T. & Tonks,N.K. Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J. Biol. Chem.* **279**, 37716-37725 (2004).
466. Galic,S. *et al.* Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP. *Mol. Cell Biol.* **25**, 819-829 (2005).
467. Zhang,W.R., Li,P.M., Oswald,M.A. & Goldstein,B.J. Modulation of insulin signal transduction by eutopic overexpression of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR. *Mol. Endocrinol.* **10**, 575-584 (1996).
468. Li,P.M., Zhang,W.R. & Goldstein,B.J. Suppression of insulin receptor activation by overexpression of the protein-tyrosine phosphatase LAR in hepatoma cells. *Cell Signal.* **8**, 467-473 (1996).
469. Hashimoto,N., Feener,E.P., Zhang,W.R. & Goldstein,B.J. Insulin receptor protein-tyrosine phosphatases. Leukocyte common antigen-related phosphatase rapidly deactivates the insulin receptor kinase by preferential dephosphorylation of the receptor regulatory domain. *J. Biol. Chem.* **267**, 13811-13814 (1992).

470. Goldstein,B.J., Bittner-Kowalczyk,A., White,M.F. & Harbeck,M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 4283-4289 (2000).
471. Calera,M.R., Vallega,G. & Pilch,P.F. Dynamics of protein-tyrosine phosphatases in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 6308-6312 (2000).
472. Ren,J.M. *et al.* Transgenic mice deficient in the LAR protein-tyrosine phosphatase exhibit profound defects in glucose homeostasis. *Diabetes* **47**, 493-497 (1998).
473. Zabolotny,J.M. *et al.* Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 5187-5192 (2001).
474. Chernoff,J., Schievella,A.R., Jost,C.A., Erikson,R.L. & Neel,B.G. Cloning of a cDNA for a major human protein-tyrosine-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 2735-2739 (1990).
475. Frangioni,J.V., Beahm,P.H., Shifrin,V., Jost,C.A. & Neel,B.G. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* **68**, 545-560 (1992).
476. Frangioni,J.V., Oda,A., Smith,M., Salzman,E.W. & Neel,B.G. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J.* **12**, 4843-4856 (1993).
477. Bandyopadhyay,D. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 1639-1645 (1997).
478. Dadke,S., Kusari,A. & Kusari,J. Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. *Mol. Cell Biochem.* **221**, 147-154 (2001).
479. Tao,J., Malbon,C.C. & Wang,H.Y. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 29520-29525 (2001).
480. Ravichandran,L.V., Chen,H., Li,Y. & Quon,M.J. Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**, 1768-1780 (2001).
481. Mahadev,K., Zilbering,A., Zhu,L. & Goldstein,B.J. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J. Biol. Chem.* **276**, 21938-21942 (2001).
482. Dube,N. & Tremblay,M.L. Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**, 108-117 (2005).
483. Salmeen,A., Andersen,J.N., Myers,M.P., Tonks,N.K. & Barford,D. Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell* **6**, 1401-1412 (2000).
484. Haj,F.G., Zabolotny,J.M., Kim,Y.B., Kahn,B.B. & Neel,B.G. Liver-specific protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) re-expression alters glucose homeostasis of PTP1B-/-mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 15038-15046 (2005).
485. Bourdeau,A., Dube,N. & Tremblay,M.L. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 203-209 (2005).

486. Shao,J., Gao,Y. & Yuan,Z. [Free fatty acids promoting PTP1B expression in rat skeletal muscle and hepatic cells]. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* **78**, 753-755 (1998).
487. Zabolotny,J.M. *et al.* Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J. Biol. Chem.* **279**, 24844-24851 (2004).
488. Forsell,P.A., Boie,Y., Montalibet,J., Collins,S. & Kennedy,B.P. Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes. *Gene* **260**, 145-153 (2000).
489. Lee,J.H. *et al.* Genome scan for human obesity and linkage to markers in 20q13. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 196-209 (1999).
490. Lembertas,A.V. *et al.* Identification of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *J. Clin. Invest* **100**, 1240-1247 (1997).
491. Ghosh,S. *et al.* Type 2 diabetes: evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2198-2203 (1999).
492. Cheung,A. *et al.* Marked impairment of protein tyrosine phosphatase 1B activity in adipose tissue of obese subjects with and without type 2 diabetes mellitus. *J. Lab Clin. Med.* **134**, 115-123 (1999).
493. Echwald,S.M. *et al.* A P387L variant in protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) is associated with type 2 diabetes and impaired serine phosphorylation of PTP-1B in vitro. *Diabetes* **51**, 1-6 (2002).
494. Elchebly,M. *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-1548 (1999).
495. Klamon,L.D. *et al.* Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* **20**, 5479-5489 (2000).
496. Nieto-Vazquez,I. *et al.* Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Myocytes Show Increased Insulin Sensitivity and Protection Against Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 404-413 (2007).
497. Zabolotny,J.M. *et al.* PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell* **2**, 489-495 (2002).
498. Cheng,A. *et al.* Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev. Cell* **2**, 497-503 (2002).
499. Bence,K.K. *et al.* Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* **12**, 917-924 (2006).
500. Modesti,A. *et al.* Cloning, expression and characterisation of a new human low Mr phosphotyrosine protein phosphatase originating by alternative splicing. *FEBS Lett.* **431**, 111-115 (1998).
501. Tailor,P., Gilman,J., Williams,S. & Mustelin,T. A novel isoform of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase, LMPTP-C, arising from alternative mRNA splicing. *Eur. J. Biochem.* **262**, 277-282 (1999).
502. Tailor,P., Gilman,J., Williams,S., Couture,C. & Mustelin,T. Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. *J. Biol. Chem.* **272**, 5371-5374 (1997).
503. Bucciantini,M. *et al.* The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase. *FEBS Lett.* **456**, 73-78 (1999).

504. Caselli,A. *et al.* The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **273**, 32554-32560 (1998).
505. Caselli,A. *et al.* Nitric oxide causes inactivation of the low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24878-24882 (1994).
506. Chiarugi,P. *et al.* The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 6776-6785 (1998).
507. Chiarugi,P. *et al.* PDGF receptor as a specific in vivo target for low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett.* **372**, 49-53 (1995).
508. Rigacci,S., Rovida,E., Bagnoli,S., Dello,S.P. & Berti,A. Low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase activity on fibroblast growth factor receptor is not associated with enzyme translocation. *FEBS Lett.* **459**, 191-194 (1999).
509. Chiarugi,P. *et al.* LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 676-682 (1997).
510. Taddei,M.L. *et al.* LMW-PTP exerts a differential regulation on. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 564-569 (2000).
511. Pandey,S.K. *et al.* Reduction of low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase expression improves hyperglycemia and insulin sensitivity in obese mice. *J. Biol. Chem.* (2007).
512. Yu,X.X. *et al.* Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology* **42**, 362-371 (2005).
513. Dean,N.M., Butler,M., Monia,B.P. & Manoharan,M. *In : Antisense Drug Technology: Principles, Strategies and Applications.* Crooke ST, ed., New York, NY: Dekker (2001).
514. Tsui,F.W., Martin,A., Wang,J. & Tsui,H.W. Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase, SHP-1. *Immunol. Res.* **35**, 127-136 (2006).
515. Norris,K. *et al.* Expression of protein-tyrosine phosphatases in the major insulin target tissues. *FEBS Lett.* **415**, 243-248 (1997).
516. Yu,Z. *et al.* SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 3687-3694 (1998).
517. Imani,F., Rager,K.J., Catipovic,B. & Marsh,D.G. Interleukin-4 (IL-4) induces phosphatidylinositol 3-kinase (p85) dephosphorylation. Implications for the role of SHP-1 in the IL-4-induced signals in human B cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 7927-7931 (1997).
518. Cuevas,B. *et al.* SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 27583-27589 (1999).
519. Lu,Y. *et al.* Src family protein-tyrosine kinases alter the function of PTEN to regulate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT cascades. *J. Biol. Chem.* **278**, 40057-40066 (2003).
520. Inoue,H. *et al.* Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* **10**, 168-174 (2004).
521. Buettner,C. *et al.* Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* **4**, 49-60 (2006).

522. Tenev, T. *et al.* Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 261-271 (2000).
523. Han, Y. *et al.* Loss of SHP1 enhances JAK3/STAT3 signaling and decreases proteasome degradation of JAK3 and NPM-ALK in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **108**, 2796-2803 (2006).
524. Yi, T.L., Cleveland, J.L. & Ihle, J.N. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol. Cell Biol.* **12**, 836-846 (1992).
525. Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. & Lisanti, M.P. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 6525-6533 (1997).
526. Singh, D.K. *et al.* The strength of receptor signaling is centrally controlled through a cooperative loop between Ca<sup>2+</sup> and an oxidant signal. *Cell* **121**, 281-293 (2005).
527. Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Mei, L. & Wu, J. Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 887-894 (1998).
528. Yang, J. *et al.* Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 6516-6520 (2003).
529. Pei, D., Lorenz, U., Klingmuller, U., Neel, B.G. & Walsh, C.T. Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains. *Biochemistry* **33**, 15483-15493 (1994).
530. Pregel, M.J., Shen, S.H. & Storer, A.C. Regulation of protein tyrosine phosphatase 1C: opposing effects of the two src homology 2 domains. *Protein Eng* **8**, 1309-1316 (1995).
531. Martin, A., Tsui, H.W., Shulman, M.J., Isenman, D. & Tsui, F.W. Murine SHP-1 splice variants with altered Src homology 2 (SH2) domains. Implications for the SH2-mediated intramolecular regulation of SHP-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 21725-21734 (1999).
532. Pei, D., Wang, J. & Walsh, C.T. Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 1141-1145 (1996).
533. Dechert, U. *et al.* Comparison of the specificity of bacterially expressed cytoplasmic protein-tyrosine phosphatases SHP and SH-PTP2 towards synthetic phosphopeptide substrates. *Eur. J. Biochem.* **231**, 673-681 (1995).
534. Lorenz, U. *et al.* Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1824-1834 (1994).
535. Bouchard, P. *et al.* Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C. *J. Biol. Chem.* **269**, 19585-19589 (1994).
536. Yi, T. & Ihle, J.N. Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol. Cell Biol.* **13**, 3350-3358 (1993).
537. Yeung, Y.G., Berg, K.L., Pixley, F.J., Angeletti, R.H. & Stanley, E.R. Protein tyrosine phosphatase-1C is rapidly phosphorylated in tyrosine in macrophages in response to colony stimulating factor-1. *J. Biol. Chem.* **267**, 23447-23450 (1992).
538. Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T. & Siminovitch, K.A. The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 3856-3862 (1996).

539. Uchida, T. *et al.* Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J. Biol. Chem.* **269**, 12220-12228 (1994).
540. Minoo, P., Zadeh, M.M., Rottapel, R., Lebrun, J.J. & Ali, S. A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood* **103**, 1398-1407 (2004).
541. Yang, W., Tabrizi, M., Berrada, K. & Yi, T. SHP-1 phosphatase C-terminus interacts with novel substrates p32/p30 during erythropoietin and interleukin-3 mitogenic responses. *Blood* **91**, 3746-3755 (1998).
542. Li, R.Y., Gaits, F., Ragab, A., Ragab-Thomas, J.M. & Chap, H. Tyrosine phosphorylation of an SH2-containing protein tyrosine phosphatase is coupled to platelet thrombin receptor via a pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G-protein. *EMBO J.* **14**, 2519-2526 (1995).
543. Jones, M.L., Craik, J.D., Gibbins, J.M. & Poole, A.W. Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J. Biol. Chem.* **279**, 40475-40483 (2004).
544. Brumell, J.H. *et al.* Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**, 875-882 (1997).
545. Ram, P.A. & Waxman, D.J. Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 17694-17702 (1997).
546. Yang, W., Tabrizi, M. & Yi, T. A bipartite NLS at the SHP-1 C-terminus mediates cytokine-induced SHP-1 nuclear localization in cell growth control. *Blood Cells Mol. Dis.* **28**, 63-74 (2002).
547. Craggs, G. & Kellie, S. A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 23719-23725 (2001).
548. Jans, D.A., Xiao, C.Y. & Lam, M.H. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* **22**, 532-544 (2000).
549. Kosugi, A., Sakakura, J., Yasuda, K., Ogata, M. & Hamaoka, T. Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity*. **14**, 669-680 (2001).
550. Su, M.W., Yu, C.L., Burakoff, S.J. & Jin, Y.J. Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation. *J. Immunol.* **166**, 3975-3982 (2001).
551. Fawcett, V.C. & Lorenz, U. Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J. Immunol.* **174**, 2849-2859 (2005).
552. Caselli, A., Mazzinghi, B., Camici, G., Manao, G. & Ramponi, G. Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 692-697 (2002).
553. Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschornig, O. & Bohmer, F.D. Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation. *Biochemistry* **38**, 11993-12002 (1999).
554. Zhao, Z., Shen, S.H. & Fischer, E.H. Stimulation by phospholipids of a protein-tyrosine-phosphatase containing two src homology 2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 4251-4255 (1993).
555. Zhao, Z., Larocque, R., Ho, W.T., Fischer, E.H. & Shen, S.H. Purification and characterization of PTP2C, a widely distributed protein tyrosine phosphatase containing two SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **269**, 8780-8785 (1994).

556. Tomic,S. *et al.* Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. *J. Biol. Chem.* **270**, 21277-21284 (1995).
557. Banville,D., Stocco,R. & Shen,S.H. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* **27**, 165-173 (1995).
558. Jin,Y.J., Yu,C.L. & Burakoff,S.J. Human 70-kDa SHP-1L differs from 68-kDa SHP-1 in its C-terminal structure and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 28301-28307 (1999).
559. Martin,A., Tsui,H.W. & Tsui,F.W. SHP-1 variant proteins are absent in motheaten mice despite presence of splice variant transcripts with open reading frames. *Mol. Immunol.* **36**, 1029-1041 (1999).
560. Green,M.C. & Shultz,L.D. Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J. Hered.* **66**, 250-258 (1975).
561. Sidman,C.L., Shultz,L.D. & Unanue,E.R. The mouse mutant "motheaten". I. Development of lymphocyte populations. *J. Immunol.* **121**, 2392-2398 (1978).
562. Shultz,L.D., Coman,D.R., Bailey,C.L., Beamer,W.G. & Sidman,C.L. "Viable motheaten," a new allele at the motheaten locus. I. Pathology. *Am. J. Pathol.* **116**, 179-192 (1984).
563. Shultz,L.D. *et al.* Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* **73**, 1445-1454 (1993).
564. Tsui,H.W., Siminovitch,K.A., de Souza,L. & Tsui,F.W. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat. Genet.* **4**, 124-129 (1993).
565. Nalbantoglu,J. *et al.* Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle. *J. Virol.* **75**, 4276-4282 (2001).
566. Rozema,D.B., Ekena,K., Lewis,D.L., Loomis,A.G. & Wolff,J.A. Endosomolysis by masking of a membrane-active agent (EMMA) for cytoplasmic release of macromolecules. *Bioconjug. Chem.* **14**, 51-57 (2003).
567. Obrink,B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 616-626 (1997).
568. Li,C.S., Choice,C.V. & Najjar,S.M. Differential effect of pp120 on insulin endocytosis by two variant insulin receptor isoforms. *Am. J. Physiol* **273**, E801-E808 (1997).
569. O'Reilly,A.M., Pluskey,S., Shoelson,S.E. & Neel,B.G. Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of Xenopus animal caps. *Mol. Cell Biol.* **20**, 299-311 (2000).
570. Falet,H., Pain,S. & Rendu,F. Tyrosine unphosphorylated platelet SHP-1 is a substrate for calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**, 51-55 (1998).
571. Holler,D. & Dikic,I. Receptor endocytosis via ubiquitin-dependent and -independent pathways. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1013-1017 (2004).
572. Sigismund,S. *et al.* Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 2760-2765 (2005).
573. Shih,S.C., Sloper-Mould,K.E. & Hicke,L. Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.* **19**, 187-198 (2000).



574. Hyo-Jeong Kim *et al.* Mice with functionally-deficient protein tyrosine phosphatase SHP-1 are protected from diet-induced obesity and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Diabetes* **53**, Supplement 2; A71 (2004).
575. Guo,D.Q. *et al.* Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **275**, 11216-11221 (2000).
576. Nakagami,H. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth factor-mediated cell proliferation through SHP-1 activation in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 238-242 (2002).
577. Neel,B.G., Gu,H. & Pao,L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 284-293 (2003).
578. Chong,Z.Z. & Maiese,K. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol. Histopathol.* **22**, 1251-1267 (2007).
579. Maegawa,H. *et al.* Expression of a dominant negative SHP-2 in transgenic mice induces insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **274**, 30236-30243 (1999).