

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

SHP2 RÉGULE LA PHOSPHORYLATION DES TYROSINES DE L'ARRESTINE

par

PASCALE GERMAIN

Service de Rhumatologie, Département de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Pharmacologie

Mai 2009

Pr Jean-Luc Parent, Service de Rhumatologie  
Pr Guylain Boulay, Département de Pharmacologie  
Pr Fernand-Pierre Gendron, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire

# TABLE DES MATIÈRES

|                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>                                                                                      | <b>III</b> |
| <b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>                                                                                  | <b>V</b>   |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>                                                                                       | <b>VI</b>  |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>                                                                                   | <b>VII</b> |
| <b>RÉSUMÉ.....</b>                                                                                                   |            |
| <b>INTRODUCTION.....</b>                                                                                             | <b>1</b>   |
| 1.1 LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES.....                                                    | 1          |
| 1.1.1 <i>La désensibilisation des RCPGs.....</i>                                                                     | 3          |
| 1.2 LES ARRESTINES NON-VISUELLES.....                                                                                | 7          |
| 1.2.1 <i>Structure.....</i>                                                                                          | 8          |
| 1.2.2 <i>Rôle dans la désensibilisation.....</i>                                                                     | 10         |
| 1.2.3 <i>Rôle dans la signalisation des RCPGs.....</i>                                                               | 13         |
| 1.2.4 <i>Partenaires d'interaction.....</i>                                                                          | 17         |
| 1.3 LA TYROSINE KINASE SRC.....                                                                                      | 21         |
| 1.4 LES PROTÉINES TYROSINE PHOSPHATASE.....                                                                          | 23         |
| 1.4.1 <i>Les Shps affichent des fonctions biologiques distinctes.....</i>                                            | 25         |
| 1.5 LA PHOSPHATASE SHP2.....                                                                                         | 27         |
| 1.5.1 <i>Structure et régulation de l'activité phosphatase.....</i>                                                  | 27         |
| 1.5.2 <i>Rôle dans la signalisation des RTKs.....</i>                                                                | 30         |
| 1.5.3 <i>Rôle dans la signalisation des RCPGs.....</i>                                                               | 34         |
| 1.5.4 <i>Pathologies.....</i>                                                                                        | 34         |
| 1.6 PROBLÉMATIQUE.....                                                                                               | 36         |
| <b>BUTS DE L'ÉTUDE.....</b>                                                                                          | <b>38</b>  |
| <b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>                                                                                     | <b>39</b>  |
| 3.1 MATÉRIEL.....                                                                                                    | 39         |
| 3.2 CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTIONS.....                                                                         | 39         |
| 3.3 CONSTRUCTION DES PLASMIDES.....                                                                                  | 40         |
| 3.3.1 <i>Aspects généraux.....</i>                                                                                   | 40         |
| 3.3.2 <i>Construction des vecteurs pcDNA3-Shp2-D<sup>61</sup>Y et pcDNA3-HA-Shp2.....</i>                            | 41         |
| 3.3.3 <i>Construction du mutant Y<sup>391</sup>A-Y<sup>415</sup>A de l'arrestine 3 par PCR de chevauchement.....</i> | 42         |
| 3.3.4 <i>Tableau des oligonucléotides utilisés.....</i>                                                              | 43         |
| 3.4 IMMUNOPRÉCIPITATIONS.....                                                                                        | 43         |
| 3.5 SDS-PAGE ET IMMUNOBUVARDAGE.....                                                                                 | 44         |
| 3.6 IMMUNOFLUORESCENCE.....                                                                                          | 45         |

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RÉSULTATS</b> .....                                                                                       | <b>47</b> |
| 4.1 LA PHOSPHORYLATION DES TYROSINES DE L'ARRESTINE 3.....                                                   | 47        |
| 4.1.1 <i>La phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3 régulée par Src</i> .....                         | 47        |
| 4.1.2 <i>Le potentiel de phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3</i> .....                            | 49        |
| 4.1.3 <i>Les tyrosines 380 et 404 de l'arrestine 3 sont d'importants sites de phosphorylation</i> .....      | 51        |
| 4.2 LA PHOSPHORYLATION DES ARRESTINES EST RÉGULÉE PAR SHP2 .....                                             | 55        |
| 4.2.1 <i>L'arrestine 3 peut être régulée par Shp2</i> .....                                                  | 55        |
| 4.2.2 <i>L'arrestine 2 peut aussi être régulée par Shp2</i> .....                                            | 57        |
| 4.3.1 <i>La phosphorylation de l'arrestine 3 suite à l'activation d'un RCPG</i> .....                        | 60        |
| 4.3.2 <i>Modulation de la colocalisation de l'arrestine 3 et Shp2</i> .....                                  | 62        |
| <b>DISCUSSION</b> .....                                                                                      | <b>66</b> |
| 5.1 PRÉAMBULE .....                                                                                          | 66        |
| 5.2 L'ARRESTINE 3 PEUT ÊTRE PHOSPHORYLÉE SUR SES TYROSINES.....                                              | 66        |
| 5.3 LES TYROSINES DE LA QUEUE C-TERMINALE DE L'ARRESTINE 3 SONT D'IMPORTANTES SITES DE PHOSPHORYLATION ..... | 68        |
| 5.4 LES ARRESTINES 2 ET 3 SONT RÉGULÉES PAR L'ACTIVITÉ DE SHP2.....                                          | 69        |
| 5.5 LA PHOSPHORYLATION DE TYROSINES DE L'ARRESTINE 3 : VERS UNE FONCTION.....                                | 71        |
| 5.5.1 <i>L'induction de la phosphorylation de l'arrestine 3 par stimulation d'un RCPG</i> .....              | 72        |
| 5.5.2 <i>Le complexe arrestine 3-Shp2 modulé par la stimulation de RCPGs</i> .....                           | 73        |
| 5.5.3 <i>D'autres hypothèses possibles</i> .....                                                             | 74        |
| <b>CONCLUSIONS</b> .....                                                                                     | <b>76</b> |
| <b>PERSPECTIVES</b> .....                                                                                    | <b>78</b> |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....                                                                                   | <b>80</b> |
| <b>ANNEXE</b> .....                                                                                          | <b>82</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....                                                                                   | <b>84</b> |

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURE 1. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE D'UN RCPG CLASSIQUE. ....                                                    | 2  |
| FIGURE 2. REPRÉSENTATION SIMPLIFIÉE DE LA SIGNALISATION D'UN RCPG. ....                                            | 4  |
| FIGURE 3. ROUTAGE INTRACELLULAIRE D'UN RCPG. ....                                                                  | 6  |
| FIGURE 4. REPRÉSENTATION EN RUBANS DE L'ARRESTINE 2 TRONQUÉE (AA. 1 À 393). ....                                   | 9  |
| FIGURE 5. IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX DOMAINES DES ARRESTINES NON-VISUELLES. ....                                | 11 |
| FIGURE 6. SCHÉMATISATION DU CHANGEMENT DE CONFORMATION DE L'ARRESTINE SUITE À SA LIAISON À<br>UN RCPG ACTIVÉ. .... | 12 |
| FIGURE 7. DEUX CLASSES DE RCPGs SELON LEURS PROPRIÉTÉS D'INTERNALISATION. ....                                     | 14 |
| FIGURE 8. RÔLES DES ARRESTINES NON-VISUELLES DANS LA SIGNALISATION. ....                                           | 15 |
| FIGURE 9. SCHÉMATISATION DES DIFFÉRENTS SITES DE LIAISON CONNUS SUR L'ARRESTINE. ....                              | 19 |
| FIGURE 10. RÔLE D'ADAPTATEUR DE L'ARRESTINE 3 DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE DES MAPKS. ....                         | 20 |
| FIGURE 11. SITES DE PHOSPHORYLATION ET ORGANISATION DE SRC. ....                                                   | 22 |
| FIGURE 12. CONFORMATIONS INACTIVE ET ACTIVE DE SRC. ....                                                           | 24 |
| FIGURE 13. LES PROTÉINES TYROSINE PHOSPHATASE DE CLASSE I. ....                                                    | 26 |
| FIGURE 14. SITES IMPORTANTS ET ORGANISATION DE SHP2. ....                                                          | 28 |
| FIGURE 15. SCHÉMA EN RUBANS DE LA STRUCTURE CRISTALLISÉE DE LA TYROSINE PHOSPHATASE SHP2. ....                     | 29 |
| FIGURE 16. RÉGULATION ET CONFORMATION DE SHP2. ....                                                                | 31 |
| FIGURE 17. RÔLE POSITIF DE SHP2 DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE DES MAPKS. ....                                       | 33 |
| FIGURE 18. L'ARRESTINE 3 EST PHOSPHORYLÉE PAR SRC. ....                                                            | 48 |
| FIGURE 19. LES TYROSINES DES ARRESTINES 2 ET 3. ....                                                               | 50 |
| FIGURE 20. LES TYROSINES 380 ET 404 DE L'ARRESTINE 3 SONT D'IMPORTANT SITES DE<br>PHOSPHORYLATION. ....            | 53 |
| FIGURE 21. LA SUREXPRESSION DE SHP2 INDUIT LA DÉPHOSPHORYLATION DE L'ARRESTINE 3. ....                             | 56 |
| FIGURE 22. LA SUREXPRESSION DE SHP2 INDUIT LA DÉPHOSPHORYLATION DE L'ARRESTINE 2. ....                             | 58 |
| FIGURE 23. PHOSPHORYLATION DES TYROSINES DE L'ARRESTINE 3 INDUITE PAR LA STIMULATION D'AT <sub>1</sub> R<br>.....  | 61 |
| FIGURE 24. L'ARRESTINE 3 ET SHP2 SONT RECRUTÉES AU RÉCEPTEURS AT <sub>1</sub> ACTIVÉS. ....                        | 63 |
| FIGURE 25. L'ARRESTINE 3 ET SHP2 SONT RECRUTÉES AUX RÉCEPTEURS β <sub>2</sub> A ACTIVÉS. ....                      | 64 |

**LISTE DES TABLEAUX**

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLEAU 1. LES PARTENAIRES DES ARRESTINES 2 ET 3 AUTRES QUE LES RCPGs.....          | 18 |
| TABLEAU 2. PRÉDICTION DE PHOSPHORYLATION DES RÉSIDUS TYROSINE DE L'ARRESTINE 3..... | 52 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|                    |                                                                                                            |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AT <sub>1a</sub> R | Récepteur de type 1 <sub>A</sub> de l'angiotensine II                                                      |
| β <sub>2</sub> AR  | Récepteur β <sub>2</sub> -adrénergique                                                                     |
| BSA                | <i>Bovine Serum Albumin</i> (albumine sérique bovine)                                                      |
| C-                 | Carboxy terminal                                                                                           |
| DMEM               | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (milieu de culture Eagle modifié par Dulbecco)                     |
| ECL                | <i>Enhanced ChemiLuminescence</i> (chimiluminescence rehaussée)                                            |
| EGFP               | <i>Enhanced-Green Fluorescent Protein</i> (protéine à fluorescence verte rehaussée)                        |
| ELISA              | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (essai enzymatique d'immuno-absorption)                           |
| FBS                | <i>Fetal Bovine Serum</i> (sérum bovin foetal)                                                             |
| GRK                | <i>GPCR kinase</i> (kinase de RCPG)                                                                        |
| GST                | Gluthatione S-Transférase                                                                                  |
| HA                 | Hémagglutinine                                                                                             |
| HEK                | <i>Human Embryonic Kidney Cells</i> (cellules embryonnaires humaines de rein)                              |
| HEPES              | Acide (N-[2-hydroxyéthyl] pipérazine-N'[éthane sulfonique])                                                |
| MAPK               | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> (protéine kinase activée par un mitogène)                          |
| N-                 | Amino terminal                                                                                             |
| PBS                | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (tampon salin phosphaté)                                                  |
| PCR                | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (réaction en chaîne de la polymérase)                                     |
| PFA                | Paraformaldéhyde                                                                                           |
| PTK                | Protéine Tyrosine Kinase                                                                                   |
| PTP                | Protéine Tyrosine Phosphatase                                                                              |
| RCPG               | Récepteur Couplé aux Protéines G                                                                           |
| RTK                | Récepteur à activité Tyrosine Kinase                                                                       |
| SDS                | Sodium DodécylSulfate                                                                                      |
| SDS-PAGE           | <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (électrophorèse d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS) |

|     |                                                 |
|-----|-------------------------------------------------|
| TAE | Tampon Tris-Acide acétique-EDTA                 |
| TBS | <i>Tris Buffered Saline</i> (tampon tris salin) |

## RÉSUMÉ

### SHP2 RÉGULE LA PHOSPHORYLATION DES TYROSINES DE L'ARRESTINE

par

Pascale Germain

Service de Rhumatologie, Centre de Recherche Clinique Etienne-Lebel, Département  
de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

Les arrestines sont connues pour leurs rôles dans la désensibilisation et l'endocytose des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Au fil des ans, plusieurs partenaires de ces protéines adaptatrices ont été identifiés, notamment diverses molécules impliquées dans la signalisation, incluant les kinases ERK, JNK, Akt, Raf et Src. Ainsi, les arrestines interagissent avec plusieurs kinases, mais seulement avec deux phosphatases, PPA2 et MKP7. Récemment, notre laboratoire a démontré une nouvelle interaction entre les arrestines non-visuelles et la phosphatase Shp2. En effet, des essais *in vitro* et *in cellulo* ont montré une interaction directe entre les deux protéines peuvent interagir ensemble et ce directement. Or, nous en sommes venus à nous demander si les arrestines peuvent être phosphorylées sur leurs résidus tyrosine et si cette modification pourrait être régulée par des partenaires connus, soient Src et Shp2. Il a déjà été montré que l'arrestine 2 peut être phosphorylée sur un résidu tyrosine qui lui est unique et que cette modification expliquerait peut-être les différences de modulation entre les arrestines non-visuelles. Par contre, il n'existe encore aucune preuve que l'arrestine 3 puisse aussi être phosphorylée.

D'abord, nous démontrons pour la première fois que l'arrestine 3, tout comme l'arrestine 2, est phosphorylée sur des résidus tyrosines et que cette modification peut être amenée par l'activité de Src. Ensuite, un double mutant ponctuel de l'arrestine 3 a été construit afin de cibler les tyrosines régulées. Il semble que les tyrosines 380 et 404 de l'arrestine 3, soient d'importants sites de phosphorylation. Ce nouveau mutant de l'arrestine 3 représente un excellent outil afin de déterminer le rôle de la phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3. Aussi, puisque ces deux tyrosines sont absentes de la séquence de l'arrestine 2, leur phosphorylation pourrait être à la base des différences fonctionnelles entre les arrestines 2 et 3. De plus, nous faisons la démonstration, en conditions de surexpression en cellules, que l'activité de Shp2 peut mener à la déphosphorylation des arrestines non-visuelles.

Dès lors, nos études montrent d'abord que, tout comme son homologue, l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses tyrosines. De plus, cette phosphorylation est non seulement régulée par la phosphatase Shp2, mais représente également un nouveau mécanisme potentiel de régulation des multiples fonctions des arrestines.

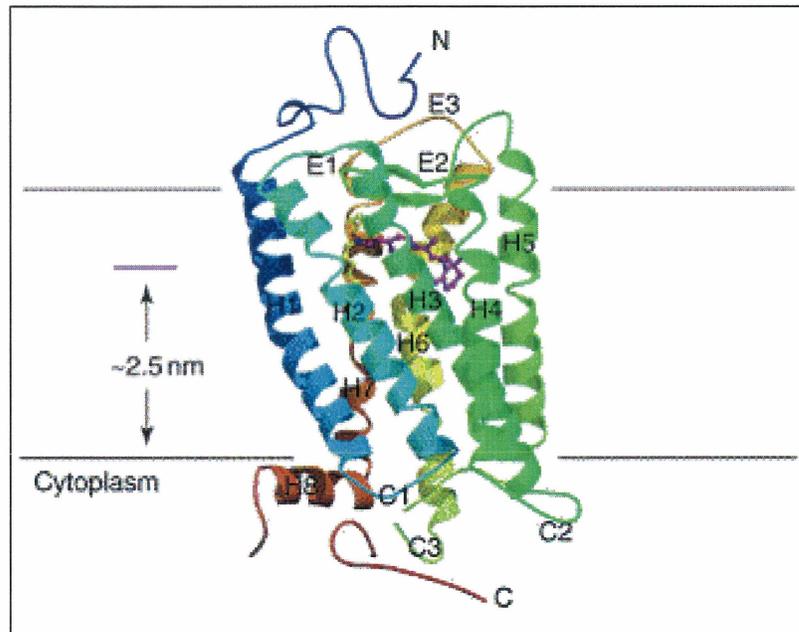
Mots clés ; arrestine, phosphorylation, Shp2, Src, tyrosine

## INTRODUCTION

### 1.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G hétérotrimériques

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs), aussi appelés récepteurs à sept domaines transmembranaires, constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires. Comme l'indique leur nom, ces récepteurs comportent sept hélices  $\alpha$  transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire ainsi qu'une C-terminale intracellulaire [Figure 1]. Les RCPGs peuvent être activés par de multiples messagers intercellulaires incluant les peptides hormonaux, les glycoprotéines, les chimiokines, les lipides bioactifs, les eicosanoïdes, certaines protéases, des acides aminées, les nucléotides, les amines biogéniques et certains ions. Or, ces ligands et leurs récepteurs jouent un rôle de régulateur dans une variété étonnante de processus physiologiques fondamentaux, notamment la sécrétion exocrine et endocrine, la contraction des muscles, la transmission de la douleur, l'homéostasie des fluides, la pression sanguine, les réponses immunitaires, la régulation de la satiété, la température corporelle, etc. De ce fait, les RCPGs et leur signalisation occupent une position cruciale dans le bon fonctionnement de l'organisme. De plus, plusieurs pathologies, en outre de nombreux cancers, sont le résultat d'un dérèglement lié à ces récepteurs. Dès lors, les RCPGs sont la cible de plus de la moitié des médicaments actuellement sur le marché. (ROZENGURT, 2007; LAGERSTRÖM *et* SCHIÖTH, 2008)

Généralement, la signalisation cellulaire induite par la liaison d'un agoniste active le



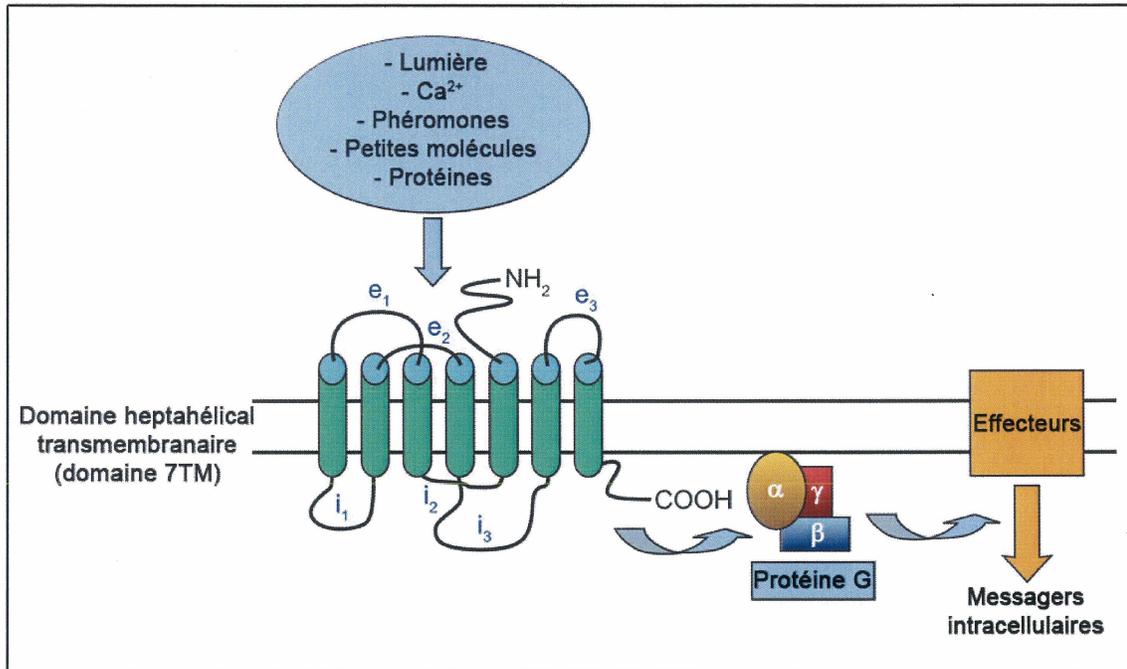
**Figure 1. Structure tridimensionnelle d'un RCPG classique.**

Diagramme en rubans de la structure cristallisée de la rhodopsine, utilisé ici comme modèle de RCPG. Les RCPGs sont des récepteurs formés de sept hélices transmembranaires (H1-H7), trois boucles intracellulaires (C1-C3), trois boucles extracellulaires (E1-E3) ainsi que de deux extensions, une N-terminale (N) et une C-terminale (C). Tirée de SAKMAR, 2002.

RCPG permettant à son tour l'activation d'une ou de plusieurs protéines G hétérotrimériques. Ce sont les protéines G activées qui vont stimuler des effecteurs enzymatiques [Figure 2] tels les adénylates cyclases, les phosphodiesterases et les phospholipases. Ceux-ci propagent alors la signalisation en modulant la concentration intracellulaire de divers messagers secondaires comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le calcium, l'inositol triphosphate (IP3) de même que le diacylglycérol. À partir de ces changements, une grande variété de cascades signalétiques peuvent être enclenchées passant des interactions protéine-protéine aux réactions enzymatiques afin de transmettre l'information au noyau où la transcription des gènes spécifiques s'effectue. D'autre part, dans l'optique de prévenir une stimulation inadéquate ou persistante d'une voie de signalisation, les RCPGs activés déclenchent des mécanismes d'auto-inhibition comprenant la désensibilisation ainsi que l'internalisation. (GUREVICH *et al.*, 2006; MOORE *et al.*, 2007; LEFKOWITZ *et al.*, 2005)

### 1.1.1 La désensibilisation des RCPGs

Après l'activation d'un RCPG s'en suit rapidement une diminution de la sensibilité du récepteur à son agoniste. Cette désensibilisation est la conséquence d'une série d'évènements étroitement liés, soient la dissociation de la protéine G, la phosphorylation du récepteur et l'internalisation de celui-ci de même que la réduction de la synthèse protéique du RCPG et l'augmentation de sa dégradation lysosomale. (DOSS *et al.*, 1981; HADCOCK *et al.*, 1988; BOUVIER *et al.*, 1988; HAUSDORFF *et al.*, 1989; LOHSE *et al.*, 1990a et b; BARAK *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 1996a)



**Figure 2. Représentation simplifiée de la signalisation d'un RCPG.**

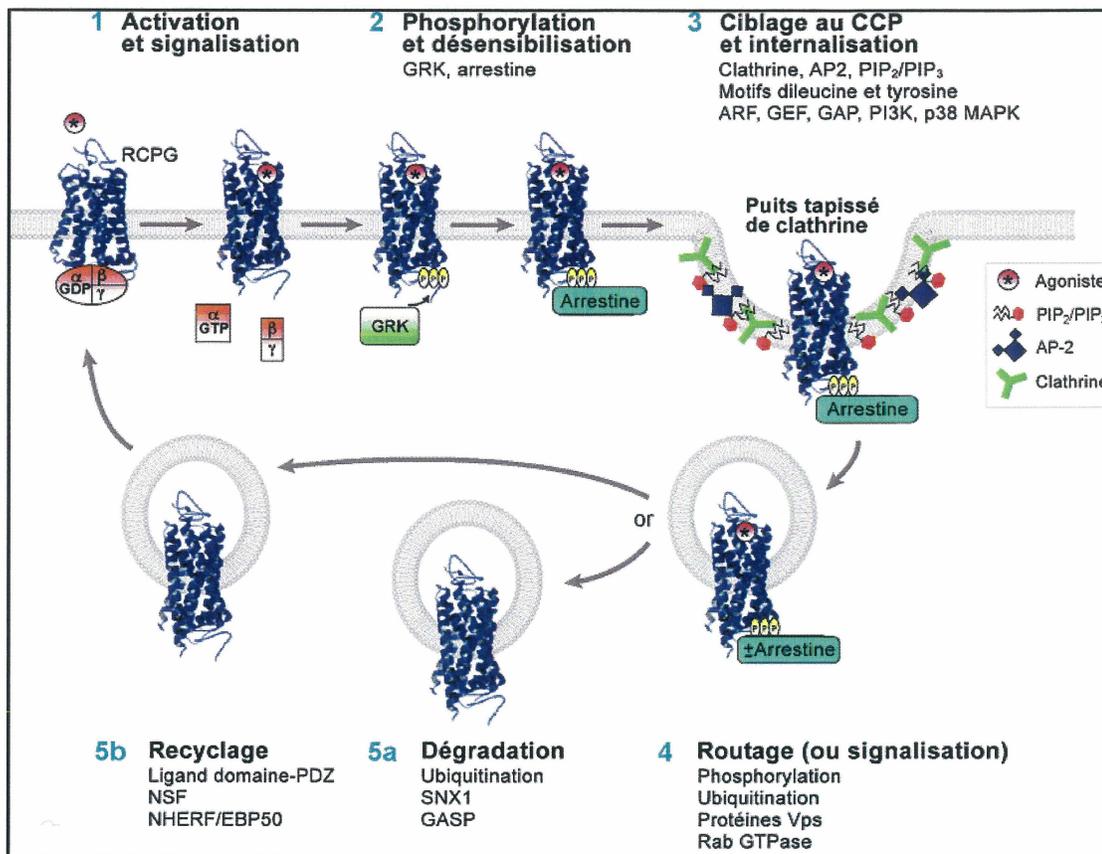
Le RCPG reçoit un stimulus extracellulaire (lumière, calcium, phéromones, petites molécules, protéines, etc.) qui induit un changement conformationnel dans le récepteur facilitant le recrutement et l'activation d'une protéine G, composée des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . À son tour, la protéine G interagit avec divers groupes d'effecteurs qui contrôlent les messagers intracellulaires. Adaptée de BRIDGES et LINDSLEY, 2008.

La phosphorylation du RCPG apparaît dans les secondes ou minutes suivant l'activation de ce dernier et est induite par deux classes de sérine/thréonine protéines kinases dépendantes de seconds messagers, soient la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et la protéine kinase C (PKC), ainsi que les kinases de RCPGs (GRKs) (PREMONT *et al.*, 1995). Cette phosphorylation précède la liaison de l'arrestine aux RCPGs. Les arrestines sont des protéines cytosoliques responsables en grande partie de la désensibilisation du récepteur [Figure 3, étape 2] (FERGUSON *et al.*, 1996a).

### 1.1.2 L'endocytose des RCPGs

La séquestration est l'un des mécanismes utilisés par la cellule pour rétablir l'homéostasie du RCPG. Cet événement correspond en fait à une redistribution intracellulaire du récepteur. Suite à son activation, le récepteur est internalisé par endocytose dans un endosome. Pour ce faire, l'arrestine, elle-même liée au récepteur, recrute des protéines telles la protéine adaptatrice 2 (AP2) et la clathrine qui vont lier la membrane cellulaire et former un puits [Figure 3, étape 3]. Ce puits sera alors refermé et constituera un réservoir de récepteurs appelé endosome qui pourra être redirigé vers différentes voies, notamment celle du recyclage. L'endocytose joue également un rôle important dans la régulation négative des RCPGs. Effectivement, les récepteurs endocytés peuvent aussi être redirigés vers les voies lysosomales en vue de leur dégradation. (FERGUSON *et al.*, 1996b; MOORE *et al.*, 2007)

Par ailleurs, depuis maintenant quelques années, il est connu que les RCPGs peuvent emprunter une autre stratégie de signalisation intracellulaire qui ne fait pas appel aux protéines G. En effet, le recrutement, l'activation et la séquestration des



**Figure 3. Routage intracellulaire d'un RCPG.**

La liaison d'un agoniste (astérisque) à un récepteur mène à l'activation de celui-ci, au couplage d'une protéine G ainsi qu'à la transmission du signal (étape 1). Ensuite, une GRK peut phosphoryler le récepteur activé et cette modification initiera le recrutement de l'arrestine. Cette dernière engagera la désensibilisation du récepteur en inhibant la liaison des protéines G mettant fin à la signalisation (étape 2). Le complexe récepteur-arrestine est alors dirigé vers un puits tapissé de clathrine (CCP, *clathrin-coated pit*) où l'arrestine se lie avec les molécules de clathrine, d'AP2 et de phosphoinositides, résultant en l'internalisation du récepteur à l'intérieur d'une vésicule (étape 3). Finalement, les récepteurs internalisés sont dirigés (étape 4) vers des compartiments de dégradation (étape 5a) ou de recyclage (étape 5b). Adaptée de MOORE *et al.*, 2007.

arrestines 2 et 3, des protéines adaptatrices multipotentes, permettent également à la cellule d'appliquer diverses fonctions cellulaires. (SHENOY *et al.*, 2005b)

## 1.2 Les arrestines non-visuelles

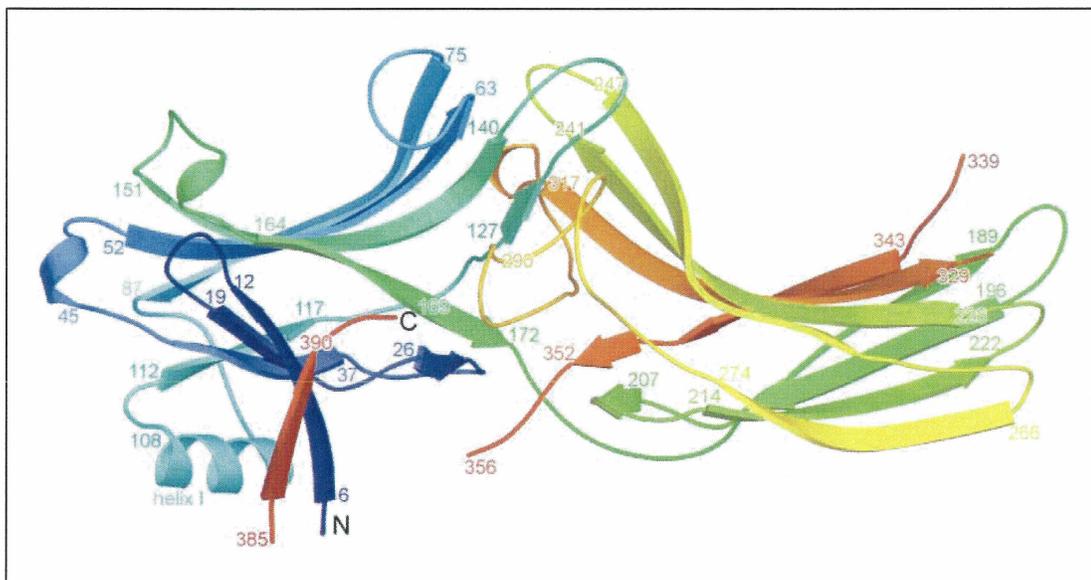
La famille des arrestines regroupe quatre sous-groupes basés sur leur homologie de séquence et leur distribution cellulaire. Il y a l'arrestine visuelle (antigène S ou arrestine 1), l'arrestine C (arrestine X ou arrestine 4), les  $\beta$ -arrestines (arrestine 2 et arrestine 3) ainsi que les arrestines D et E. (SHINOHARA *et al.*, 1987; YAMAKI *et al.*, 1987; LOHSE *et al.*, 1990a; ATTRAMADAL *et al.*, 1992; MURAKAMI *et al.*, 1993; CRAFT *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 1996b; FERGUSON et CARON, 1998) C'est après avoir fait la découverte des arrestines exclusivement exprimées dans les tissus rétiniens (arrestine visuelle et arrestine C) et de leur fonction dans la désensibilisation de la rhodopsine, un RCPG, qu'une protéine homologue a été identifiée dans des tissus non-rétiniens.

En effet, la troisième sous-famille des arrestines regroupe deux membres qui ont été découverts vers la fin des années 80 (BENOVIC *et al.*, 1987). Peu de temps après, ces nouvelles arrestines ont été clonées et nommées arrestines 2 et 3 (LOHSE *et al.*, 1990a et ATTRAMADAL *et al.*, 1992). Elles sont aussi connues sous les noms de  $\beta$ -arrestines 1 et 2 à cause de leur homologie avec les arrestines visuelles et de leur fonction de régulation sur le récepteur  $\beta_2$  adrénergique ( $\beta_2$ AR). Au contraire de leurs consœurs, les arrestines non-visuelles sont exprimées de façon ubiquiste dans tous les tissus. Chacune des arrestines comporte deux isoformes provenant de l'épissage

alternatif du même gène, une courte et une longue (STERNE-MARR *et al.*, 1993; PARRUTI *et al.*, 1993). Celles de l'arrestine 2 sont constituées de 410 et 418 acides aminés, cette dernière ayant les résidus LLGDLASS insérés après le 333<sup>e</sup> acide aminé de l'isoforme courte. Alors que l'isoforme longue de l'arrestine 3 est due à l'insertion de 12 résidus (SAPTTPPLPVP) après le 359<sup>e</sup> résidu de la forme courte constituée de 409 acides aminés. Mis à part certaines variations au niveau de l'expression dans quelques tissus, aucune différence au niveau de leurs fonctions n'a été notée. Il existe une homologie de séquence de 78% entre les arrestines 2 et 3, leur C-terminal étant l'endroit où il apparaît le plus de différences (ATTRAMADAL *et al.*, 1992). Les arrestines sont des protéines cytoplasmiques bien que l'arrestine 2 à l'instar de sa collègue, possède un motif de localisation nucléaire (NLS) lui permettant de se retrouver également au noyau (WANG *et al.*, 2003). De plus, les arrestines sont connues pour s'associer au cytosquelette, plus précisément aux microtubules (HANSON *et al.*, 2007). Il semble que l'arrestine 3 soit davantage associée aux microtubules, 8% de la quantité cellulaire totale par rapport à 3% pour l'arrestine 2. Cette association aurait des impacts tant au niveau des fonctions de l'arrestine que de sa conformation.

### 1.2.1 Structure

L'arrestine 2 a été cristallographiée pour la première fois en 2001 [Figure 4] (HAN *et al.*, 2001). Il a été possible dès lors d'identifier la structure qui est représentative des arrestines en général consistant en deux domaines chacun composé en grande partie de deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles (HIRSCH *et al.*, 1999). Il est souvent question des



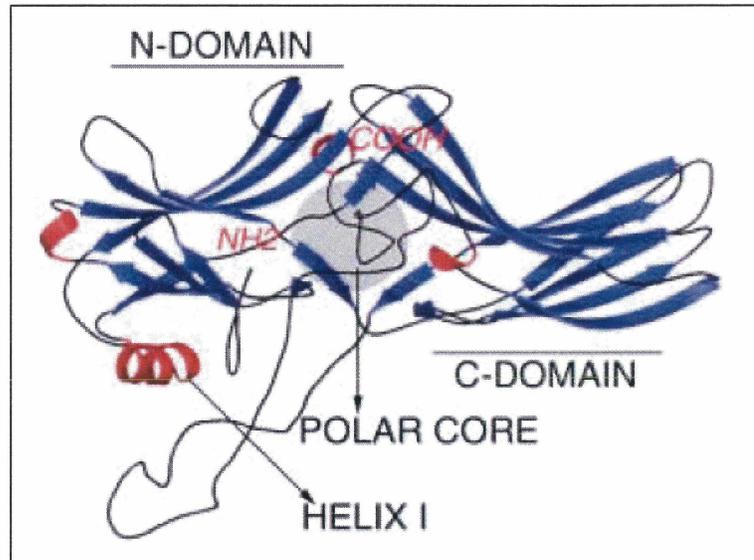
**Figure 4. Représentation en rubans de l'arrestine 2 tronquée (aa. 1 à 393).**

Schéma de la structure cristallisée de l'arrestine 2. Elle est constituée de quatre feuillets  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$ . Les couleurs varient du bleu au rouge allant respectivement du N-terminal au C-terminal. Tirée de HAN *et al.*, 2001.

parties N- et C-terminales de l'arrestine auxquelles viennent s'ajouter le cœur polaire qui permet l'ancrage de la queue C-terminale [Figure 5]. Cette structure basale est dite fermée et se retrouverait davantage liée au cytosquelette (HANSON et al., 2008). Par ailleurs, c'est lorsqu'elle se lie au récepteur activé que l'arrestine adopte une conformation active exposant par le fait même son C-terminal [Figure 6 b] (GUREVICH et GUREVICH, 2004). Cette nouvelle conformation permet à divers partenaires d'interaction d'avoir accès à leur site de liaison, notamment ceux de la clathrine et d'AP2. En effet, l'accessibilité de ces sites revêt un rôle primordial dans la régulation de la signalisation de la plupart des RCPGs.

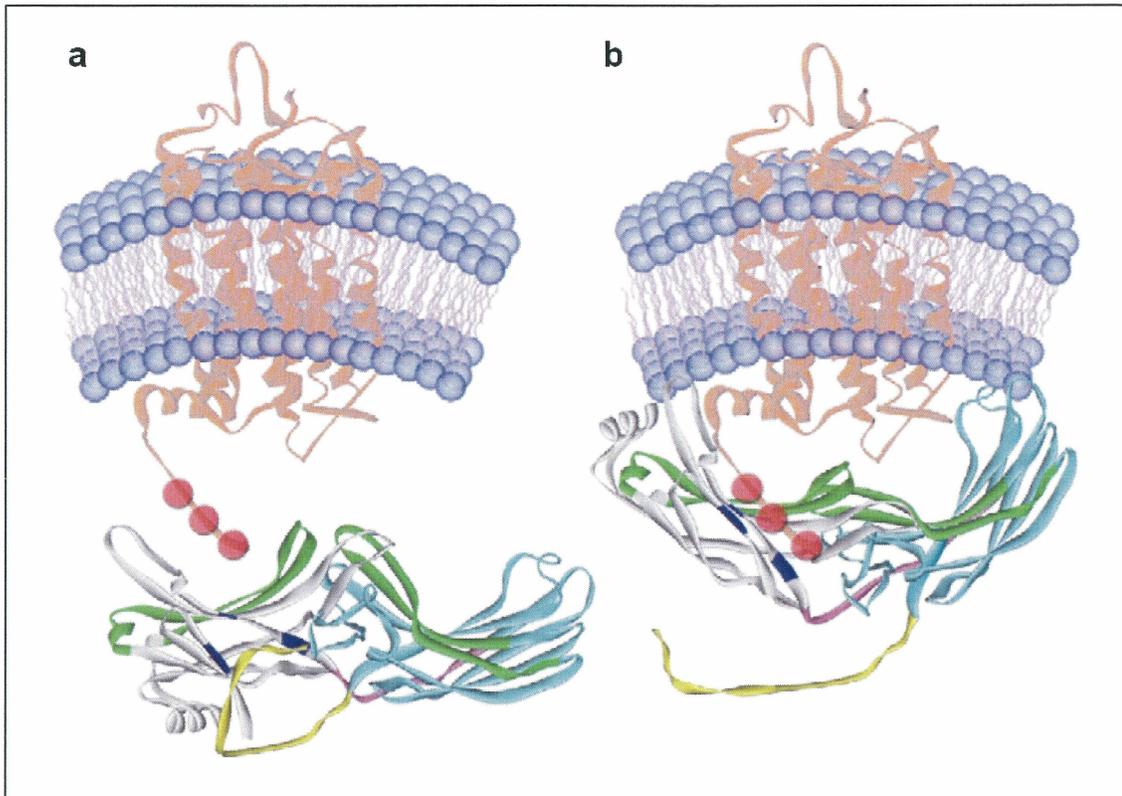
### 1.2.2 Rôle dans la désensibilisation

Comme mentionné précédemment, les arrestines 2 et 3 ont une fonction dans la désensibilisation de la plupart des RCPGs. Effectivement, les arrestines cytosoliques sont recrutées à la membrane plasmique au récepteur activé et phosphorylé, préférablement par les GRKs, et par le fait même découplent la protéine G associée empêchant ainsi le RCPG de se réactiver. Elles ont également une autre fonction dans l'internalisation du récepteur; elles agissent en tant que molécules adaptatrices pour AP2 et la clathrine ainsi que d'autres protéines de la machinerie endocytaire telles la petite protéine G ARF6 de même que son « *guanine nucleotide exchange factor* » ARNO et le NSF (« *N-ethylmaleimide-sensitive factor* ») (CLAING et al., 2002). Ce rôle d'adaptateur permet ainsi d'amener le récepteur activé aux puits tapissés de clathrine pour son endocytose, un processus essentiel au recyclage et à la dégradation des RCPGs [Figure 3]. Deux patrons de recrutement de l'arrestine au RCPG ont été identifiés et servent à départager les récepteurs en deux classes (LEFKOWITZ et



**Figure 5. Identification des principaux domaines des arrestines non-visuelles.**

Modèle de l'arrestine 3 dérivé de la modélisation par homologie à la structure cristallographiée de l'arrestine 2. Les feuillets  $\beta$  sont en bleu, l'hélice  $\alpha$  en rouge et les boucles ainsi que le C-terminal sont en noir. Tirée de LEFKOWITZ *et* SHENOY, 2005.



**Figure 6. Schématisation du changement de conformation de l'arrestine suite à sa liaison à un RCPG activé.**

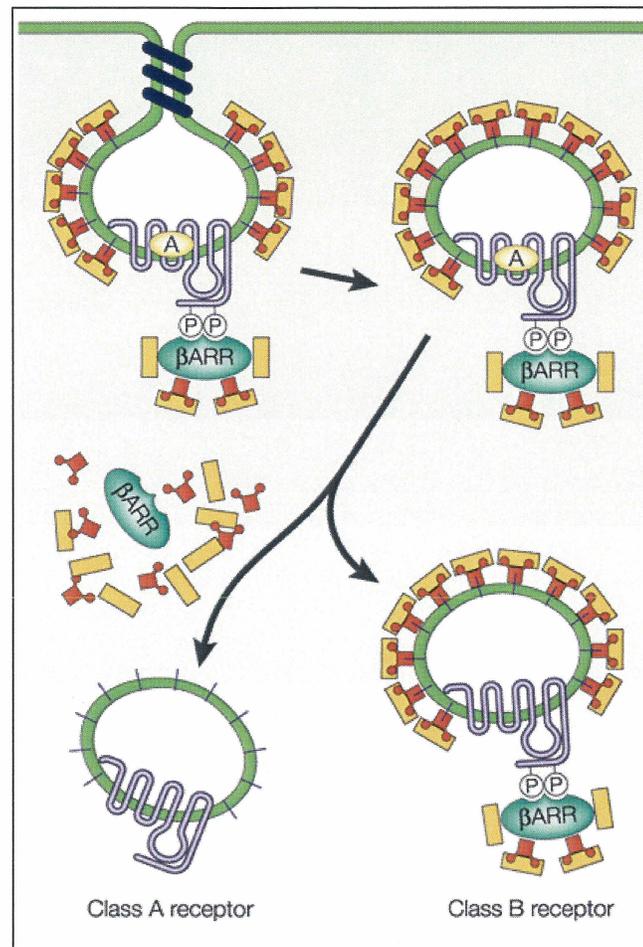
Deux conformations sont possibles pour les arrestines non-visuelles soit inactive (a), le C-terminal est enfoui, et active (b), le C-terminal est exposé. Tirée de GUREVICH et GUYERICH, 2004.

SHENOY, 2005). Certains récepteurs, comme le  $\beta_2$ AR, recrutent l'arrestine d'une façon transitoire avec une faible affinité et sont rapidement recyclés à la membrane suite à leur internalisation. Ces récepteurs sont dits de classe A et se lient préférentiellement à l'arrestine 3. Alors que les membres de la classe B, AT<sub>1a</sub>R (« *Angiotensin type 1a receptor* ») par exemple, n'ont pas de préférence entre les deux arrestines, mais sont connus pour avoir une interaction forte et durable avec celles-ci [Figure 7]. Cette plus grande affinité est expliquée par la présence d'une région sérine/thréonine sur le récepteur et implique que celui-ci se retrouve encore en complexe avec l'arrestine au niveau des endosomes (OAKLEY et al., 2001). D'ailleurs cette interaction soutenue servira également pour une deuxième vague de signalisation qui sera arrestine-dépendante. Le complexe ainsi maintenu fera en sorte de retarder le routage du récepteur, c'est pourquoi le recyclage des RCPGs de classe B est considéré lent.

En plus de leurs rôles au niveau de la désensibilisation et de l'internalisation des RCPGs, les arrestines sont maintenant appréciées pour leur capacité à servir de transducteur de signal.

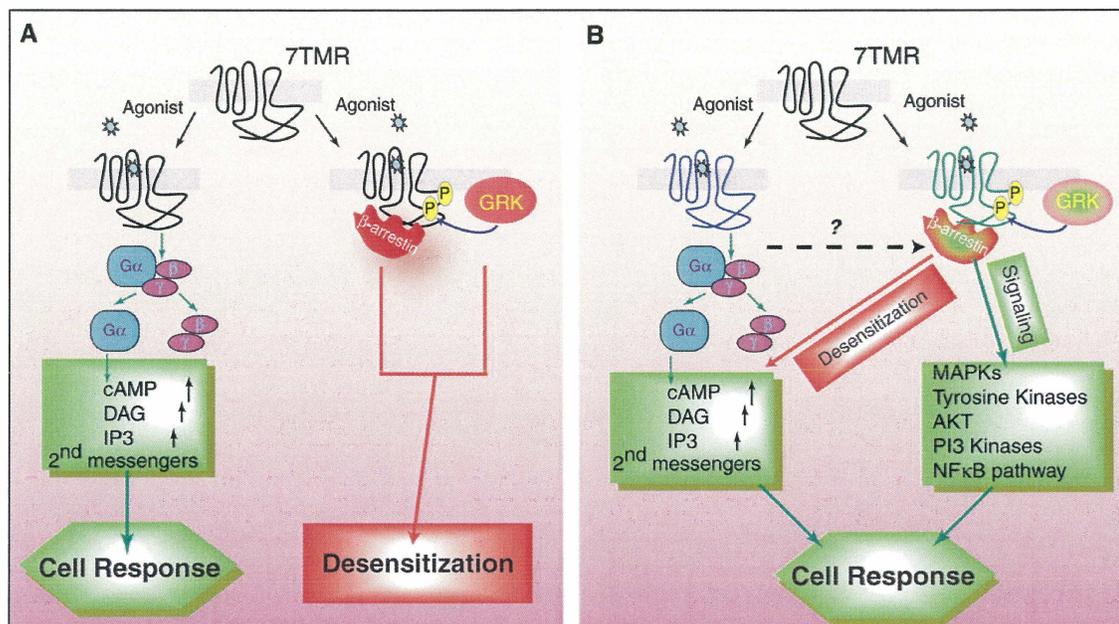
### 1.2.3 Rôle dans la signalisation des RCPGs

Effectivement, il est accepté depuis peu que les arrestines sont des molécules adaptatrices ou d'échafaudage et également transductrices de signaux. Elles peuvent relier le récepteur à diverses voies de signalisation dans la cellule [Figure 8], notamment les tyrosines kinases cytosoliques, les MAPKs (« *Mitogen-Activated Protein Kinases* »), la chimiotaxie et la motilité cellulaire ainsi que la signalisation



**Figure 7. Deux classes de RCPGs selon leurs propriétés d'internalisation.**

Les RCPGs de classe A internalisent préférentiellement avec l'arrestine 3, l'interaction avec l'arrestine est transitoire et ainsi celle-ci ne colocalise pas avec le récepteur au niveau des endosomes. Les RCPGs de la classe B, eux, n'ont pas de préférence entre les arrestine 2 et 3, leur interaction est plus stable et même maintenue au niveau des endosomes.  $\beta$ ARR : arrestine non-visuelle. Tirée de PIERCE *et* LEFKOWITZ, 2001.



**Figure 8. Rôles des arrestines non-visuelles dans la signalisation.**

En (A), la voie classique, le RCPG activé stimule les protéines G et est rapidement phosphorylé par les GRKs. Il y a recrutement de l'arrestine menant à la désensibilisation du récepteur ainsi qu'à l'arrêt de signalisation. En (B), la nouvelle implication de l'arrestine, c'est-à-dire son rôle de transducteur de signal. Tirée de LEFKOWITZ *et* SHENOY, 2005.

anti-apoptotique. Les arrestines peuvent entre autres recruter Src au récepteur activé et ainsi faciliter l'activation des MAPKs régulées par des signaux extracellulaires, plus communément les ERKs (« *Extracellular signal-Regulated Kinases* »). De plus, d'autres membres de la famille de Src peuvent également être recrutés par les arrestines, comme Hck, Fgr et Yes. L'arrestine 3 est aussi appréciée pour être la seule protéine d'échafaudage contrôlée par la stimulation d'un récepteur ayant la capacité d'interagir avec toutes les kinases composant les cascades qui activent les ERKs et JNK3 (« *C-Jun N-terminal Kinase 3* ») (Voir plus loin). (LEFKOWITZ *et* SHENOY, 2005)

Plusieurs études démontrent également la nécessité des arrestines pour la transduction des signaux de chimioattractants de même que dans le comportement migratoire des cellules métastatiques et la signalisation anti-apoptotique. Entre autres, il y aurait une implication du complexe arrestine-ERK1/2 dans la réorganisation du cytosquelette ce qui engage la chimiotaxie (VROON *et al.*, 2006). L'arrestine pourrait lier la cofiline, une protéine impliquée dans la déstabilisation de l'actine (DEFEA, 2007). D'autre part, les arrestines pourraient réguler la transcription de facteurs importants pour la croissance et l'apoptose, ce en liant des facteurs de transcription dans le cytoplasme comme l'oncogène Mdm2 (« *murine double minute* »), un régulateur négatif du suppresseur de tumeur p53 (MA *et* PEI, 2007).

Nécessairement, étant donnée la variété d'implications des arrestines, celles-ci interagissent avec plusieurs autres protéines.

## 1.2.4 Partenaires d'interaction

Une multitude de partenaires d'interaction des arrestines 2 et 3, outre les RCPGs, ont à ce jour été identifiés [Tableau 1]. Parmi ceux-ci, on compte plusieurs protéines des voies de signalisation comme ERK, JNK, p38 et Src, des protéines impliquées dans le routage, des petites protéines G, des protéines membranaires et maints autres. De plus, ces partenaires se lient sur différentes régions de l'arrestine confirmant son rôle de protéine d'échafaudage [Figure 9]. La grande quantité et la diversité des partenaires connus des arrestines démontrent bien leur importance dans la cellule. (GUREVICH *et GUREVICH*, 2006)

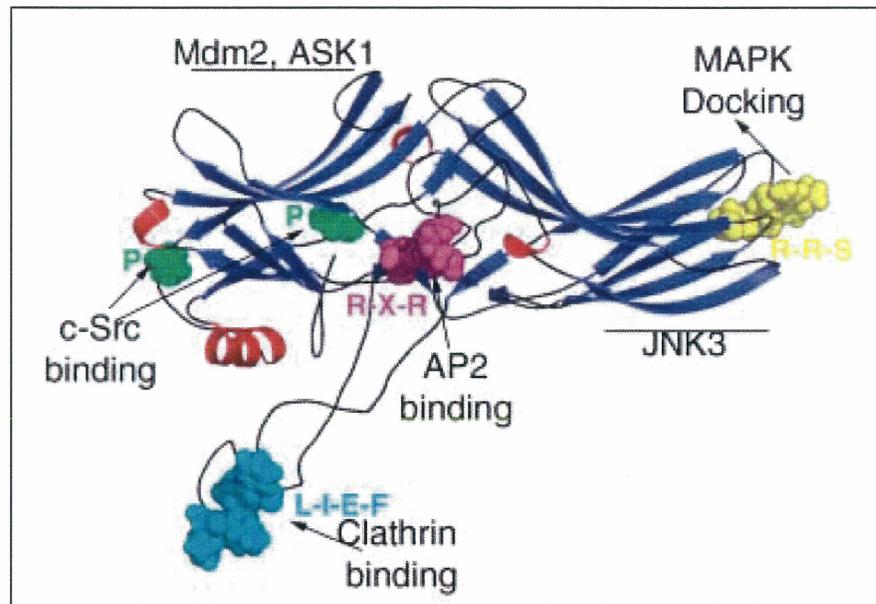
### 1.2.4.1 Les MAPKs

Dans la cellule, la transduction de signal nécessite l'activation de cascades d'évènements spécifiques. Puisqu'il existe une quantité incroyable de cibles qui peuvent être activées et puisqu'il est primordial de maintenir l'intégrité et la spécificité d'un signal, la cellule requiert l'aide de protéines adaptatrices. Ces protéines maintiennent ensemble les membres d'une même voie de signalisation afin de leur conférer un accès privilégié l'un à l'autre pour ainsi assurer l'activation d'une cible précise [Figure 10]. Parmi ces protéines adaptatrices, les arrestines 2 et 3 ont montré cette capacité pour plusieurs voies de signalisation incluant la voie des MAPKs. L'activation des multiples effecteurs de cette voie contrôle différentes fonctions cellulaires, comme la progression du cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle et l'apoptose. Les MAPKs sont une famille de sérine/thréonine kinases incluant ERK1 et 2 (aussi connus sous les noms de p44/p42), p38 kinases et les kinases N-terminal de c-Jun (JNK1, JNK2, JNK3). (DEWIRE *et al.*, 2007)

| Partenaires d'interaction des arrestines          |                        |                      |       |                                                                                                |
|---------------------------------------------------|------------------------|----------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Protéines d'interaction                           | Sous-type d'arrestine  | Forme de l'arrestine |       | Fonction                                                                                       |
|                                                   |                        | Liée au RCPG         | Libre |                                                                                                |
| <b>Protéines de routage</b>                       |                        |                      |       |                                                                                                |
| Clathrine                                         | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | +     | Endocytose                                                                                     |
| AP-2                                              | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | +     | Endocytose                                                                                     |
| NSF                                               | Arrestine2             | +                    | +     | Endocytose, recyclage                                                                          |
| <b>Petites protéines G et facteurs d'échange</b>  |                        |                      |       |                                                                                                |
| ARF6                                              | Arrestine3, arrestine2 | +++                  | +++   | Endocytose, ancrage                                                                            |
| ARNO                                              | Arrestine3             | +++                  | +++   | Endocytose                                                                                     |
| RaiGDS                                            | Arrestine2, arrestine3 | ?                    | +++   | Réorganisation du cytosquelette médiée par Rai                                                 |
| RhoA                                              | Arrestine2             | ?                    | ?     | Formation de fibres de stress AngII-dépendantes                                                |
| <b>Composantes de la cascade MAP kinase</b>       |                        |                      |       |                                                                                                |
| ASK1                                              | Arrestine3             | +++                  | ?     | Activation de JNK3 et p38                                                                      |
| c-Raf-1                                           | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | ?     | Activation des ERKs                                                                            |
| JNK3                                              | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | +++   | Stabilisation de JNK phosphorylée (activée) sur les endosomes; export nucléaire de JNK activée |
| ERK2                                              | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | ?     | Stabilisation des ERKs phosphorylées (activées) sur les endosomes                              |
| <b>Tyrosine kinases cytosoliques</b>              |                        |                      |       |                                                                                                |
| c-Src                                             | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | ?     | Endocytose, activation des ERKs                                                                |
| Yes                                               | Arrestine2             | +++                  | ?     | Activation de $G\alpha_q$ et transport de GLUT4                                                |
| Hck                                               | Arrestine2             | +++                  | ?     | Exocytose des granules des neutrophiles                                                        |
| Fgr                                               | Arrestine2             | +++                  | ?     | Exocytose des granules des neutrophiles                                                        |
| <b>Protéines membranaires non-RCPG</b>            |                        |                      |       |                                                                                                |
| Échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> de NHE5 | Arrestine2, arrestine3 | ?                    | +     | Routage                                                                                        |
| Récepteur de l'IGF I                              | Arrestine2, arrestine3 | ?                    | +     | Routage                                                                                        |
| Récepteur du LDL                                  | Arrestine3             | ?                    | +     | Routage                                                                                        |
| Récepteur type III du TGF- $\beta$                | Arrestine3             | ?                    | +     | Routage                                                                                        |
| Récepteur du TrkA                                 | Arrestine2             | ?                    | +     | Endocytose, activation des MAPKs                                                               |
| <b>Autres</b>                                     |                        |                      |       |                                                                                                |
| Mdm2                                              | Arrestine2, arrestine3 | ++                   | +++   | Ubiquitination du récepteur, endocytose, export nucléaire de Mdm2                              |
| I $\kappa$ B $\alpha$                             | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | +     | Stabilisation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , $\beta$ 2AP et stimulation du TNFR                     |
| Famille PDE4D                                     | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | ?     | Dégradation de l'AMPc                                                                          |
| PP2A                                              | Arrestine2             | +++                  | +++   | Déphosphorylation de la Ser412                                                                 |
| MKP7                                              | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | ?     | Déphosphorylation                                                                              |
| Akt                                               | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | ?     | Déphosphorylation                                                                              |
| Microtubules                                      | Arrestine2, arrestine3 | -                    | +++   | Localisation subcellulaire                                                                     |
| Dishevelled                                       | Arrestine2, arrestine3 | ?                    | +     | Régulation de la transcription, endocytose de Frizzled4                                        |
| TRAF6                                             | Arrestine3             | ?                    | ?     | Régulation de la signalisation du TLR-IL-1R                                                    |
| Histone acétyltransférase p300                    | Arrestine2             | ?                    | +++   | Régule l'acétylation de l'histone H4 et l'activité des promoteurs p27 et c-fos                 |
| Calmoduline (avec Ca <sup>2+</sup> )              | Arrestine2, arrestine3 | -                    | +++   | Signalisation Ca <sup>2+</sup> ?                                                               |
| <b>Petites molécules</b>                          |                        |                      |       |                                                                                                |
| Phosphoinositides                                 | Arrestine2, arrestine3 | +++                  | +++   | Endocytose                                                                                     |
| Inositol phosphates                               | Arrestine2, arrestine3 | -                    | +++   | Oligomérisation de l'arrestine, inhibition de la liaison au récepteur                          |

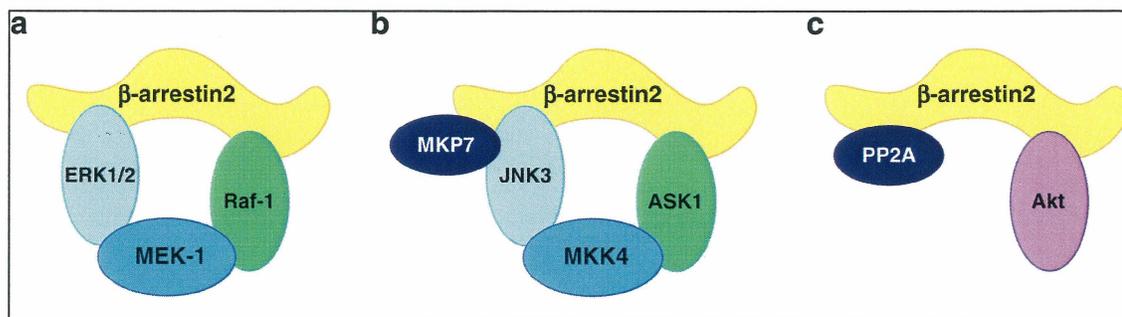
**Tableau 1. Les partenaires des arrestines 2 et 3 autres que les RCPGs.**

Adapté de GUREVICH *et* GUREVICH, 2006.



**Figure 9. Schématisation des différents sites de liaison connus sur l'arrestine.**

Motifs d'interaction protéine-protéine des arrestines. Src et Mdm2 lient le domaine N alors que les protéines AP2 et clathrine interagissent plutôt avec la queue C-terminale. Quant aux kinases, comme celles de la voie des MAPK et JNK3, elles se retrouvent plutôt liées au domaine C. Tirée de LEFKOWITZ *et* SHENOY, 2005.



**Figure 10. Rôle d'adaptateur de l'arrestine 3 dans l'activation de la voie des MAPKs.**

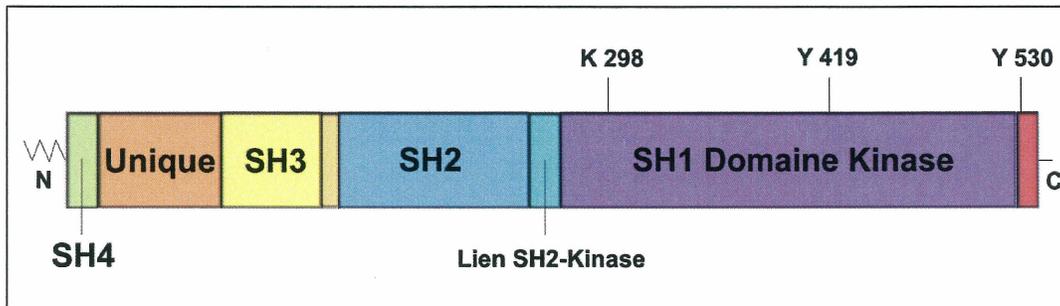
L'arrestine 3 peut induire l'activation de la voie des MAPKs en formant un complexe protéique avec ERK1/2 (a) ou JNK3 (b). Elle régule aussi la kinase Akt en recrutant la phosphatase qui peut la rendre inactive, PP2A. Ce phénomène de régulation est aussi présent entre JNK3 et MKP7. Tirée de DEWIRE *et al.*, 2007.

### 1.3 La Tyrosine Kinase Src

La phosphorylation des résidus tyrosine joue un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose et la motilité. Les tyrosines kinases sont donc des enzymes impliquées dans une foule de processus physiologique des cellules. Ces kinases sont classées comme étant soit des récepteurs tyrosine kinases (RTKs) ou des tyrosines kinases cytosoliques, *non-receptor tyrosine kinase* (nRTKs). Les RTKs ont trois domaines distincts ; un domaine extracellulaire, un transmembranaire et un domaine intracellulaire comprenant l'activité catalytique nécessaire à la transduction de signal. À l'opposé, les nRTKs possèdent des domaines tels Src homology 2 (SH2), SH3 et des domaines homologues à la Pleckstrine (Ptl). (SANDILANDS *et* FRAME, 2008)

Parmi les nRTKs, une famille de neuf membres, certains sont associés à la membrane comme c-Src qui a été nommé suite à la découverte de son homologue, le premier oncogène v-Src, produit du virus du Sarcome Rous. Src est très importante pour la survie cellulaire, de plus elle a été identifiée en surexpression ou en activité dans plusieurs tumeurs. Cette kinase a une masse moléculaire de 60 kDa et comprend six domaines fonctionnels [Figure 11]: le domaine kinase (SH1), les domaines SH2, SH3 et SH4, le segment unique ainsi que le domaine C-terminal. (ROSKOSKI *et al.*, 2005)

Ces domaines possèdent plusieurs fonctions; Le domaine SH1 est responsable de l'activité kinase. Les domaines SH2 et SH3 se fixent de manière respective à des séquences riches en prolines et à des résidus tyrosine phosphorylés. Finalement, le



**Figure 11. Sites de phosphorylation et organisation de Src.**

Du N- au C-terminal, Src comporte un groupement myristoylé de 14 carbones, un domaine SH4, un segment unique, un domaine SH3, un domaine SH2, un domaine protéine tyrosine kinase (SH1) ainsi qu'une queue C-terminale régulatrice. La phosphorylation du résidu tyrosine du domaine SH1 (Y<sup>419</sup>) a un effet activateur sur l'activité de Src, tandis que celle de la tyrosine du C-terminal (Y<sup>530</sup>) a plutôt un effet d'inhibition. Dès lors, une mutation de cette dernière tyrosine en phénylalanine résulte en un mutant constitutivement actif de Src. Quant au résidu cystéine (K<sup>298</sup>), il est situé dans la pochette catalytique et sa mutation en résidu arginine résulte en un mutant catalytiquement inactif de Src. Mis à part le groupement myristoylé attaché au domaine SH4, la longueur relative des domaines est représentative. Inspirée de ROSKOSKI *et al.*, 2005.

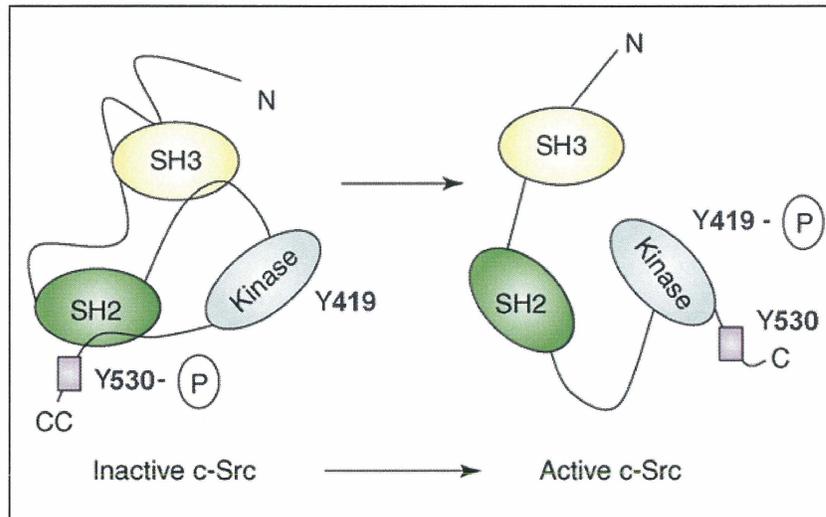
domaine SH4 est responsable de la liaison de l'enzyme aux différentes membranes (plasmique, endosomale, périmoléculaire). (THOMAS *et* BRUGGE, 1997; ROSKOSKI, 2004)

La phosphorylation de la tyrosine à la position 527 (Y<sup>527</sup>) située sur la queue C-terminale de Src est capitale pour la régulation de l'activité de l'enzyme. En effet, comme la figure 12 l'illustre, lorsque la Y<sup>527</sup> est phosphorylée, le C-terminal interagit avec le domaine SH2 ce qui maintient le SH3 en lien avec la région charnière entre le SH2 et le domaine kinase. Dans ces conditions, Src est en conformation fermée et la Y<sup>419</sup> n'est pas phosphorylée ce qui implique que Src est inactive catalytiquement. D'ailleurs il est connu que lorsque la tyrosine 530 est mutée en phénylalanine (Y<sup>530</sup>F), l'enzyme est alors constitutivement active, car son mécanisme d'auto-inhibition n'est plus existant. (SANDILANDS *et* FRAME, 2008)

Dans la cellule, le niveau de phosphorylation de protéines sur des résidus tyrosines est contrôlé par deux réactions opposées catalysées par les protéines tyrosine kinase (PTKs) et les protéines tyrosine phosphatase (PTPs).

#### **1.4 Les protéines tyrosine phosphatase**

La superfamille des PTPs compte environ 90 membres chez l'humain et est divisée en quatre familles selon la similarité des séquences ainsi que des domaines catalytiques. Les enzymes de classe I, II et III sont caractérisées par le motif consensus HC(X)<sub>5</sub>R situé dans le site actif de leur domaine catalytique (ANDERSEN *et al.*, 2001). Parmi



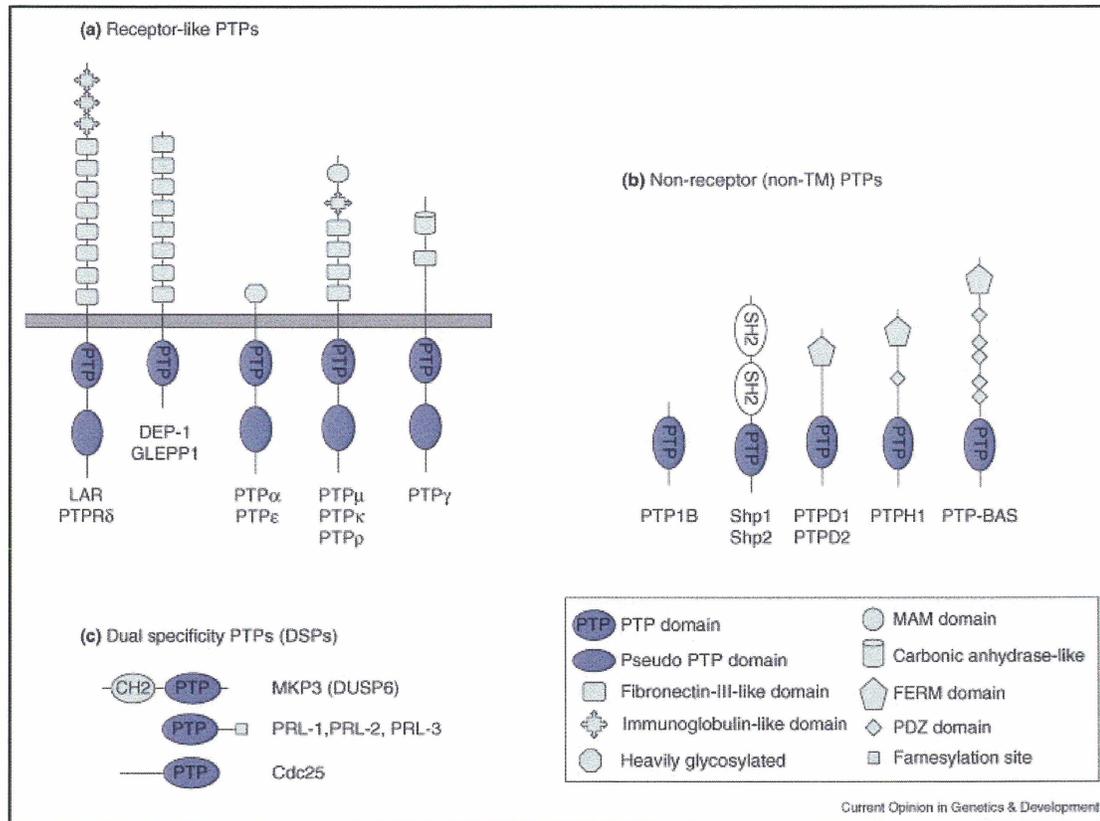
**Figure 12. Conformations inactive et active de Src.**

Lorsque Src est en conformation fermée (inactive), la tyrosine Y<sup>530</sup> est phosphorylée et interagit avec le domaine SH2, le domaine SH3 est engagé avec le lien SH2-kinase et la tyrosine Y<sup>419</sup> n'est pas phosphorylée. Tandis que lorsque Src est activée, la tyrosine Y<sup>530</sup> est déphosphorylée ce qui libère le domaine kinase et permet l'auto-phosphorylation de la tyrosine Y<sup>419</sup>. De plus, dans cet état, les domaines SH2 et SH3 sont libres et peuvent recruter d'autres molécules. Adaptée de SANDILANDS *et* FRAME, 2005.

les phosphatases de classe I, il y a les phosphatases à double spécificité (DSPs), qui incluent les sérine/thréonine kinases et les thréonine/tyrosine kinases, et les PTPs classiques (38 membres) [Figure 13]. Ces dernières sont tyrosine-spécifique et contiennent toutes un domaine phosphatase qui est flanqué de différentes séquences régulatrices comme par exemple les domaines PDZ, FERM et SH2. Ces domaines accessoires sont spécifiques à chaque phosphatase et permettent de cibler le domaine catalytique à des localisations intracellulaires et des complexes protéiques précis où résident leurs substrats et protéines régulatrices. Cette famille de PTPs regroupe les receptor-like PTPs (rPTPs) et une variété de phosphatases non-transmembranaires (nPTPs). Celles-ci ont une structure caractéristique composée de multidomains dans laquelle se retrouvent des modules accessoires reconnus pour avoir d'importantes fonctions, tels SH2 et les régions riches en prolines. Ces modules ont une grande implication dans la liaison de partenaires d'interaction et aussi au niveau de la structure de l'enzyme. Parmi les nPTPs présentes chez les vertébrés, il n'y a que deux phosphatases à double domaine SH2 soient Shp1 et Shp2 (SH2 domain-containing PTPs). Ayant ainsi deux SH2, les Shps se retrouvent avec une plus grande avidité pour les protéines phosphorylées et peuvent aussi s'autoréguler. (NEEL *et al.* 2003; ALONSO *et al.* 2004)

#### **1.4.1 Les Shps affichent des fonctions biologiques distinctes**

Les Shps ont une homologie de séquence d'environ 60%, mais leur patron d'expression et leurs fonctions biologiques sont très distincts. En effet, Shp2 est une enzyme ubiquiste alors que Shp1 affiche une expression plus restreinte, concentrée dans les cellules hématopoïétiques. De façon générale, Shp1 réprime la transduction de



**Figure 13. Les protéines tyrosine phosphatase de classe I.**

Les PTPs de classe I comprennent les phosphatases classiques qui sont subdivisées en phosphatases transmembranaires (« *receptor-like PTPs* »), phosphatases cytoplasmiques (« *non-receptor PTPs* »), et les phosphatases à spécificité double (DSPs). Tirée de MOHI et NEEL, 2007.

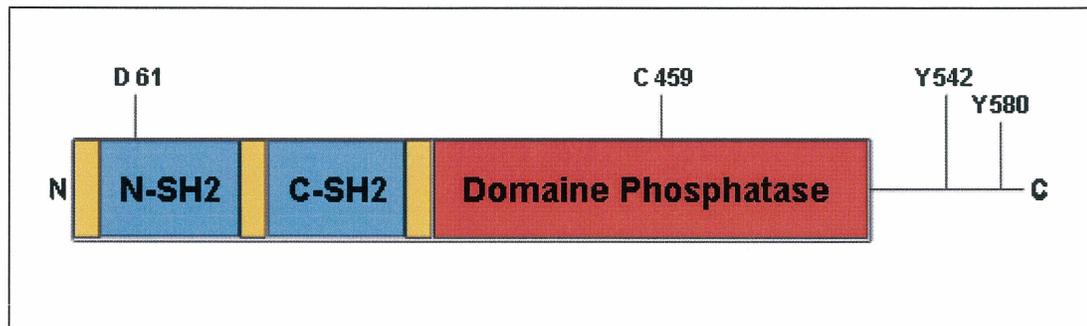
plusieurs voies de signalisation hématopoïétiques émanant des cytokines, facteurs de croissance et molécules d'adhésion alors que Shp2 a plutôt un rôle positif au niveau de la signalisation cellulaire. (NEEL *et al.*, 2003; POOLE *et al.*, 2005; CHONG *et MAIESE*, 2007)

## 1.5 La phosphatase Shp2

L'importance de Shp2 vient d'abord du fait que son gène, PTPN11, a été identifié comme le premier oncogène de la superfamille des PTPs. La phosphatase Shp2 est exprimée dans toutes les cellules. C'est une protéine cytoplasmique de 68 kDa qui comme l'illustre la figure 14, est principalement constituée de deux domaines SH2 suivis d'un domaine phosphatase ainsi que d'une portion C-terminale contenant une région riche en prolines et deux tyrosines pouvant être phosphorylées. (FREEMAN *et al.*, 1992; JIANG *et ZHANG*, 2008)

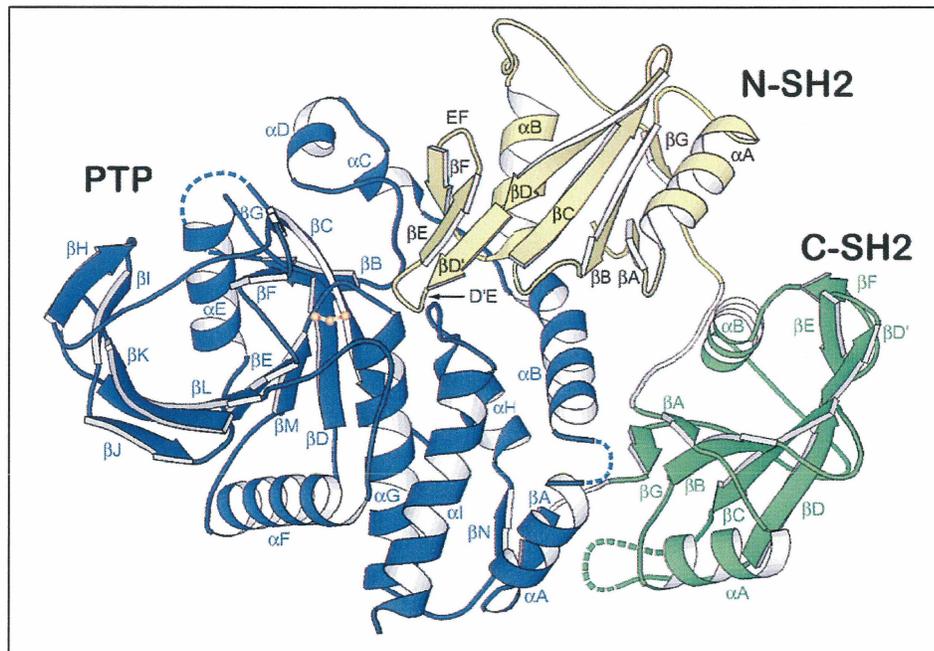
### 1.5.1 Structure et régulation de l'activité phosphatase

La protéine Shp2 est essentiellement inactive dans sa conformation basale, car les domaines SH2 enveloppent le domaine phosphatase comme le démontre sa structure cristallographique [Figure 15] (HOF *et al.*, 1998). Cette structure met également en évidence le résidu cystéine 459 de la pochette catalytique. Ce résidu est l'entremise de liens intramoléculaires non-covalents situés entre son domaine N-SH2 et son site actif. L'activité de Shp2 augmente drastiquement en fonction de l'accessibilité de ses domaines SH2 (BARFORD *et NEEL*, 1998). Deux méthodes sont connues pour



**Figure 14. Sites importants et organisation de Shp2.**

Shp2 comporte trois domaines principaux : deux domaines SH2 et un domaine catalytique. La phosphatase peut être modulée par la phosphorylation des tyrosines 542 et 580 en C-terminal. Les mutants constitutivement actif et dominant négatif de Shp2 ont chacun une mutation ponctuelle, soit respectivement au niveau de l'asparagine 61 et de la cystéine 459. Inspirée de FREEMAN *et al.*, 1992.



**Figure 15. Schéma en rubans de la structure cristallisée de la tyrosine phosphatase Shp2.**

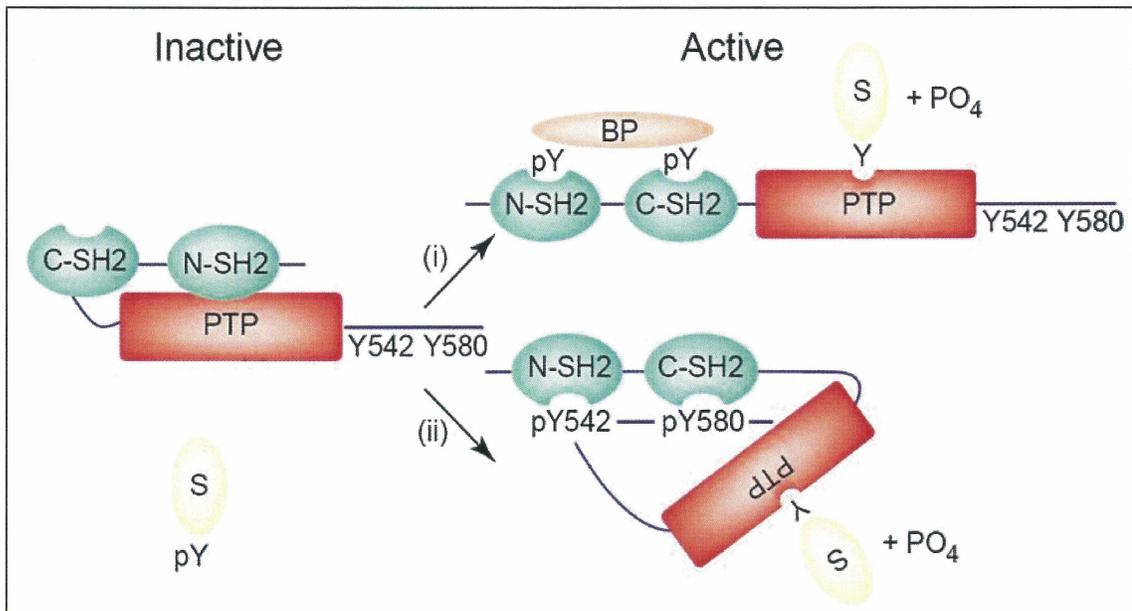
Représentation de la structure cristallisée d'un mutant tronqué de Shp2 (aa.1-527) qui ne contient pas le C-terminal. Les domaines N- et C-SH2 sont respectivement jaune et vert, le domaine catalytique (PTP) est bleu puis les interdomaines sont blancs. De plus, la chaîne latérale du résidu cystéine 459, responsable de l'activité catalytique, est orange. Tirée de HOF *et al.*, 1998.

engager l'activité de l'enzyme via les domaines SH2; l'interaction avec un ligand exposant des résidus tyrosine phosphorylés ou encore la liaison intramoléculaire de la queue C-terminale phosphorylée [Figure 16].

D'abord, la stimulation induite par des facteurs de croissance ou des cytokines peut mener les domaines SH2 à lier des protéines d'ancrage tyrosine-phosphorylées comme Gab1 et Gab2. Cette liaison relève alors l'auto-inhibition de Shp2 activant par le fait même son activité catalytique (MOHI *et* NEEL, 2007). D'autre part, Shp2 est phosphorylée sur ses tyrosines en réponse à plusieurs stimuli dont maints facteurs de croissance (FENG *et al.*, 1993; VOGEL *et al.*, 1993; LECHLEIDER *et al.*, 1993). En effet, la tyrosine 542 (Y<sup>542</sup>) de la queue C-terminale de Shp2 est un site majeur de phosphorylation et cette modification crée un site de liaison pour les protéines contenant un domaine SH2 (BENNETT *et al.*, 1994). La phosphatase Shp2 peut également être phosphorylée à la position 580 (Y<sup>580</sup>). Ainsi phosphorylé le C-terminal de la phosphatase peut interagir avec les domaines SH2 et contribuer grandement au maintien de la conformation active de Shp2 (BARFORD *et* NEEL., 1998).

### **1.5.2 Rôle dans la signalisation des RTKs**

Shp2 est impliquée dans la régulation de réponses induites par l'activation des récepteurs de facteurs de croissance et est par conséquent associée à la prolifération, la différenciation et la migration cellulaires. La phosphatase joue un rôle essentiel dans la plupart des voies de signalisation des RTKs. La fonction de Shp2 est d'ailleurs requise pour la pleine activation de la voie Ras-Raf-MEK-ERK. Dans certains types cellulaires



**Figure 16. Régulation et conformation de Shp2.**

De façon basale l'enzyme est inactive car son domaine N-SH2 interagit avec la pochette catalytique du domaine PTP empêchant ainsi le substrat (S) d'y accéder. Deux modes d'activation de Shp2 sont connues et induisent l'engagement des domaines SH2 soit avec un ligand (BP) exposant des tyrosines phosphorylées (i) ou encore via la liaison intramoléculaire de la queue C-terminale phosphorylée sur les tyrosines 542 et 580 (ii). Tirée de NEEL *et al.*, 2003.

et pour certains RTKs, comme pour l'activation du « *insulin-like growth factor-1* » (IGF-1) au niveau des fibroblastes, il n'y a pratiquement pas d'activation des ERKs sans Shp2. Alors que pour la plupart des RTKs, la phosphatase est nécessaire au soutien de l'activation de cette voie de signalisation. (VAN VACTOR *et al.*, 1998; FENG, 1999; CHONG *et MAIESE*, 2007)

Il est connu que Shp2 agit en amont des protéines Ras, petites GTPases régulant plusieurs voies de signalisation menant à des réponses cellulaires telles la prolifération, la survie et la différenciation. Comme le schématise la figure 17, suite à la liaison d'une cytokine ou d'un facteur de croissance, Shp2 s'associe au récepteur et à différentes protéines adaptatrices comme Grb2 (« *growth-factor-receptor bound protein 2* ») et Gab (« *Grb2 associated binding* »). Même s'il est établi que Shp2 est nécessaire à la signalisation, les substrats spécifiques à l'activation de Ras-Raf-MEK-ERK sont encore incertains. (SCHUBBERT *et al.*, 2007)

Parmi les substrats connus on retrouve SHPS-1 (« *Shp Substrate-1* ») qui lorsqu'activé pourrait à son tour activer la voie des ERKs [Figure 17 (a, droite)]. Tandis que lorsque Sprouty (Spry) serait déphosphorylée, elle ne pourrait plus séquestrer Grb2/Sos dans le cytoplasme [Figure 17 (b, gauche)]. Une autre hypothèse est que Shp2 pourrait inhiber un régulateur négatif des MAPKs, comme p120-RasGAP [Figure 17 (b, droite)]. De plus, Shp2 pourrait déphosphoryler Cbp/PAG et la paxilline sur leurs sites de liaison à Csk (« *C-terminal Src Kinase* »), ce qui empêcherait Csk de phosphoryler Src sur sa tyrosine inhibitrice [Figure 17 (c)]. (DANCE *et al.*, 2008)

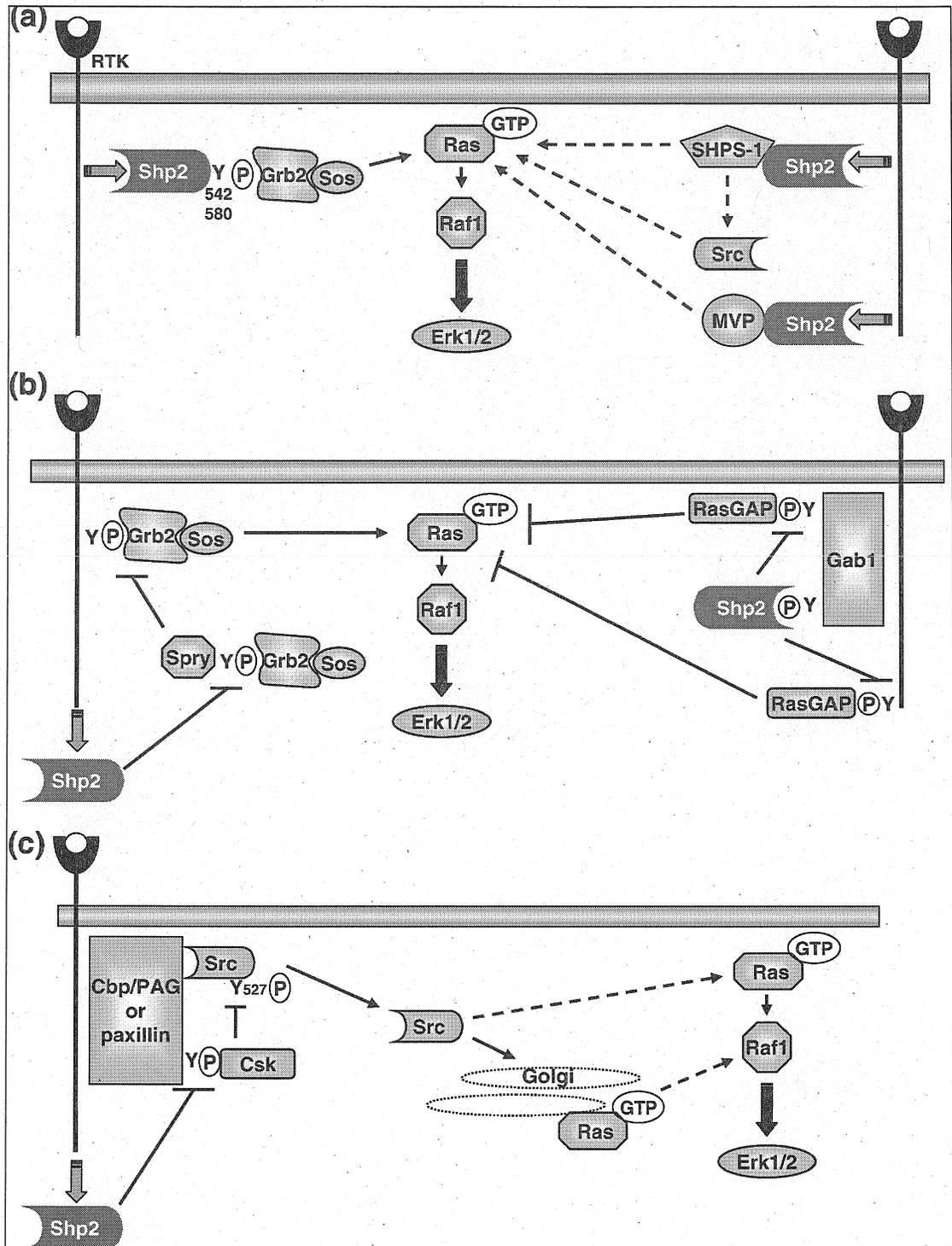


Figure 17. Rôle positif de Shp2 dans l'activation de la voie des MAPKs.

Tirée de DANCE *et al.*, 2008.

### 1.5.3 Rôle dans la signalisation des RCPGs

Plusieurs récentes évidences semblent indiquer que Shp2 aurait une implication au niveau de la signalisation des RCPGs. D'abord, il fût montré que Shp2 peut être activée suite à la stimulation de RCPGs, tels le récepteur SST2 de la somatostatine ou encore le récepteur AT<sub>1</sub> de l'angiotensine (TANG *et al.*, 1999; FERJOUX *et al.*, 2003; DOAN *et al.*, 2004). La phosphatase pourrait également être recrutée directement à certains RCPGs, comme CXCR4 (« *CXC chemokine receptor 4* ») et le récepteur B2 de la bradykinine, et cela mènerait à l'activation de Shp2 (CHERNOCK *et al.*, 2001; DUCHENE *et al.*, 2002). Shp2 est plus connu pour son rôle positif dans la signalisation, mais il semblerait selon ces études que la phosphatase soit recrutée aux RCPGs comme régulateur négatif. C'est-à-dire qu'elle serait utilisée pour inhiber des voies de signalisation entre autres celle de la prolifération cellulaire.

### 1.5.4 Pathologies

Le déséquilibre de la balance entre les PTKs et les PTPs se traduit en une phosphorylation de tyrosines aberrante, un phénomène qui a été relié à plusieurs maladies humaines notamment le cancer (JIANG *et* ZHANG, 2008). Des mutations somatiques activatrices de Shp2 ont été reportées dans le syndrome myélodysplasique de l'enfance, les maladies myéloprolifératives et la leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML), une leucémie avec une forte prévalence chez les individus atteints du syndrome de Noonan. (POOLE *et al.*, 2005; TARTAGLIA *et al.*, 2003; JIANG *et* ZHANG, 2008) Or, il est connu que des mutations somatiques dans le gène PTPN11 causent approximativement 50% des cas de syndrome de Noonan de même que, de

façon beaucoup moins fréquente, le syndrome de LEOPARD (TARTAGLIA *et al.* 2001; TARTAGLIA *et al.* 2004). Le syndrome de Noonan est une maladie génétique relativement commune (environ 1/1500 naissances) qui est caractérisée par une petite taille, une dysmorphie faciale, des malformations squelettiques ainsi qu'un large spectre de défauts cardiaques congénitaux (NOONAN, 2006). Le syndrome de LEOPARD est une pathologie congénitale beaucoup plus rare également caractérisée par des anomalies faciale et cardiaque, mais aussi au niveau de la peau (SARKOZY *et al.*, 2008).

## 1.6 Problématique

Les arrestines sont désormais reconnues comme des protéines adaptatrices multipotentes impliquées dans une panoplie de mécanismes signalétiques. La désensibilisation, l'internalisation et le routage des RCPGs, les fonctions des arrestines ne s'arrêtent pas là. En effet, elles sont maintenant connues comme instigatrices d'une seconde vague de signalisation par l'entremise de protéines telles les MAPKs qu'elles recrutent au RCPG activé. Les arrestines interagissent avec de nombreuses kinases telles ERK1, ERK2, Raf-1, JNK3, Akt et Src. Par contre, seulement deux phosphatases sont connues pour s'associer aux arrestines, soient la sérine/thréonine phosphatase PP2A ainsi que la tyrosine/thréonine phosphatase MKP7 (BEAULIEU *et al.*, 2005; WILLOUGHBY *et COLLINS*, 2005).

Il est connu que le complexe Src-arrestine a d'importantes fonctions et que Src et Shp2 peuvent participer à la régulation de certains événements. Notre laboratoire s'intéresse à l'interaction de Shp2 avec les arrestines et à en connaître la fonction. De plus, il est connu que Shp2 est une composante importante des RTKs et il semblerait même que Shp2 puisse également intervenir au niveau des RCPGs.

Dernièrement, notre laboratoire a montré que Shp2 est un partenaire d'interaction des arrestines non-visuelles. En effet, les premiers essais de co-immunoprécipitation en cellules ont démontré que Shp2 se retrouve en complexe avec les arrestines 2 et 3. Par la suite, d'autres essais, cette fois avec des protéines purifiées, ont permis de

déterminer que Shp2 se lie directement aux arrestines. De plus, il a été montré que les domaines SH2 de Shp2 ne sont pas nécessaires à cette interaction et que la région comprenant les acides aminés 100-201 de l'arrestine semble essentielle à l'association. (TURCOTTE, 2008)

Dès lors, nous intéressant davantage à cette nouvelle interaction, nous en sommes venus à nous demander si l'arrestine pourrait être régulée par l'activité phosphatase de Shp2. La phosphorylation de tyrosines est un mécanisme important et spécifique, qui permet la modulation de plusieurs protéines que ce soit au niveau de leur activité, de leur structure ou encore de leurs interactions diverses. De plus, les arrestines 2 et 3 ont respectivement 12 et 13 résidus tyrosine. Aussi, récemment un groupe a démontré que l'arrestine 2 pouvait être phosphorylée par Src et que cette modification serait impliquée dans la liaison de la sous-unité  $\mu$  de la protéine AP2 (MARION *et al.*, 2007). Cette phosphorylation aurait lieu sur une tyrosine qui est unique à l'arrestine 2 et expliquerait la différence d'affinité, entre les arrestine non-visuelles, pour la sous-unité  $\mu$ . Une régulation semblable sur l'arrestine 3 pourrait avoir des impacts majeurs autant dans la découverte de nouveaux partenaires que dans la compréhension de fonctions de l'arrestine encore mal comprises. De plus, une nouvelle différence entre les deux arrestines non-visuelles pourrait également aider à comprendre davantage la spécificité de l'une par rapport à l'autre.

## BUTS DE L'ÉTUDE

Compte tenu de ces nouvelles pistes et de l'absence de données, nous avons décidé d'étudier de plus près la possibilité que l'arrestine 3 puisse être régulée par phosphorylation de ses tyrosines. Dès lors, le but premier de mes recherches consistait à confirmer que l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses résidus tyrosines et ce à l'aide de la kinase Src. Ensuite, il paraissait intéressant de déterminer les résidus tyrosine impliqués dans cette modification.

Puisque nous avons déjà montré l'interaction entre Shp2 et les arrestines, le deuxième but consistait en la démonstration que l'activité de cette phosphatase pouvait réguler la phosphorylation des arrestines 3. En parallèle, nous avons également été voir si l'arrestine 2 pourrait être pareillement régulée.

Finalement, des études ont été entreprises pour déterminer l'impact de la phosphorylation des résidus tyrosine de l'arrestine 3 dans un contexte cellulaire.

Dès lors, les travaux décrits dans les prochaines pages reflètent les différentes pistes suivies afin de découvrir les mystères liés à la phosphorylation des tyrosines des arrestines, plus précisément l'arrestine 3; quelles tyrosines spécifiquement sont régulées, quand est-ce que ces modifications ont lieu et surtout, à quoi pourraient-elles servir?

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **3.1 Matériel**

Les anticorps polyclonaux spécifiques à l'épitope c-myc ainsi qu'à Shp2, l'anticorps monoclonal spécifique à l'arrestine 3 et la protéine A-agarose proviennent de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. Les anticorps monoclonaux spécifiques à l'épitope c-myc et HA ont été obtenus de Covance (Medicorp, QC, Canada). Les anticorps secondaires anti-immunoglobulines de souris ou de lapin couplés à la peroxydase proviennent de GE Healthcare (UK) alors que les réactifs ECL permettant la détection de protéines sur membrane de nitrocellulose ont été achetés de PerkinElmer, MA, USA. Quant à l'immunofluorescence, les anticorps secondaires anti-immunoglobuline de souris ou de lapin Alexa Fluor®546 ont été achetés d'Invitrogen, Canada, Burlington, ON. L'angiotensine II fut un don du Pr Richard Leduc, Département de Pharmacologie, Université de Sherbrooke. Tous les autres composés provenaient de chez Sigma, Oakville, ON. En outre, la composition des solutions employées est décrite en annexe [Annexe].

### **3.2 Culture cellulaire et transfections**

Les cellules embryonnaires humaines de reins HEK293 ont été maintenues dans le milieu de culture DMEM (Invitrogen Canada) additionné de 10% de FBS (Invitrogen Canada, Burlington, ON) à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les transfections transitoires ont été effectuées en utilisant l'agent de transfection

TransIT®-LT1 (Mirus, Mediacorp Inc, WI, USA) selon les instructions du fabricant dans les cellules HEK293 ayant atteint environ 75% de confluence. Le vecteur pcDNA3 a été ajouté à chacune des transfections afin de compléter et de maintenir constante la quantité totale d'ADN transfectée dans chaque puits.

### 3.3 Construction des plasmides

#### 3.3.1 Aspects généraux

Plusieurs constructions étaient des dons ou avaient déjà été produites dans le laboratoire du Pr Parent. Les constructions pcDNA3-Arr3 (isoforme courte) et pcDNA3-Arr2 (isoforme longue) utilisées, sont d'origine bovine et sont un don du Dr Jeffrey L. Benovic, Département de Pharmacologie, Jefferson Cancer Institute, Thomas Jefferson University, Philadelphie, Pennsylvanie (STERNE-MARR *et al.*, 1993). Les constructions pcDNA3-Arr2-c-Myc, pcDNA3-Arr3-c-Myc et pcDNA3-GFP-Arr3 ont été réalisées dans notre laboratoire par Geneviève Laroche. Par ailleurs, les constructions de pcDNA3-Shp2 et pcDNA3-Shp2C<sup>459</sup>S (Shp2-DN) ont été réalisées dans notre laboratoire par Caroline Thériault et Patrick Giguère. Tandis que la construction pcDNA3.1/Zeo-Shp2D<sup>61</sup>Y-Flag (Shp2-CA) est un don du Dr Benjamin G. Neel, Ontario Cancer Institute, Toronto. Les constructions pcDNA3-c-Src-HA, pcDNA3-c-SrcK<sup>298</sup>R-HA (Src-DN) et pcDNA3-c-SrcY<sup>530</sup>F-HA (Src-CA) ont été fournies par le Dr Stéphane A. Laporte, Département de Médecine, Université McGill, Montréal.

Toutes les digestions d'ADN et de plasmides effectuées par des enzymes de restriction (New England Biolabs®, MA, USA ou Roche Diagnostics, Laval, QC) mentionnées dans les prochaines sections ont été effectuées à 37°C pendant deux heures. Les PCR ont été réalisés en utilisant la trousse « *Expand High Fidelity System* » (Roche Diagnostics) selon les instructions fournies par le manufacturier. Les fragments d'ADN digérés ou amplifiés par PCR ont été migrés sur gels de 1% ou 2% d'agarose, selon la grosseur des fragments, contenant 0.1 mg/mL de bromure d'éthidium. Les migrations ont été effectuées à 120 volts durant 30 min dans un tampon TAE 1X. Les extractions des fragments d'ADN de l'agarose ont été effectuées avec la trousse « *QIAquick gel extraction kit* » (QIAGEN, Mississauga, ON) en suivant le protocole fourni par la compagnie. Les ligations des fragments purifiés et/ou des produits d'amplification par PCR ont été réalisées dans un rapport 1 : 7 (vecteur : insert) à l'aide de la trousse « *Rapid DNA ligation kit* » (Roche, Laval, QC) selon les détails du manufacturier. Finalement, les nouveaux plasmides construits ont été transformés dans la souche bactérienne DH5α d'*Escherichia coli*.

### **3.3.2 Construction des vecteurs pcDNA3-Shp2-D<sup>61</sup>Y et pcDNA3-HA-Shp2**

Les séquences codantes de Shp2D<sup>61</sup>Y et Shp2 issues de pcDNA3.1/Zeo-Shp2D<sup>61</sup>Y-FLAG et pcDNA3/Shp2 ont été amplifiées grâce aux oligonucléotides F-Shp2-BamHI et R-Shp2-EcoRI décrits à la section 3.3.4. Les produits de PCR ainsi obtenus ont été digérés par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Eco*RI puis ligués respectivement dans les vecteurs vides pcDNA3 et pcDNA3-HA également digérés par

ces enzymes afin de permettre l'expression du mutant Shp2-D<sup>61</sup>Y sans étiquette et de la protéine Shp2 portant une étiquette HA dans des cellules de mammifères.

### 3.3.3 Construction du mutant Y<sup>391</sup>A-Y<sup>415</sup>A de l'arrestine 3 par PCR de chevauchement

Le mutant ponctuel de l'arrestine 3 Y<sup>391</sup>A-Y<sup>415</sup>A (YAYA) a été construit en deux étapes d'amplification par PCR respectivement à partir de pcDNA3-Arr3-cMyc en utilisant dans un premier temps les oligonucléotides F-Arr3-KpnI, R-Arr3Y391A-interne ainsi que F-Arr3Y391A-interne et R-Arr3-myc-XbaI (voir section 3.3.4) dans le but d'obtenir deux fragments, l'un contenant la partie N-terminale et la mutation Y<sup>391</sup>A et l'autre la partie C-terminale ainsi que les deux mutations, Y<sup>391</sup>A et Y<sup>415</sup>A. Ces deux fragments ont ensuite été hybridés et s'en est suivi une amplification par PCR à l'aide des oligonucléotides F-Arr3-KpnI et R-Arr3-myc-XbaI. Le produit de PCR a alors été digéré avec les enzymes de restriction *KpnI* et *XbaI* et ligué dans le vecteur pcDNA3 prédigéré avec les mêmes enzymes.

### 3.3.4 Tableau des oligonucléotides utilisés

| Nom                  | Séquence nucléotidique 5'-3'                                                 |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| F-Arr3-KpnI          | CGGGGTACCATGGGGGAGAAACCCGGGACC                                               |
| R-Arr3-myc-XbaI      | GCTCTAGAGCCTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTC<br>TGTTTCGCAGAACTGGTCGTCATAGTCC       |
| R-Arr3Y380A-interne  | CGATTCGTCGTCTGTGGCAGCGGGTTTCG                                                |
| F-Arr3Y380A-interne  | CGAAACCAACGCTGCCACAGACGACGACATCG                                             |
| R-Arr3Y404A-myc-XbaI | GCTCTAGAGCCTACAGATCCTCTTCAGAGATGAGTTTC<br>TGTTTCGCAGAACTGGTCGTCAGCGTCCTCGTCC |
| R-Shp2-EcoRI         | CTCGAATTCTCATCTGAAACTTTTCTGC                                                 |
| F-Shp2-BamHI         | GAGGGATCCATGACATCGCGGAG                                                      |

Les amorces F-Arr3-KpnI et R-Arr3-myc-XbaI ont été construits par Geneviève Laroche.

### 3.4 Immunoprécipitations

Les cellules HEK293 ont été mises en culture à une densité de  $3 \times 10^5$  cellules / puit dans une plaque à 6 puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées dans un rapport 1 : 2 (ADN : TransIT®-LT1 (Mirus, WI, USA)) avec les combinaisons d'ADN indiquées dans les légendes des figures. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont stimulées ou immédiatement rincées avec du PBS 1X froid et lysées dans le tampon de lyse additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (9 mM pepstatine, 9 nM antipain, 10 mM leupeptine et 10 mM chymostatine) et/ou d'inhibiteurs de phosphatases (1 mM fluorure de sodium (NaF), et 1 mM sodium

orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Après une incubation avec rotation de 60 min à 4°C dans le tampon de lyse, les lysats sont centrifugés pendant 20 min à 14 000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré et un échantillon du lysat est prélevé pour fins de contrôle de la présence et de la quantité de protéines. Ensuite, un anticorps polyclonal spécifique de même que 50  $\mu\text{L}$  d'une préparation de 25% de protéine-A ou -G immobilisée sur des billes d'agarose (Santa Cruz Biotechnology) sont ajoutés au surnageant. Le tout est incubé à 4°C avec rotation pour une période de temps allant de 2 h à une nuit.

Les échantillons sont par la suite centrifugés 1 min à 2 000 rpm et lavés trois fois avec du tampon de lyse toujours en présence d'inhibiteurs de protéases et/ou de d'inhibiteurs de phosphatases, après quoi les protéines sont éluées des billes en ajoutant 30  $\mu\text{L}$  de tampon d'échantillon (« *Sample Buffer 4X* »), puis bouillies durant 5 min ou bien incubés 1 heure à température ambiante.

### **3.5 SDS-PAGE et Immunobuvardage**

Les lysats et les protéines immunoprécipitées sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel 10% polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). Un volume de 20-40  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon a été déposé par puits. L'électrophorèse a été effectuée à 150 volts durant une à deux heures dans le tampon d'électrophorèse. Les protéines contenues dans le gel ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose Hybond (PerkinElmer). Le transfert se fait à 100 volts pour une période d'une heure. Après le transfert, les membranes de nitrocellulose sont déposées dans une solution de TBS contenant 5% de lait en poudre écrémé et 0,1% Tween 20© pour

la nuit à 4°C. Après l'étape du blocage des sites non-spécifiques, les membranes sont incubées une à deux heures à température pièce ou une nuit à 4°C avec agitation avec l'anticorps primaire à une dilution de 1:1 000 dans la solution de blocage. Ensuite, les membranes sont rincées dans de l'eau distillée et lavées trois fois pendant sept min dans le tampon TBS contenant 0,1% Tween 20©, avec agitation. Par la suite, les membranes sont incubées à la température ambiante, avec agitation, pendant une heure en présence de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort dilué 1:5 000 pour l'anti-immunoglobulines de souris et 1:10 000 pour l'anti-immunoglobulines de lapin dans le tampon de blocage. Les membranes sont alors lavées trois fois dans le tampon TBS 0,1% Tween 20©. La détection des interactions spécifiques est réalisée par chimiluminescence en utilisant la trousse ECL et les films Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, UK).

### **3.6 Immunofluorescence**

Les cellules HEK293 sont mises en culture dans des plaques à six puits à une densité de  $3 \times 10^5$  cellules / puit. Le jour suivant, les cellules sont transfectées avec 4 µg total d'ADN de pcDNA3 seul (contrôle) ou sont co-transfectées avec GFP-Arr3 et HA-Shp2. Le lendemain de la transfection,  $2 \times 10^5$  cellules sont transférées sur une lamelle pré-traitée à la poly-(L-lysine) (0,1 mg/mL) et déposée dans le puit d'une plaque à six puits. Après 24 h, les lamelles sont lavées deux fois avec du PBS à 37°C puis incubées avec l'agoniste voulu dilué dans du DMEM contenant 20 mM d'HEPES pendant la période spécifiée dans les légendes des figures. Les lamelles sont ensuite lavées trois fois à l'aide de PBS à température de la pièce. Toutes les étapes

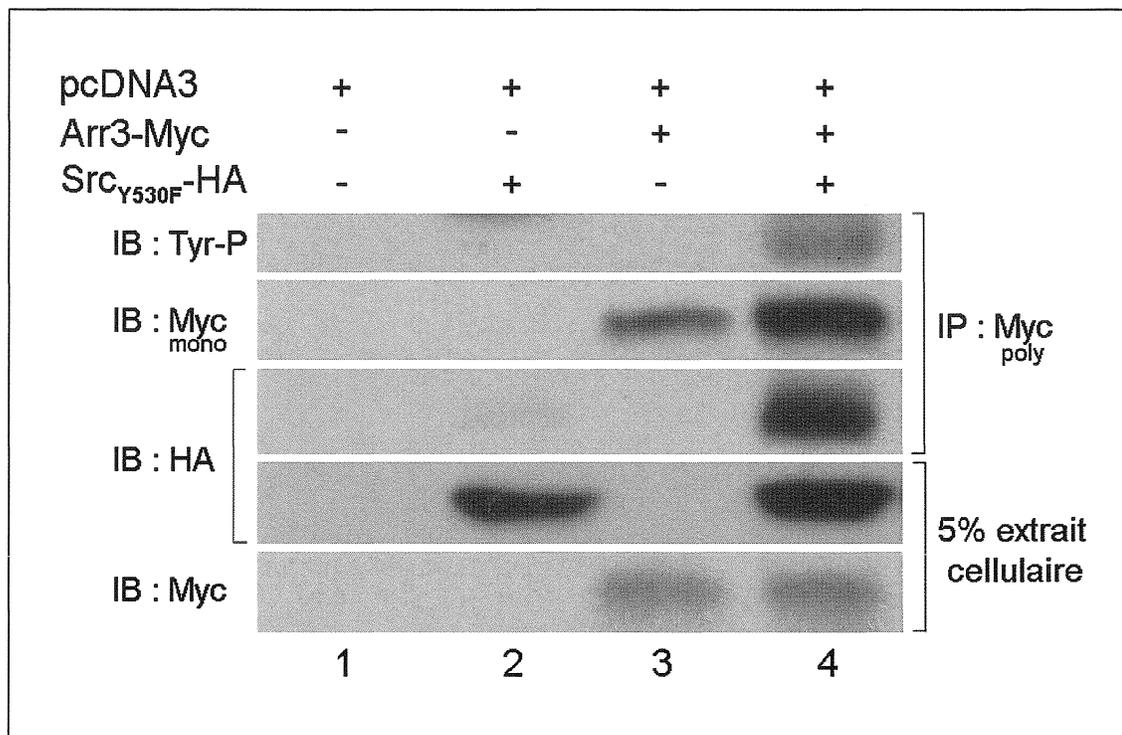
subséquentes sont effectuées à l'abri de la lumière. Les cellules sont fixées 10 min avec une solution de paraformaldéhyde 3% pendant 10 min, puis lavées trois fois avec du PBS pour être perméabilisées pendant 20 min à l'aide d'une solution de 0,1% Triton X-100. S'en suit un blocage de 30 min dans une solution PBS / 0,1% Triton X-100 / 5% lait suivi d'une incubation de 60 min à température ambiante avec l'anticorps primaire monoclonal (1 :1 000) dirigé contre l'étiquette HA. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois au PBS, les sites non-spécifiques bloqués 10 min et incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent Alexa 546 à une dilution de 1 :200. Les lamelles sont alors lavées au PBS et montées sur des lames grâce au *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories Inc., CA, USA). Finalement, les lames sont analysées en utilisant un microscope confocal FV 1000 (Olympus, Tokyo, Japon) couplé à un microscope inversé avec un objectif à immersion 63x (Olympus) et les images obtenues avec Image-Pro Plus 6.0.

## RÉSULTATS

### 4.1 La phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3

#### 4.1.1 La phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3 régulée par Src

Afin de déterminer si l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses résidus tyrosine, nous avons utilisé l'immunoprécipitation comme méthode pour concentrer la quantité de protéines d'arrestine. Ces essais ont été réalisés dans les cellules HEK293 transfectées avec pcDNA3-Arr3-Myc et pcDNA3-HA-SrcY<sup>530</sup>F, un mutant constitutivement actif de Src (Src CA). L'utilisation de cette forme active de Src empêche la modulation intracellulaire de la kinase, notamment par auto-inhibition. Les lysats cellulaires ont été traités avec l'anticorps polyclonal anti-c-myc et la protéine A-agarose dans le but d'immunoprécipiter l'arrestine 3. Les immunobuvardages accomplis à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine (anti P-Tyr), anti-c-myc ainsi que anti-HA ont permis d'effectuer l'analyse des résultats. La figure 18 montre d'abord que Src co-immunoprécipite avec l'arrestine 3 comme il est connu dans la littérature (LUTTRELL *et al.*, 1999; MILLER *et al.*, 2000). En effet, l'immunobuvardage anti-HA de la réaction d'immunoprécipitation révèle une bande dans le dernier puits (IP :Myc, IB :HA). Ensuite, l'essai montre que l'arrestine 3 est phosphorylée sur ses résidus tyrosines lorsque la kinase Src constitutivement active est surexprimée (puits 4, panneau du haut). L'utilisation d'un anticorps anti-P-Tyr, permet la visualisation du patron de phosphorylation de la réaction d'immunoprécipitation. On peut alors, en regardant à la hauteur de migration de l'arrestine (48 kDa) voir si celle-ci



**Figure 18. L'arrestine 3 est phosphorylée par Src.**

Les expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées dans les cellules HEK293 co-transfectées de manière transitoire avec pcDNA3-Arr3-Myc et pcDNA3-HA-c-SrcY<sup>530</sup>F. L'immunoprécipitation de l'arrestine 3 a été effectuée avec un anticorps polyclonal anti-Myc et les immunobuvardages à l'aide des anticorps monoclonaux anti-P-Tyr, anti-Myc, anti-HA tels qu'indiqués dans la section « MATÉRIEL ET MÉTHODES ».

Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

IP : immunoprécipitation, IB : immunobuvardage

est reconnue comme protéine ayant des tyrosines phosphorylables. Dès lors, on peut observer sur la figure 18 une bande au poids moléculaire de l'arrestine 3 lorsque que SrcY<sup>530</sup>F est exprimé.

Ayant démontré que l'arrestine 3 pouvait être phosphorylée, nous nous sommes demandés sur quels résidus tyrosine cette modification avait lieu. Afin de répondre à cette question nous avons d'abord été explorer le potentiel de phosphorylation des résidus de l'arrestine 3.

#### **4.1.2 Le potentiel de phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3**

Les arrestines 2 et 3 bovines possèdent respectivement 12 et 13 tyrosines dans leur séquence peptidique [Figure 19]. Parmi celles-ci, neuf se retrouvent au même endroit dans les deux séquences. Dans l'arrestine 2, il y a quatre tyrosines uniques situées dans la portion N-terminale : Y<sup>54</sup>, Y<sup>114</sup>, Y<sup>144</sup> et Y<sup>174</sup>. Alors que l'arrestine 3 en compte trois dont une en N-terminal en position 84 et deux faisant partie de la queue C-terminale, soient Y<sup>380</sup> et Y<sup>404</sup>. Dans la littérature il est fait mention que de la phosphorylation de la tyrosine 54 de l'arrestine 2 et cette tyrosine est unique à cette arrestine (MARION *et al.*, 2007). Les résidus tyrosine uniques à l'arrestine 3 semblaient donc de bonnes cibles de phosphorylation. De plus, leur emplacement sur la structure de l'arrestine 3 leur convierait une bonne accessibilité. En effet, la conformation active de l'arrestine fait en sorte de libérer la queue terminale, tel que mentionné précédemment [Figure 6]. Nous avons donc soumis la séquence de l'arrestine 3 au serveur NetPhos 2.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/), BLOM *et al.*, 1999), un système de prédiction de sites de phosphorylation pour les protéines



eucaryotes. Cela nous permettait de connaître la probabilité des résidus d'être phosphorylés. Le tableau 2 résume les résultats obtenus, soit que sur les douze tyrosines de l'arrestine 3, sept ont davantage de chance d'être phosphorylées. De façon plus significative, les deux dernières tyrosines qui se situent sur la queue C-terminale ont encore plus de chance de l'être. Afin d'apporter encore plus de poids à cette prédiction nous avons soumis la séquence de l'arrestine 3 à deux autres programmes, soient GPS 2.0 (<http://bioinformatics.lcd-ustc.org/gps2/>, XUE *et al.*, 2008) et PredPhospho 2 ([http://phosphovariant.ngri.go.kr/seq\\_input\\_predphospho2.htm](http://phosphovariant.ngri.go.kr/seq_input_predphospho2.htm), CHANG *et* LIN, 2001). Ces derniers ont été utilisés afin de connaître la probabilité qu'une tyrosine de l'arrestine 3 soit phosphorylée par une tyrosine kinase spécifique. Nous avons donc interrogé les deux programmes au sujet de la possibilité de l'arrestine 3 d'être phosphorylée par une kinase de la famille de Src. Ces deux matrices prédisent la phosphorylation par une kinase de la famille de Src respectivement du dernier et de l'avant-dernier résidu tyrosine de la séquence de l'arrestine 3.

Face à ces évidences, nous avons décidé de construire un double mutant ponctuel, l'arrestine 3 Y<sup>380</sup>A-Y<sup>404</sup>A (arrestine 3 YAYA) [Figure 20 A], afin de voir si Src peut toujours induire la phosphorylation que l'on voit avec l'arrestine 3 de type sauvage.

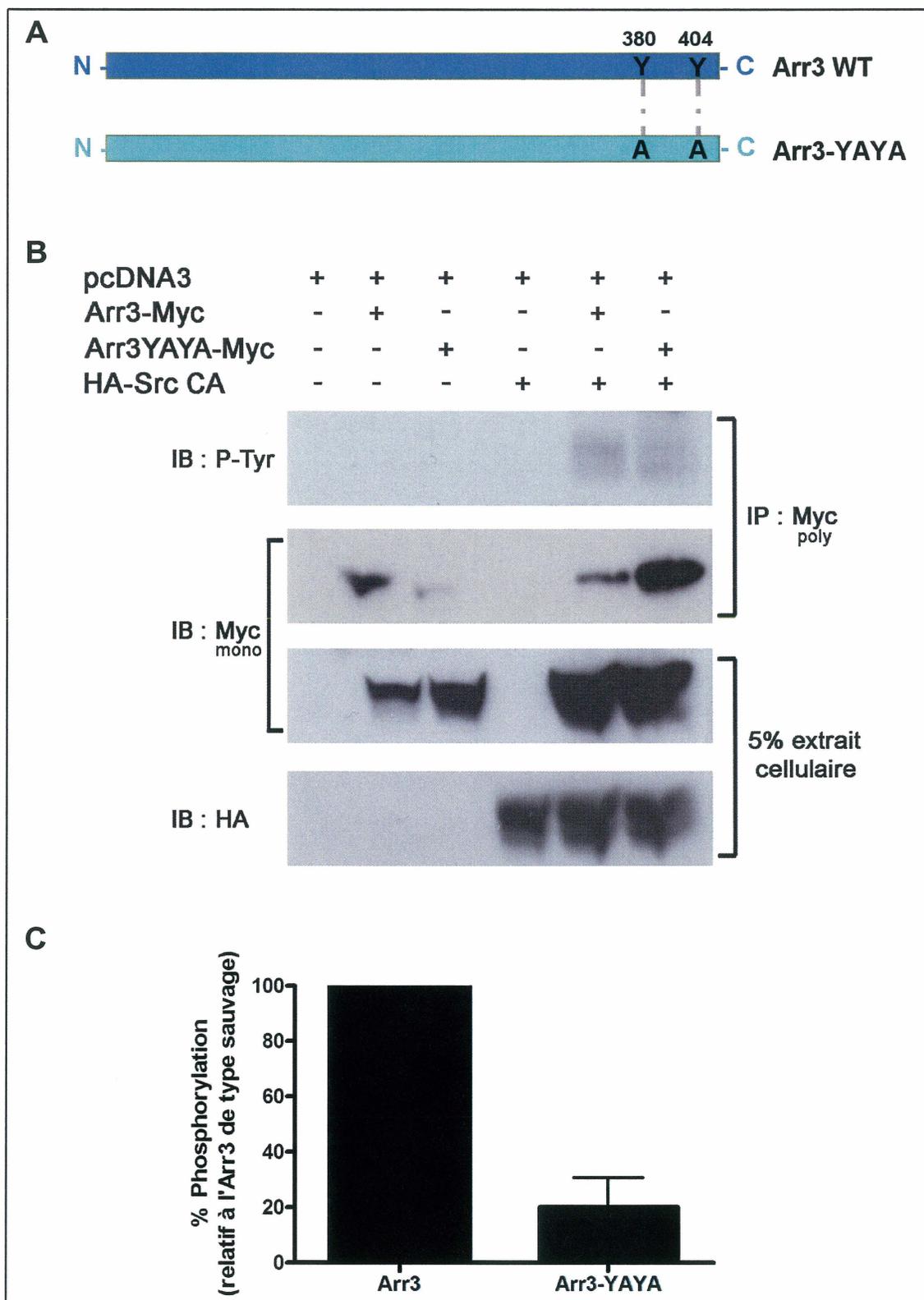
#### **4.1.3 Les tyrosines 380 et 404 de l'arrestine 3 sont d'importants sites de phosphorylation**

Dans le but de savoir si le mutant arrestine 3 Y<sup>380</sup>A-Y<sup>404</sup>A est toujours phosphorylable par Src, des essais d'immunoprécipitation de l'arrestine 3 semblables à ceux montrés précédemment ont été réalisés. Des lysats de cellules HEK293

| Position | Contexte  | Score | Prédiction |
|----------|-----------|-------|------------|
| 22       | KLTVYLGKR | 0.028 | .          |
| 48       | VDPDYLKDR | 0.786 | *Y*        |
| 64       | CAFRYGRED | 0.208 | .          |
| 85       | FIANYQAFP | 0.034 | .          |
| 209      | DKELYHGE  | 0.665 | *Y*        |
| 210      | KELYHGEF  | 0.651 | *Y*        |
| 239      | SVRQYADIC | 0.789 | *Y*        |
| 250      | STAQYKCPV | 0.495 | .          |
| 273      | FCKVYTITP | 0.502 | *Y*        |
| 322      | ILVSYRVKV | 0.007 | .          |
| 380      | FETNYATDD | 0.942 | *Y*        |
| 404      | KDEDYDDQF | 0.970 | *Y*        |

**Tableau 2. Prédiction de phosphorylation des résidus tyrosine de l'arrestine 3.**

Tableau des résultats de la prédiction des tyrosines phosphorylées de l'arrestine 3 bovine (P32120) obtenus à l'aide du serveur NetPhos 2.0 (BLOM *et al.*, 1999). L'arrestine 3 contient douze tyrosines dont sept ayant une probabilité plus grande d'être phosphorylés. De manière plus significative les deux tyrosines en C-terminal ont plus de chance d'être ainsi modifiées.



**Figure 20.** Les tyrosines 380 et 404 de l'arrestine 3 sont d'importants sites de phosphorylation.

transfectées avec pcDNA3-Arr3-Myc ou pcDNA3-Arr3-YAYA-Myc et pcDNA3-HA-c-SrcY<sup>530</sup>F (Src CA) ont été traités avec l'anticorps polyclonal anti-c-myc et la protéine A-agarose dans le but d'immunoprécipiter l'une ou l'autre des constructions d'arrestine 3. Les immunobuvardages ont été accomplis à l'aide des anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine (anti P-Tyr), anti-c-myc ainsi qu'anti-HA. La figure 20 B montre que le mutant YAYA de l'arrestine 3 n'est presque plus phosphorylable par Src CA. Les deux constructions d'arrestine 3 présentent de la phosphorylation en présence de Src CA, mais les quantités de protéines immunoprécipitées sont inégales. Comme le révèle l'immunobuvardage avec un anti-Myc des réactions d'immunoprécipitation, il y a beaucoup plus d'arrestine 3 YAYA qui a été immunoprécipitée que d'arrestine 3 de type sauvage. Ainsi le résultat est plus facilement analysé en regardant le diagramme de densitométrie de la phosphorylation de l'arrestine 3 par rapport à la quantité totale immunoprécipitée [Figure 20 C]. Il ne reste que 20% de phosphorylation lorsque l'arrestine 3 YAYA est utilisée.

Ainsi, ayant démontré que les tyrosines de l'arrestine 3 peuvent être phosphorylées, plus précisément et majoritairement sur celles en positions 380 et 404, il devenait intéressant d'en connaître davantage sur la modulation de cette phosphorylation. Or, comme mentionné auparavant, il a déjà été démontré dans le laboratoire que Shp2 est un partenaire d'interaction de l'arrestine 3. Shp2 est une phosphatase et donc il semblait possible que la phosphorylation de l'arrestine 3 soit régulable par celle-ci.

## 4.2 La phosphorylation des arrestines est régulée par Shp2

### 4.2.1 L'arrestine 3 peut être régulée par Shp2

Afin de déterminer si l'arrestine 3 est déphosphorylable suite à l'activation de Shp2, des essais d'immunoprécipitation ont été réalisés dans les cellules HEK293 transfectées avec pcDNA3-Arr3-Myc, pcDNA3-HA-c-SrcY<sup>530</sup>F (Src CA) ainsi que l'une des constructions de Shp2 suivantes : pcDNA3-Shp2, pcDNA3-Shp2-D<sup>61</sup>Y (Shp2-CA, une forme constitutivement active) ou pcDNA3-Shp2-C<sup>459</sup>S (Shp2-DN, catalytiquement inactive). L'utilisation de cette forme active de Src empêche la modulation de la kinase qui pourrait être occasionnée indirectement par Shp2. Les lysats cellulaires ont été traités avec l'anticorps polyclonal anti-c-myc et la protéine A-agarose dans le but d'immunoprécipiter l'arrestine 3. Les immunobuvardages ont été accomplis à l'aide des anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine (P-Tyr), anti-c-myc, anti-HA ainsi que l'anticorps polyclonal anti-Shp2. La figure 21 A démontre qu'en ajoutant Shp2-CA la bande de phosphorylation à la hauteur de l'arrestine 3 disparaît. Ainsi, il semble que l'arrestine 3 soit déphosphorylée par l'activation de Shp2. Cette déphosphorylation n'est pas visible lorsqu'on utilise la forme catalytiquement inactive ou dominante négative de Shp2, Shp2C<sup>459</sup>S. Pour ce qu'il en est de la forme sauvage de Shp2, celle-ci n'aurait qu'un faible effet de déphosphorylation. Il est plus facile d'apprécier l'effet de Shp2 avec l'analyse de densitométrie de la phosphorylation de l'arrestine 3 par rapport à la quantité totale immunoprécipitée [Figure 21 B]. Il ne demeure qu'environ 10% de phosphorylation sur l'arrestine lorsqu'on co-transfecte Shp2 CA alors qu'en utilisant la forme DN de Shp2 on obtient un taux de phosphorylation supérieur à celui de base, c'est-à-dire de

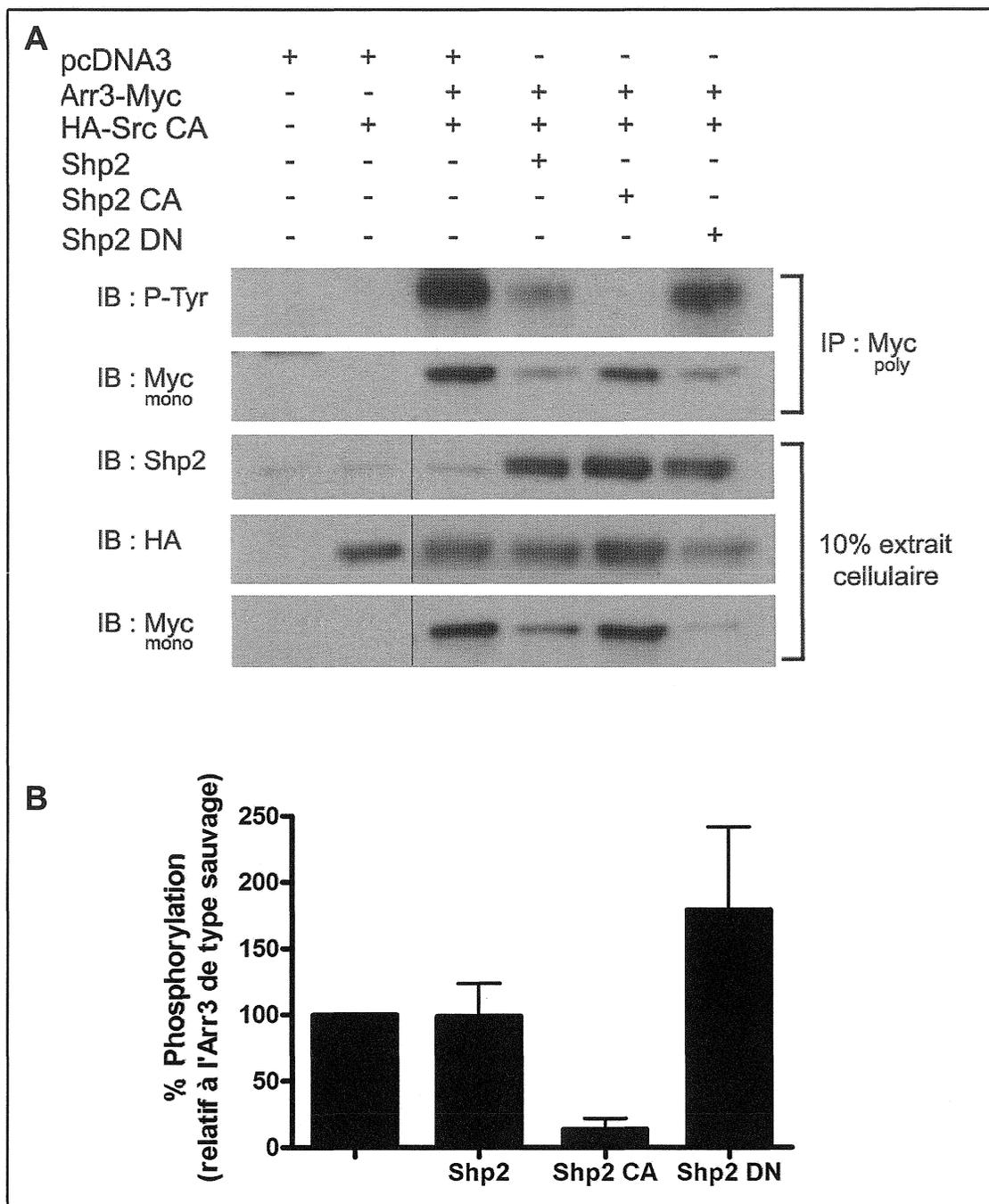


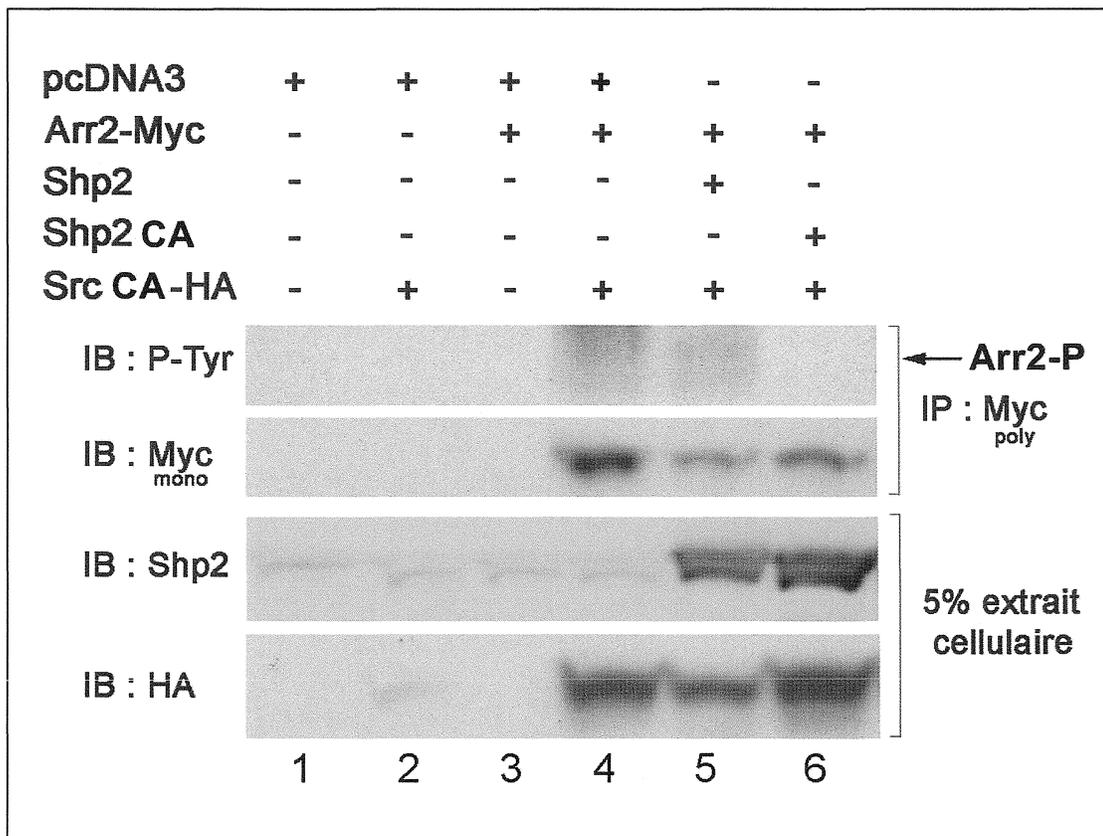
Figure 21. La surexpression de Shp2 induit la déphosphorylation de l'arrestine 3.

l'arrestine sans ajout de Shp2. Ainsi, il est intéressant de voir que Shp2 DN tende à augmenter la phosphorylation de l'arrestine 3 tandis que Shp2 CA la diminue drastiquement.

En plus d'avoir démontré que les tyrosines du C-terminal de l'arrestine 3 sont d'importants sites de phosphorylation, nous avons confirmé que Shp2 peut venir réguler la phosphorylation de ces tyrosines. Suite à cette nouvelle découverte nous étions curieux de voir si cette modulation pouvait être un mécanisme commun aux arrestines non-visuelles. En effet, l'arrestine 2 peut être phosphorylée par Src sur sa tyrosine 54 spécifique, mais aucune phosphatase n'est connue pour modifier cet état (MARION *et al.*, 2007).

#### **4.2.2 L'arrestine 2 peut aussi être régulée par Shp2**

Des essais d'immunoprécipitation ont été réalisés afin de déterminer si l'arrestine 2 est déphosphorylable en présence de la Shp2 constitutivement active. Pour ce faire des cellules HEK293 ont été transfectées avec les constructions pcDNA3-Arr2-Myc, pcDNA3-HA-c-SrcY<sup>530</sup>F (Src CA) ainsi qu'une construction de Shp2, pcDNA3-Shp2 ou pcDNA3-Shp2-D<sup>61</sup>Y (Shp2 CA). Les lysats cellulaires ont été traités avec l'anticorps polyclonal anti-c-myc et la protéine A-agarose pour procéder à l'immunoprécipitation de l'arrestine 2. Les immunobuvardages accomplis à l'aide des anticorps monoclonaux anti-phosphotyrosine (P-Tyr), anti-c-myc, anti-HA ainsi que l'anticorps polyclonal anti-Shp2. D'abord, la figure 22 montre que l'arrestine 2 est bel et bien phosphorylée en présence de Src CA, comme c'est connu dans la littérature (LUTTRELL *et al.*, 1999). En effet, on voit un doublet apparaître sur



**Figure 22. La surexpression de Shp2 induit la déphosphorylation de l'arrestine 2.**

Les expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées dans les cellules HEK293 co-transfectées de manière transitoire avec pcDNA3-Arr3-Myc, pcDNA3-HA-c-SrcY<sup>530F</sup> (Src CA) ainsi que pcDNA3-Shp2 ou pcDNA3-Shp2D<sup>61Y</sup> (Shp2 CA). L'immunoprécipitation de l'arrestine 2 a été réalisée à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-Myc et les immunobuvardages à l'aide des anticorps monoclonaux anti-P-Tyr, anti-Myc, anti-HA ainsi que du polyclonal anti-Shp2 tels qu'indiqués dans la section « MATÉRIEL ET MÉTHODES ».

La figure est représentative de deux essais indépendants.

IB : immunobuvardage, IP : immunoprécipitation

l'immunobuvardage dirigé contre les tyrosines phosphorylées de la réaction d'immunoprécipitation de l'avant-dernier puit. De plus, en ajoutant Shp2 CA la bande à la hauteur de l'arrestine 2 disparaît. Ainsi, il semble que l'arrestine 2 soit déphosphorylée par l'activation de Shp2. Quand à l'activité de la forme sauvage de Shp2, il semblerait qu'elle n'ait pas vraiment d'effet sur l'état de phosphorylation de l'arrestine.

Dès lors la modification de l'état de phosphorylation par l'activité de Shp2 semble être un mécanisme commun aux arrestines non-visuelles.

Après avoir démontré que l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses résidus tyrosines et que cette modification peut être régulée par les activités kinase et phosphatase respectives de Src et Shp2, nous étions intrigués par la pertinence physiologique et fonctionnelle de ces événements. En effet, puisque les tyrosines principalement phosphorylées sont uniques à l'arrestine 3 et qu'il n'existe aucune piste d'effet potentiel dans la littérature, nous en avons explorées quelques-unes. Premièrement, nous nous sommes demandés en quelles circonstances l'arrestine 3 pourrait se retrouver phosphorylée. Jusqu'alors nous avons démontré qu'une surexpression de Src constitutivement active pouvait induire cette phosphorylation sur les résidus 380 et 404. Il paraissait intéressant d'aller voir dans des conditions physiologiques. Une expérience précédemment effectuée dans le laboratoire (TURCOTTE, 2008) montrait la modulation du complexe arrestine 3-Shp2 lors de la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>R, exprimé de façon stable dans des cellules HEK293. Il semble qu'à l'état de repos, Shp2 coimmunoprécipite avec l'arrestine 3, cependant la

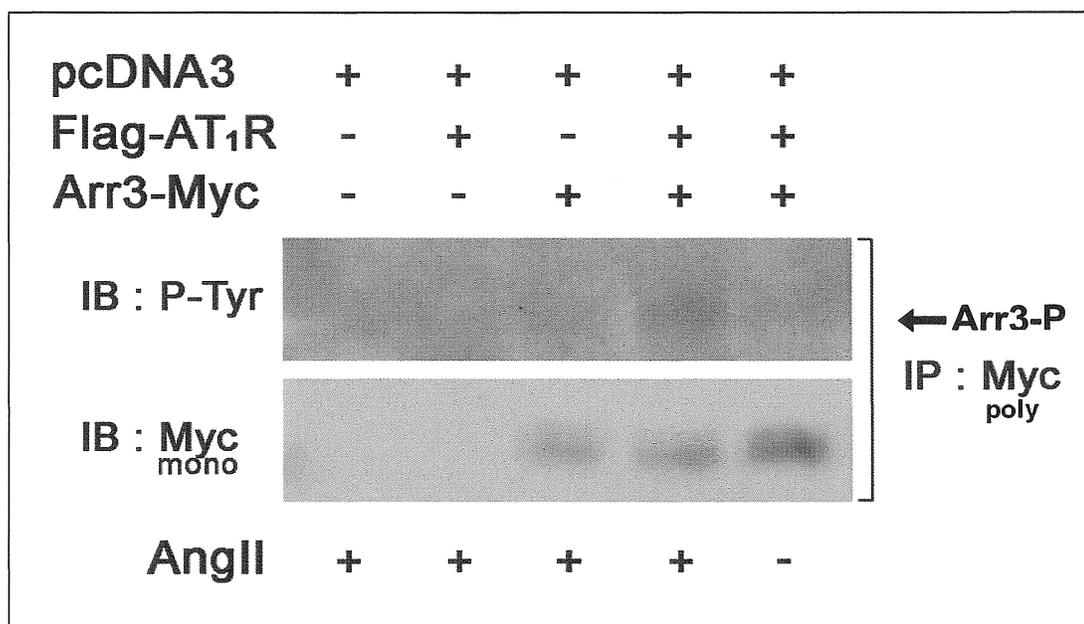
stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> avec de l'angiotensine mène à la dissociation de ce complexe. Effectivement, il a été trouvé qu'une quantité décroissante de Shp2 co-immunoprécipite avec l'arrestine 3 en fonction du temps de stimulation (0, 2, 5 et 15 min). Ces derniers résultats laissent présager qu'à 15 min de stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>, il y a moins de Shp2 qui interagit avec l'arrestine 3. Nous avons donc étudié l'état de phosphorylation de l'arrestine 3 suite à l'activation du récepteur AT<sub>1</sub>.

### **4.3 La phosphorylation de l'arrestine 3 : en route vers une fonction...**

#### **4.3.1 La phosphorylation de l'arrestine 3 suite à l'activation d'un RCPG**

Afin de déterminer si l'arrestine 3 est phosphorylée suite à l'activation du récepteur AT<sub>1</sub>, des essais d'immunoprécipitation ont été réalisés dans les cellules HEK293 transfectées avec pcDNA3-Arr3-Myc et pcDNA3-Flag-AT<sub>1</sub>R. Ensuite, les cellules ont été stimulées avec 1 μM d'angiotensine II pendant quinze minutes. Les lysats cellulaires ont été traités avec l'anticorps polyclonal anti-c-myc et la protéine A-agarose dans le but d'immunoprécipiter l'arrestine 3. Les immunobuvardages ont été faits à l'aide des anticorps monoclonaux anti-P-Tyr et anti-c-myc. La figure 23 suggère de façon préliminaire que l'arrestine 3 pourrait être phosphorylée suite à l'activation d'un RCPG.

En parallèle à cet essai, nous avons effectués des essais de microscopie afin d'explorer la localisation du complexe arrestine 3-Shp2 avec ou sans stimulation d'un RCPG afin de mieux comprendre la relation entre ces deux protéines.



**Figure 23. Phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3 induite par la stimulation d'AT<sub>1</sub>R**

Les réactions d'immunoprécipitation ont été réalisées dans les cellules HEK293 co-transfectées de manière transitoire avec pcDNA3-Arr3-Myc et pcDNA3-Flag-AT<sub>1</sub>R. Après quoi elles ont été stimulées ou non avec 1 μM d'angiotensine II (AngII) pendant quinze minutes. L'immunoprécipitation de l'arrestine 3 a été faite à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-Myc et les immunobuvardages à l'aide des anticorps monoclonaux anti-P-Tyr ainsi que anti-Myc tels qu'indiqués dans la section « MATÉRIEL ET MÉTHODES ».

La figure représente un résultat préliminaire.

IB : immunobuvardage, IP : immunoprécipitation

### 4.3.2 Modulation de la colocalisation de l'arrestine 3 et Shp2

Des essais de microscopie confocale ont été entrepris afin de déterminer si l'arrestine 3 et Shp2 colocalisent dans la cellule. Il est connu qu'en l'absence de stimulation l'arrestine est cytoplasmique (WANG *et al.*, 2003). Cependant, lorsqu'on stimule un RCPG, elle est recrutée à la membrane et peut également suivre celui-ci au niveau des endosomes, comme c'est le cas notamment pour le récepteur AT<sub>1</sub>. Shp2, a également une localisation cytoplasmique et quelques études montrent qu'elle pourrait être recrutée aux RCPGs (CHERNOCK *et al.*, 2001; DUCHENE *et al.*, 2002). Nous avons donc effectué des essais dans les cellules HEK293 transfectées avec pcDNA3-Flag-AT<sub>1</sub>R ou pcDNA3-Flag-β<sub>2</sub>AR ainsi qu'avec pEGFP- Arr3 et pcDNA3-HA-Shp2. Les cellules ont ensuite été stimulées durant 2 et 15 min avec 1 μM d'angiotensine II pour activer AT<sub>1</sub>R ou 5 μM d'isoprotérénol pour stimuler le β<sub>2</sub>AR. D'abord, la figure 24 [A, sur le panneau du haut] montre que l'arrestine 3 et Shp2 colocalisent dans les cellules en absence d'agoniste. Ensuite, à deux minutes de stimulation d'AT<sub>1</sub>R, on peut voir que Shp2 au même titre que l'arrestine 3 est recruté à la membrane cytoplasmique [A, sur le 2<sup>e</sup> panneau]. Cette colocalisation est plus facilement visible lorsqu'on effectue un grossissement des images de superposition [B]. Après quinze minutes de stimulation à l'angiotensine II, on remarque que l'arrestine 3 est concentrée au niveau des endosomes alors que ce n'est pas le cas pour Shp2. S'en suit donc une diminution de leur colocalisation [Figure 24, 3<sup>e</sup> panneau en A]. Lorsqu'on surexprime le β<sub>2</sub>AR, en l'absence d'agoniste on constate que l'arrestine 3 et Shp2 colocalisent ensemble au niveau cytoplasmique [Figure 25, 1<sup>er</sup> panneau]. À deux minutes de stimulation avec de

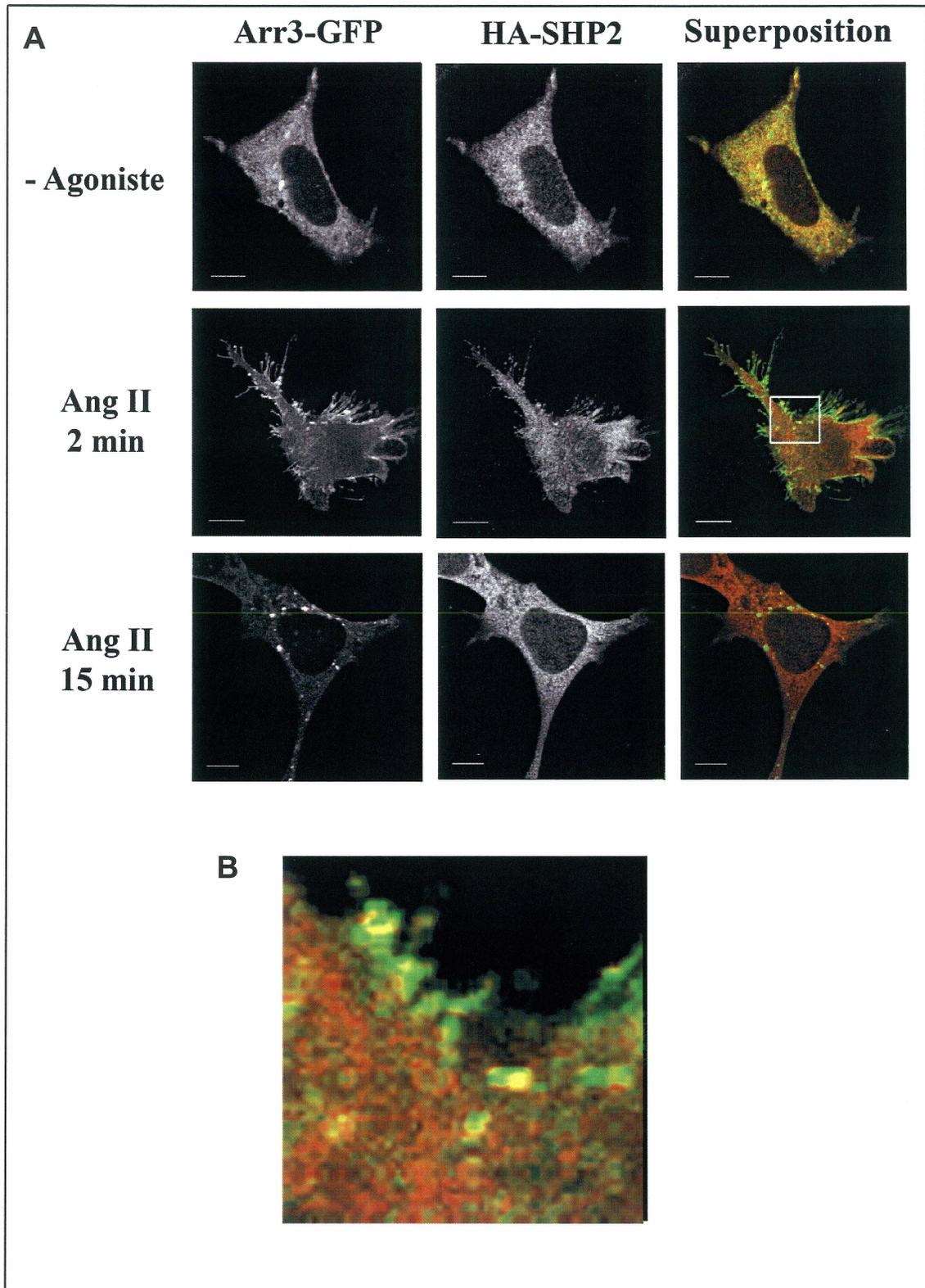


Figure 24. L'arrestine 3 et Shp2 sont recrutées au récepteurs  $AT_1$  activés.

**Figure 25. L'arrestine 3 et Shp2 sont recrutées au récepteurs AT<sub>1</sub> activés.**

Les cellules HEK293 ont été transfectées de façon transitoire avec pcDNA3-Flag- $\beta_2$ AR, pcDNA3-HA-Shp2 et pcDNA3-GFP-Arr3. Les cellules ont par la suite été stimulées avec 5  $\mu$ M d'isoprotérénol (ISO) deux ou quinze minutes à 37°C avant d'être traitées pour l'observation au microscope tel que spécifié sous l'onglet « MATÉRIEL ET MÉTHODES ». Un essai contrôle non stimulé a également été exécuté à des fins de comparaison. Dans cette figure, l'arrestine 3 est représentée en vert, Shp2 en rouge et la colocalisation par la couleur jaune. Les barres de grossissement correspondent à 10  $\mu$ m. (B) Grossissement de l'encadré blanc sur l'image de superposition à deux minutes de stimulation de  $\beta_2$ A.

Ces photos ont été prises par Audrey Parent, étudiante au doctorat dans notre laboratoire.

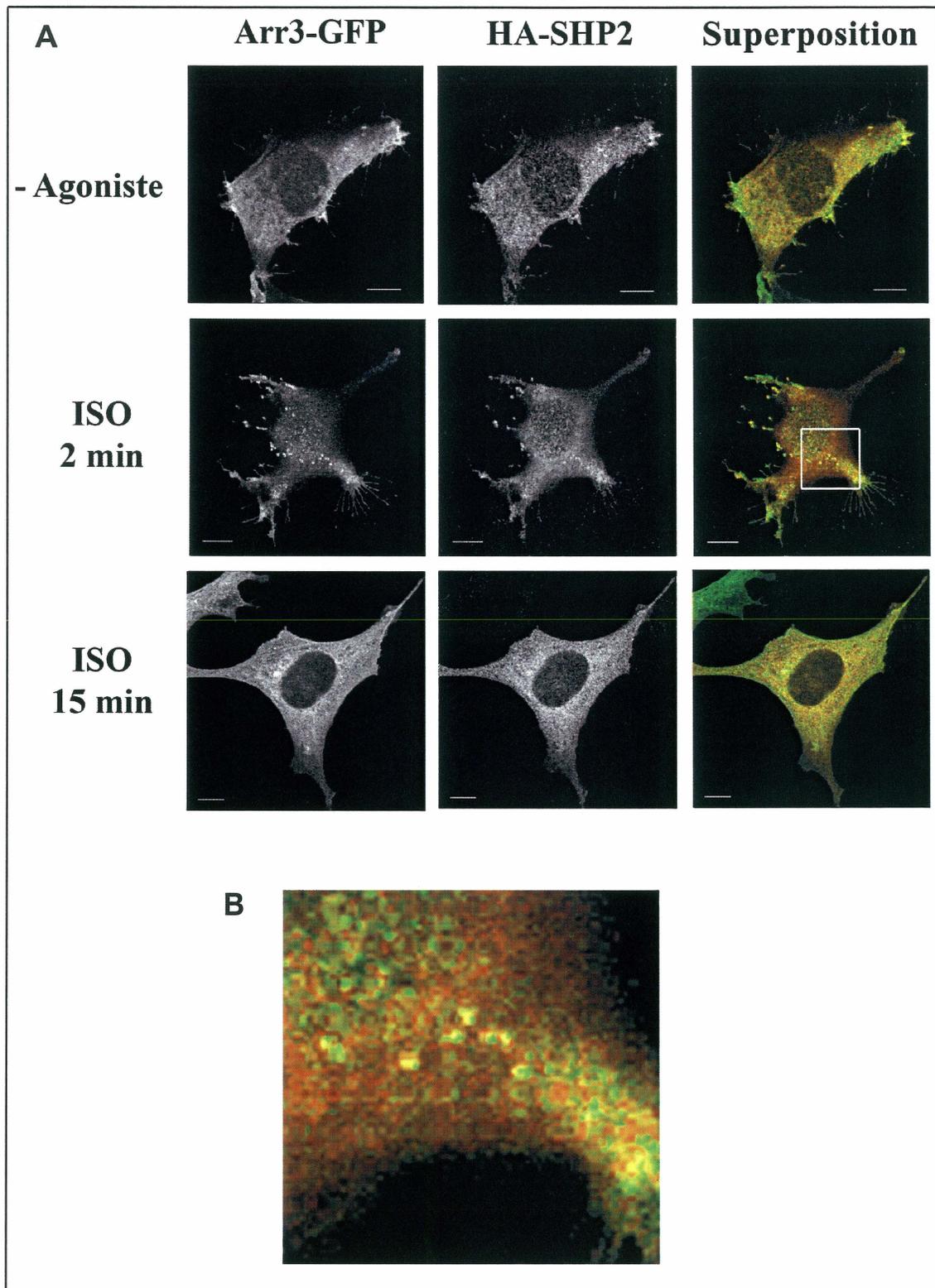


Figure 25. L'arrestine 3 et Shp2 sont recrutées aux récepteurs  $\beta_2A$  activés.

l'isoprotérénol, on peut voir l'arrestine 3 et Shp2 être recrutés à la membrane plasmique [A 2<sup>e</sup> panneau], comme c'est le cas avec AT<sub>1</sub>R au même temps. Il est d'ailleurs possible de mieux apprécier la colocalisation avec un grossissement [Figure 25, B]. Tandis qu'après quinze minutes de stimulation du  $\beta_2$ AR, on voit encore une partie de l'arrestine 3 qui est toujours à la membrane alors que Shp2 est plus cytoplasmique comme au temps 0 [Figure 25, 3<sup>e</sup> panneau en A]. La colocalisation entre l'arrestine 3 et Shp2 ressemble donc davantage, dans ce cas, à celle à l'état de repos. En regardant le portrait général des figures 24 et 25, on constate que la surexpression de Shp2 ne semble pas affecter les propriétés d'internalisation des récepteurs couplés à l'arrestine 3. En effet, le récepteur  $\beta_2$ A ayant une internalisation de classe A ne se retrouve pas en complexe avec l'arrestine 3 au niveau des endosomes comme c'est le cas pour AT<sub>1</sub>R qui a une internalisation de classe B.

## DISCUSSION

### 5.1 Préambule

La phosphorylation de tyrosines est un mécanisme réversible important dans la régulation de maintes fonctions cellulaires, notamment la croissance et la différenciation cellulaires. Or, il est connu que l'arrestine 3 interagit avec de nombreuses kinases, dont Src, et qu'elle se retrouve également en complexe avec certaines phosphatases comme Shp2, un nouveau partenaire direct découvert par notre laboratoire. Sachant que l'arrestine est une protéine régulatrice multifonctionnelle impliquée dans de nombreux signaux intracellulaires, il paraissait intéressant de savoir si les douze tyrosines de cette protéine adaptatrice peuvent être régulées par phosphorylation. Le but premier de mon projet de recherche visait donc la vérification de cette hypothèse.

### 5.2 L'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses tyrosines

Tout d'abord, mes travaux montrent que l'arrestine 3 peut se retrouver phosphorylée sur certains de ses résidus tyrosines dans un contexte cellulaire. Sachant que Src est un partenaire direct des arrestines (LEFKOWITZ *et* SHENOY, 2005), nous nous sommes servi de la forme constitutivement active de cette tyrosine kinase pour démontrer à l'aide d'essais d'immunoprécipitation, que l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses résidus tyrosines. Puisque nous avons utilisé un modèle de surexpression en cellules,

nous ne pouvons pas affirmer que Src a une activité kinase directe sur l'arrestine 3. Cependant, certaines démonstrations dans la littérature nous laissent croire que l'arrestine 3 pourrait effectivement être un substrat de Src.

Effectivement, il est connu que les déterminants moléculaires de l'interaction entre l'arrestine et Src sont le domaine N-terminal de l'arrestine, plus précisément certaines prolines, ainsi que le domaine SH3 de Src (LEFKOWITZ *et* SHENOY, 2005). Or, en liant une région opposée au domaine kinase de Src, l'arrestine se retrouve bien exposée et pourrait très bien se faire phosphoryler par ce domaine kinase.

Il a été démontré que l'arrestine 2 pouvait être phosphorylée précisément par cette kinase (MARION *et al.*, 2007). Cette publication fait également la preuve que le résidu tyrosine 54 est un important site de phosphorylation de l'arrestine 2. Or, ce résidu est absent de l'arrestine 3, il y a plutôt une phénylalanine à cette position, et c'est précisément ce qui le rend important. Effectivement, les auteurs démontrent que la phosphorylation de la Y<sup>54</sup> de l'arrestine 2 empêche celle-ci d'interagir avec la sous-unité  $\mu$  de la protéine AP2 au même titre que la phénylalanine de l'arrestine 3. D'ailleurs la mutation de cette tyrosine en phénylalanine permet conférer à l'arrestine 2 une affinité semblable à l'arrestine 3 pour la sous-unité  $\mu$  d'AP2. Les auteurs émettent également l'hypothèse que ce genre de variation entre les arrestines 2 et 3 pourrait être à la base de la régulation des différentes compositions de complexes de signalisation organisés au récepteur. Dès lors, nous nous sommes intéressés à la détermination des résidus tyrosine phosphorylés de l'arrestine 3.

### 5.3 Les tyrosines de la queue C-terminale de l'arrestine 3 sont d'importants sites de phosphorylation

Nos résultats d'essais de phosphorylation avec le mutant Y<sup>380</sup>A-Y<sup>404</sup>A de l'arrestine 3 démontrent que parmi les douze tyrosines de l'arrestine, les deux qui se retrouvent sur la queue C-terminale sont les plus importantes pour la phosphorylation. Notre hypothèse s'avère donc vraie : les tyrosines majoritairement responsables de la phosphorylation seraient uniques à l'arrestine 3. Les résultats obtenus en soumettant la séquence de l'arrestine 3 à différents programmes de prédiction de phosphorylation vont dans le même sens; les deux derniers résidus tyrosines ont une plus grande chance d'être ainsi modifiés. Or, en regardant attentivement les résidus de part et d'autre des tyrosines 380 et 404, on remarque un patron reconnu par les kinases pour la phosphorylation. Il est documenté que les tyrosines pouvant être phosphorylées sont souvent précédées de résidus chargés, plus précisément d'un acide aminé basique (arginine, R ou lysine, K) situé à sept résidus de la tyrosine et de un ou deux acides aminés acides (aspartate, D ou Glutamate, E) (PATSCHEINSKY *et al.*, 1982; YAN *et al.*, 1998). La Y<sup>404</sup> répond à ces exigences parfaitement alors qu'il n'y a pas de résidu basique à la position numéro sept en amont de la Y<sup>380</sup>. C'est pourquoi il serait intéressant de construire des mutants ponctuels de l'arrestine 3 pour chacune de ces tyrosines. Nous pourrions déterminer si les deux ciblées sont autant essentielles l'une que l'autre. Par contre, peu importe le résultat, les tyrosines 380 et 404 apparaissent toutes deux d'excellentes cibles lorsqu'on considère leur situation spatiale sur l'arrestine 3.

En effet, la queue C-terminale de l'arrestine 3 est un domaine que nous pouvons caractériser de mobile. Suite à l'activation et la phosphorylation d'un RCPG, l'arrestine y est recrutée et cette liaison induit un changement de sa conformation (GUREVICH et GUREVICH, 2004). Cela aura comme effet de libérer la queue C-terminale de l'arrestine et ainsi exposer des sites de liaison pour d'autres partenaires comme la clathrine et AP2. Ces sites de liaison ont été caractérisés et correspondent respectivement au motif L<sup>373</sup>I<sup>374</sup>E<sup>375</sup>F<sup>376</sup>E<sup>377</sup> et à l'arginine 396 (KRUPNICK *et al.*, 1997; LAPORTE *et al.*, 2000). Ces deux sites sont situés très près des deux tyrosines que nous avons ciblées. Il pourrait donc y avoir une corrélation entre l'état de phosphorylation des résidus tyrosine 380 et 404 de l'arrestine 3 et son affinité pour la clathrine et AP2. Quels seraient les rôles de la phosphorylation de ces deux tyrosines? Nous pouvons émettre deux hypothèses : La phosphorylation pourrait réguler l'association avec ces partenaires ou bien la phosphorylation des deux résidus pourrait aider au maintien de l'arrestine dans une conformation dite active. En effet, la charge apportée par les groupements phosphate pourrait empêcher le retour à la conformation inactive.

Bien sûr, la phosphorylation sur tyrosines peut aussi amener d'autres types d'interactions, par exemple avec des phosphatases.

#### **5.4 Les arrestines 2 et 3 sont régulées par l'activité de Shp2**

De précédents travaux de notre laboratoire démontrent que Shp2 est un partenaire d'interaction des arrestines (TURCOTTE, 2008). En outre, de très récentes recherches

vont dans le même sens en montrant que l'arrestine 3 se retrouve en complexe avec Shp2 et un récepteur de la famille des KIRs, « *Killer immunoglobulin-like receptors* » (YU *et al.*, 2008). Nos travaux vont par contre plus loin en prouvant à l'aide d'essai de type GST-Pulldown que Shp2 et les arrestines peuvent interagir directement. Les domaines d'interaction ont été déterminés de la même façon, soit par essais de type GST-Pulldown à l'aide de mutants tronqués (TURCOTTE, 2008). Ainsi, nous savons que la région 100 à 201 de la séquence en acides aminés de l'arrestine 3 est essentielle à la liaison avec Shp2. De plus, les domaines SH2 de Shp2 ne sont pas nécessaires à l'interaction avec l'arrestine 3.

Les présents travaux viennent appuyer les précédentes découvertes en démontrant que l'activité phosphatase de Shp2 amène la déphosphorylation des arrestines. Comme c'était le cas pour la kinase, Src, nous ne pouvons pas affirmer que l'arrestine est un substrat direct de Shp2. Par contre, le fait que Shp2 puisse lier directement l'arrestine, tel que nous l'avions observé par GST-Pulldown, vient supporter cette hypothèse. De surcroît, des expériences antérieures de co-immunoprécipitation de différentes constructions de Shp2 (de type sauvage, CA et DN) avec l'arrestine 3 montraient que les phosphatases de type sauvage et dominante négative (DN) peuvent toutes deux être co-immunoprécipitées alors que ce n'est pas le cas pour Shp2 constitutivement active (CA). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'arrestine 3 serait un substrat de Shp2. En fait, le complexe Shp2 DN-arrestine 3 est visible puisqu'en l'absence d'activité catalytique, Shp2 DN serait incapable de déphosphoryler l'arrestine 3 et par conséquent resterait lier à ce substrat. À l'opposé, Shp2 CA aurait une interaction si rapide avec l'arrestine, qu'on ne pourrait pas les voir en complexe. Il serait d'ailleurs

intéressant d'effectuer des essais de type GST-Pulldown avec les constructions de Shp2 CA et DN pour étudier leur affinité *in vitro* avec l'arrestine 3.

D'autre part, on remarque que l'utilisation de la forme sauvage de Shp2 ne semble pas affecter l'état de phosphorylation de l'arrestine 2 ou 3. En effet, nous nous serions attendus à ce que la surexpression de Shp2 ait un effet de déphosphorylation sur l'arrestine, moins fort qu'avec la Shp2 CA mais tout de même un effet. Il existe peut-être une explication simple au phénomène, car il a été constaté que la forme constitutivement active de la kinase Src pourrait diminuer l'activité phosphatase de la Shp2 de type sauvage (WALTER *et al.*, 1999).

Ayant démontré, dans la première partie de nos travaux la régulation de l'arrestine 3 par la phosphorylation de certaines tyrosines. Nous avons donc entrepris des études visant à déterminer l'impact de ces observations dans un contexte de régulation des RCPGs.

### **5.5 La phosphorylation de tyrosines de l'arrestine 3 : Vers une fonction...**

Nos recherches quant à la fonction de la phosphorylation des tyrosines de l'arrestine n'en sont qu'à leurs débuts. Par contre, elles viennent aider à comprendre et à ouvrir de nouvelles avenues de recherche.

### 5.5.1 L'induction de la phosphorylation de l'arrestine 3 par stimulation d'un RCPG

Notre résultat préliminaire d'immunoprécipitation de l'arrestine 3 avec ou sans stimulation du récepteur à l'angiotensine II (AT<sub>1</sub>R) démontre que l'arrestine ne serait pas phosphorylée de façon basale, mais qu'elle le serait après 15 min d'activation d'AT<sub>1</sub>R. Bien sur cette expérience demeure à refaire afin de confirmer ce premier résultat. De plus, il faudra ajouter un immunobuvardage contrôle des lysats cellulaires pour s'assurer du niveau d'expression égal du récepteur dans chaque réaction. Il faudra valider nos observations en utilisant un inhibiteur de phosphatases afin d'obtenir un niveau de phosphorylation plus facilement détectable en immunobuvardage. Nous pourrions effectuer un traitement au pervanadate, un inhibiteur de protéines tyrosines phosphatases qui est perméable aux cellules.

Mis à part cela, ce résultat préliminaire est intéressant en soi, car il permet de croire que la phosphorylation de l'arrestine 3 puisse être induite suite à l'activation d'un RCPG. Cela donne du poids au fait que ce soit les tyrosines de la queue C-terminale qui soient les principaux résidus impliqués. En effet, comme mentionné plus tôt, l'association de l'arrestine au récepteur induit le changement de conformation de celle-ci. En outre, il a été montré que l'activation d'AT<sub>1</sub>R induit la phosphorylation par Src de la sous-unité  $\beta$ 2-adaptine de la protéine AP-2 qui se retrouve en complexe avec l'arrestine (FESSART *et al.*, 2007).

Il sera également de mise de déterminer si d'autres RCPGs peuvent induire cette phosphorylation de l'arrestine. On pourrait alors penser à des récepteurs ayant

également un patron d'internalisation de classe B, comme le récepteur de la vasopressine de type 2 (V<sub>2</sub>R) et le récepteur de la neurokinine 1 (NK1R) (OAKLEY *et al.* 2000). De même, il faudrait répéter ces essais avec plusieurs temps d'incubation afin de savoir quel est le patron de phosphorylation de l'arrestine 3 dans le temps selon l'activation d'un RCPG.

Par ailleurs, de précédentes études de co-immunoprécipitation effectuées au laboratoire avaient permis de déterminer que le complexe arrestine 3-Shp2 est modulé dans le temps lorsqu'on stimule le récepteur AT<sub>1</sub>R (TURCOTTE, 2008). On avait alors démontré que Shp2 co-immunoprécipitait en quantité décroissante avec l'arrestine 3 lorsqu'on stimulait le récepteur avec de l'angiotensine II de 0 à 15 min. Afin de confirmer ces résultats et de mieux comprendre ce qu'il se passait, nous avons effectué des essais de microscopie confocale avec l'arrestine 3 et Shp2.

### **5.5.2 Le complexe arrestine 3-Shp2 modulé par la stimulation de RCPGs**

En regardant la localisation de l'arrestine 3 et de Shp2 en microscopie, nous avons d'abord pu établir que les deux protéines cytoplasmiques colocalisent dans les cellules au repos. Par la suite, en stimulant le récepteur AT<sub>1</sub>R, nous avons observé un recrutement de l'arrestine 3 à la membrane à 2 min suivi d'une relocalisation au niveau des endosomes à 15 min, comme il est connu dans la littérature (PIERCE *et LEFKOWITZ*, 2001). Or à 2 min, Shp2 est également recrutée à la membrane et colocalise avec l'arrestine 3. Alors qu'après 15 min de stimulation, Shp2 ne se concentre pas au niveau des endosomes comme le fait l'arrestine. Lorsqu'on stimule le récepteur  $\beta_2$ AR, on observe le même phénomène que pour AT<sub>1</sub>R à 2 min. Par contre, à

15 min, il semble y avoir encore une portion importante de l'arrestine 3 toujours localisée à la membrane et Shp2 ne semble plus y être. Donc la portion cytosolique de l'arrestine colocalise en partie avec Shp2 un peu comme dans les cellules non-stimulées.

À priori, on constate que la surexpression de Shp2 ne semble pas affecter ni le recrutement de l'arrestine 3 au RCPG ni son internalisation avec les récepteurs ayant un patron d'endocytose de classe B, comme  $\beta_2$ AR.

Ensuite, il est notable qu'à 2 min de stimulation surtout avec l'angiotensine II, les cellules ont une morphologie distinctive de celles à 0 et 15 min. Il est connu que l'activation d'AT<sub>1</sub>R avec de l'angiotensine II peut induire la contraction cellulaire (MEHTA *et* GRIENGLING, 2007). Or, il semblerait, comme le démontre une récente étude, que ce phénomène soit visible dans les HEK293 en les stimulant précisément 2 min (CUERRIER *et al.*, 2008). La morphologie particulière de la cellule serait donc due à une réorganisation du cytosquelette.

### 5.5.3 D'autres hypothèses possibles...

Tel que mentionné dans la section « RÉSULTATS », il semble que l'arrestine 3 YAYA soit plus exprimée que celle de type sauvage. Cette différence d'expression ne semble pas liée à une mauvaise manipulation ni en la qualité de l'ADN utilisé pour les transfections. Il serait possible de vérifier la stabilité des protéines sauvage et mutante en effectuant des essais de type « *pulse-chase* » en utilisant des protéines marquées à la méthionine <sup>35</sup>S. Par ailleurs, nous avons donc cherché à savoir ce qui pourrait expliquer cette distinction d'expression. Il est connu que l'arrestine peut être ubiquitinée sur ses

résidus lysine (SHENOY *et* LEFKOWITZ, 2005a; SHENOY *et al.*, 2007). Cette modification aurait lieu suite à la liaison au récepteur et serait liée à la stabilité du complexe RCPG-arrestine. En effet, dans le cas des récepteurs ayant un patron d'internalisation de classe A, il y aurait une ubiquitination transitoire de l'arrestine (HANSON *et al.*, 2007). Tandis qu'il s'agirait d'une ubiquitination plus stable pour les récepteurs de classe B qui maintiennent leur interaction avec l'arrestine au niveau des endosomes. Cependant, rien n'est proposé quant au mécanisme engageant l'ubiquitination de l'arrestine. Puisqu'une telle modification peut augmenter l'association aux membranes et également jouer sur la stabilité d'une protéine, nous nous demandons si la phosphorylation des tyrosines de l'arrestine ne pourrait pas être un signal d'ubiquitination. Il serait donc intéressant de déterminer dans un premier temps si l'arrestine 3 de type sauvage se retrouve davantage liée aux membranes comparativement au mutant YAYA qui n'est pratiquement plus phosphorylé. Ceci pourrait être vérifié en regardant les quantités de chaque protéine se retrouvant dans les parties solubles et insolubles des lysats cellulaires. Effectivement, nous détectons jusqu'à maintenant plus d'arrestine 3 YAYA et cela serait dû, selon nos hypothèses, à une plus grande proportion cytosolique (partie soluble) de cette construction par rapport à l'arrestine 3 de type sauvage connue pour s'associer au cytosquelette (partie non-soluble) qui serait perdue en grande partie lors de la préparation des lysats.

## CONCLUSIONS

Les arrestines non-visuelles occupent une place importante au sein des cellules. Ces protéines régulatrices multifonctionnelles sont impliquées dans le routage et la signalisation intracellulaire. À ce jour, aucune modification par phosphorylation sur résidus tyrosine n'était connue pour l'arrestine 3.

En utilisant des essais d'immunoprécipitation, nous avons démontré, pour la première fois, que l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses tyrosines. Nous avons également mis en évidence que les résidus tyrosine 380 et 404 de la queue C-terminale de l'arrestine 3 sont d'importants sites de phosphorylation. De plus, nous apportons la première preuve que les arrestines peuvent être régulées par l'activité de la phosphatase Shp2, un nouveau partenaire d'interaction déjà caractérisé par notre laboratoire.

De plus, nous avons employé différentes approches expérimentales afin d'explorer la ou les fonctions de la phosphorylation de l'arrestine 3. D'abord un essai d'immunoprécipitation nous permet de croire que l'arrestine 3 pourrait être phosphorylée sur ses résidus tyrosine suite à l'activation d'AT<sub>1</sub>R, un RCPG. Grâce à des essais d'immunofluorescence, nous pouvons prédire que le complexe arrestine 3-Shp2 peut être recruté au RCPG activé, que ce soit AT<sub>1</sub>R ou bien  $\beta_2$ AR.

Finalement, les diverses avenues empruntées afin de découvrir une fonction précise à la phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3 ainsi qu'à sa régulation par Shp2

n'ont peut-être pas encore permis une explication claire, mais aident à établir de nouvelles hypothèses.

## PERSPECTIVES

Les travaux présentés ouvrent la voie à plusieurs expériences. Premièrement, nous avons observé que l'arrestine 3 peut être phosphorylée sur ses tyrosines en présence de Src constitutivement active. Bien sur, il serait intéressant de savoir si cette phosphorylation est directe, c'est-à-dire si l'arrestine 3 est un substrat de Src. Des essais de phosphorylation *in vitro* pourraient être réalisés avec les protéines purifiées afin de déterminer si l'action de Src est directe. En ce sens, si les résultats sont positifs, il serait également souhaitable d'effectuer le même genre d'essai cette fois en ajoutant de la Shp2 purifiée pour savoir si l'arrestine 3 en est également un substrat.

Comme mentionné précédemment, nous pourrions également tenter de voir si les tyrosines 380 et 404 sont aussi importantes l'une que l'autre, ceci en effectuant des immunoprécipitations semblables à celles effectuées avec le mutant YAYA mais cette fois avec des simples mutants ponctuels. De plus, nous pourrions utiliser le mutant le plus efficace des trois dans des essais de microscopie, d'endocytose par ELISA et d'activation des ERKs afin de déterminer le comportement de cette arrestine 3 ne pouvant être convenablement phosphorylée. Cela permettrait peut-être de découvrir des fonctions de l'arrestine 3 de type sauvage qui nécessitent sa phosphorylation de résidus tyrosine ou encore qui sont inhibées par celle-ci.

D'un autre côté, il serait intéressant de vérifier l'hypothèse de stabilité de l'arrestine 3 par rapport à l'arrestine 3 YAYA. D'abord au niveau de leur ARN et ensuite au

niveau des protéines elles-mêmes. Par la suite nous pourrions également vérifier le niveau d'ubiquitination de ces deux constructions. De tels essais permettraient de déterminer s'il y a un lien entre la phosphorylation des résidus tyrosine et l'ubiquitination de l'arrestine 3.

Toutes ces perspectives mènent vers la compréhension de l'importance que revêt la régulation de la phosphorylation des tyrosines de l'arrestine 3. Peut-être apporterons-nous la pièce de casse-tête manquante afin de vraiment comprendre les différences entre les arrestines non-visuelles.

## REMERCIEMENTS

D'abord, je tiens à remercier le Pr Jean-Luc Parent de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je suis très reconnaissante de la confiance et de l'écoute qu'il m'a accordée ainsi que pour tous les conseils souvent très précieux. L'expérience que j'ai acquise au long des années passées dans le laboratoire, particulièrement les deux dernières, me sera grandement bénéfique. En plus d'accroître mes connaissances scientifiques et mon intérêt pour la science, j'ai pu développer mon esprit critique. Merci aussi de m'avoir permis de présenter mes travaux de recherche en congrès et de me permettre de continuer mes essais afin d'écrire un papier. Je suis très heureuse de pouvoir poursuivre mes recherches dans ton laboratoire. Merci pour tout.

Ensuite, je remercie les membres de mon jury, le Pr Guylain Boulay (Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke) et le Pr Fernand-Pierre Gendron (Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke). J'apprécie beaucoup que vous ayez accepté de consacrer un peu de votre précieux temps à la correction de mon mémoire.

Je tiens également à remercier spécialement Audrey Parent pour avoir toujours été là depuis le tout début. Sans elle mon expérience au laboratoire n'aurait pas pris tout son sens. Merci d'avoir continuellement été disponible pour moi, merci pour tes conseils pratiques et ta rigueur scientifique. Ton soutien et ta présence m'ont été grandement profitables. Merci particulièrement Maxime Gallant pour ses conseils, les discussions plus philosophiques et la première lecture de mon mémoire. Un merci

spécial à Marie-Eve Turcotte pour m'avoir permise de poursuivre son projet et pour sa complicité.

Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire et du Service de Rhumatologie que j'ai côtoyés; l'atmosphère du 3<sup>e</sup> étage du Centre de Recherche Clinique n'aurait pas été et ne serait pas aussi unique et chaleureuse sans vous tous.

Finalement, je remercie mon amoureux, Hugo, pour son support exceptionnel et tous ses mots d'encouragement. Merci pour ta présence, en elle seule inestimable.

## ANNEXE

### Milieu de culture pour les cellules HEK293

1 sachet de DMEM  
12,5 mM Hepes  
22mM NaHCO<sub>3</sub>

Compléter à 1000mL avec de l'H<sub>2</sub>O nanopure, ajuster le pH à 7,2 et filtrer.

Ajouter à 900mL de milieu stérile :

10%(v/v) sérum de bovin foetal (FBS)

### PBS 1X

137 mM NaCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,7 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Compléter à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. Ajuster le pH à 7.4 si nécessaire.

### Tampon de lyse (immunoprécipitations)

150 mM NaCl  
50 mM Tris, pH 8.0  
1% IGEPAL  
0,5% désoxycholate  
0,1% SDS  
10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
5 mM EDTA

Compléter à 50 mL avec de l'H<sub>2</sub>O nanopure.

**SDS Sample Buffer 4X (Tampon de Laemmli)**

Pour un volume de 50 mL :

|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| 25 mL d'une | solution 5 mM Tris-base / 0,4% (p/v) SDS |
| 40% (v/v)   | glycérol                                 |
| 8% (p/v)    | SDS                                      |
| 0,6 M       | 2-mercaptoéthanol                        |
| 10 mg de    | bromophénol bleu                         |

**Tampon d'électrophorèse 1X**

|            |           |
|------------|-----------|
| 25 mM      | Tris-base |
| 192 mM     | Glycine   |
| 0,1% (p/v) | SDS       |

Compléter à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

**Tampon de transfert 1X**

|        |           |
|--------|-----------|
| 25 mM  | Tris-base |
| 192 mM | Glycine   |
| 20%    | MeOH      |

Compléter à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

**CLAP (Cocktail d'inhibiteurs de protéases)**

|       |              |
|-------|--------------|
| 10 mM | chymostatine |
| 10 mM | leupeptine   |
| 9 mM  | antipain     |
| 9 mM  | pepstatine   |

**TBS 1X**

|        |              |
|--------|--------------|
| 20 mM  | Tris, pH 7.5 |
| 150 mM | NaCl         |

Compléter à 1L avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. et Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, vol. 117, n° 6, p. 699-711.
- Andersen, J.N., Mortensen, O.H., Peters, G.H., Drake, P.G., Iversen, L.F., Olsen, O.H., Jansen, P.G., Andersen, H.S., Tonks, N.K. et Moller, N.P. (2001). Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol*, vol. 21, n° 21, p. 7117-7136.
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1992). Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem*, vol. 267, n° 25, p. 17882-17890.
- Barak, L.S., Tiberi, M., Freedman, N.J., Kwatra, M.M., Lefkowitz, R.J. et Caron, M.G. (1994). A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated beta 2-adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem*, vol. 269, n° 4, p. 2790-2795.
- Barford, D. et Neel, B.G. (1998). Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure (London, England : 1993)*, vol. 6, n° 3, p. 249-254.

- Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R. et Caron, M.G. (2005). An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, vol. 122, n° 2, p. 261-273.
- Bennett, A.M., Tang, T.L., Sugimoto, S., Walsh, C.T. et Neel, B.G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, n° 15, p. 7335-7339.
- Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1987). Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, n° 24, p. 8879-8882.
- Blom, N., Gammeltoft, S. et Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, vol. 294, n° 5, p. 1351-1362.
- Bouvier, M., Hausdorff, W.P., De Blasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilka, B.K., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1988). Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, vol. 333, n° 6171, p. 370-373.
- Bridges, T.M. et Lindsley, C.W. (2008). G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol*, vol. 3, n° 9, p. 530-541.

- Chernock, R.D., Cherla, R.P. et Ganju, R.K. (2001). SHP2 and cbl participate in alpha-chemokine receptor CXCR4-mediated signaling pathways. *Blood*, vol. 97, n° 3, p. 608-615.
- Chang, CC. et Lin, C-J., LIBSVM : a library for support vector machines, 2001.  
Software available at <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>.
- Chong, Z.Z. et Maiese, K. (2007). The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol*, vol. 22, n° 11, p. 1251-1267.
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol*, vol. 66, n° 2, p. 61-79.
- Craft, C.M., Whitmore, D.H. et Wiechmann, A.F. (1994). Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *J Biol Chem*, vol. 269, n° 6, p. 4613-4619.
- Cuerrier, C.M., Benoit, M., Guillemette, G., Jr Gobeil, F. et Grandbois, M. (2008). Real-time monitoring of angiotensin II-induced contractile response and cytoskeleton remodeling in individual cells by atomic force microscopy. *Pflugers Arch*.
- Dance, M., Montagner, A., Salles, J.P., Yart, A. et Raynal, P. (2008). The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal*, vol. 20, n° 3, p. 453-459.

- DeFea, K.A. (2007). Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu Rev Physiol*, vol. 69, p. 535-560.
- DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J. et Shenoy, S.K. (2007). Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, vol. 69, p. 483-510.
- Doan, T., Farmer, P., Cooney, T. et Ali, M.S. (2004). Selective down-regulation of angiotensin II receptor type 1A signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2 in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, vol. 16, n° 3, p. 301-311.
- Doss, R.C., Perkins, J.P. et Harden, T.K. (1981). Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J Biol Chem*, vol. 256, n° 23, p. 12281-12286.
- Duchene, J., Schanstra, J.P., Pecher, C., Pizard, A., Susini, C., Esteve, J.P., Bascands, J.L. et Girolami, J.P. (2002). A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem*, vol. 277, n° 43, p. 40375-40383.
- Feng, G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res*, vol. 253, n° 1, p. 47-54.
- Feng, G.S., Hui, C.C. et Pawson, T. (1993). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 259, n° 5101, p. 1607-1611.

- Ferguson, S.S., Barak, L.S., Zhang, J. et Caron, M.G. (1996). G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol*, vol. 74, n° 10, p. 1095-1110.
- Ferguson, S.S. et Caron, M.G. (1998). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, vol. 9, n° 2, p. 119-127.
- Ferguson, S.S., Downey, W.E.,3rd, Colapietro, A.M., Barak, L.S., Menard, L. et Caron, M.G. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 271, n° 5247, p. 363-366.
- Ferjoux, G., Lopez, F., Esteve, J.P., Ferrand, A., Vivier, E., Vely, F., Saint-Laurent, N., Pradayrol, L., Buscail, L. et Susini, C. (2003). Critical role of Src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation. *Mol Biol Cell*, vol. 14, n° 9, p. 3911-3928.
- Fessart, D., Simaan, M., Zimmerman, B., Comeau, J., Hamdam, F.F., Wiseman, P.W., Bouvier, M., Laporte, S.A. (2007). Src-dependent phosphorylation of  $\beta$ 2-adaptin dissociate the  $\beta$ -arrestin-AP-2 complex. *J Cell Science*, vol. 120, p. 1723-1732.
- Freeman, R.M.,Jr, Plutzky, J. et Neel, B.G. (1992). Identification of a human src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase: a putative homolog of Drosophila corkscrew. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, n° 23, p. 11239-11243.
- Gurevich, E.V. et Gurevich, V.V. (2006). Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol*, vol. 7, n° 9, p. 236.

- Gurevich, V.V. et Gurevich, E.V. (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci*, vol. 25, n° 2, p. 105-111.
- Hadcock, J.R. et Malbon, C.C. (1988). Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, n° 14, p. 5021-5025.
- Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B. et Schubert, C. (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure (London, England : 1993)*, vol. 9, n° 9, p. 869-880.
- Hanson, S.M., Cleghorn, W.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Raman, D., Song, X., Nair, K.S., Slepak, V.Z., Klug, C.S. et Gurevich, V.V. (2007). Arrestin mobilizes signaling proteins to the cytoskeleton and redirects their activity. *J Mol Biol*, vol. 368, n° 2, p. 375-387.
- Hausdorff, W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1989). Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem*, vol. 264, n° 21, p. 12657-12665.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V. et Sigler, P.B. (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*, vol. 97, n° 2, p. 257-269.
- Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J. et Shoelson, S.E. (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell*, vol. 92, n° 4, p. 441-450.

- Jiang, Z.X. et Zhang, Z.Y. (2008). Targeting PTPs with small molecule inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, vol. 27, n° 2, p. 263-272.
- Krupnick, J.G., Goodman, O.B., Jr, Keen, J.H. et Benovic, J.L. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem*, vol. 272, n° 23, p. 15011-15016.
- Lagerstrom, M.C. et Schioth, H.B. (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, n° 4, p. 339-357.
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S. et Caron, M.G. (2000). The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*, vol. 275, n° 30, p. 23120-23126.
- Lechleider, R.J., Freeman, R.M., Jr et Neel, B.G. (1993). Tyrosyl phosphorylation and growth factor receptor association of the human corkscrew homologue, SH-PTP2. *J Biol Chem*, vol. 268, n° 18, p. 13434-13438.
- Lefkowitz, R.J. et Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 308, n° 5721, p. 512-517.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1990). Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem*, vol. 265, n° 6, p. 3202-3211.

- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1990). beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 248, n° 4962, p. 1547-1550.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J. (1999). Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 283, n° 5402, p. 655-661.
- Ma, L. et Pei, G. (2007). Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci*, vol. 120, n° Pt 2, p. 213-218.
- Marion, S., Fralish, G.B., Laporte, S., Caron, M.G. et Barak, L.S. (2007). N-terminal tyrosine modulation of the endocytic adaptor function of the beta-arrestins. *J Biol Chem*, vol. 282, n° 26, p. 18937-18944.
- Mehta, P.K. et Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 292, n° 1, p. C82-97.
- Miller, W.E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K.D., Luttrell, L.M. et Lefkowitz, R.J. (2000). beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis. *J Biol Chem*, vol. 275, n° 15, p. 11312-11319.
- Mohi, M.G. et Neel, B.G. (2007). The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, vol. 17, n° 1, p. 23-30.

- Moore, C.A., Milano, S.K. et Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*, vol. 69, p. 451-482.
- Murakami, A., Yajima, T., Sakuma, H., McLaren, M.J. et Inana, G. (1993). X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS letters*, vol. 334, n° 2, p. 203-209.
- Needleman, S.B. et Wunsch, C.D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, vol. 48, n° 3, p. 443-453.
- Neel, B.G., Gu, H. et Pao, L. (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, vol. 28, n° 6, p. 284-293.
- Noonan, J.A. (2006). Noonan syndrome and related disorders: alterations in growth and puberty. *Rev Endocr Metab Disord*, vol. 7, n° 4, p. 251-255.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S. et Caron, M.G. (2001). Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *J Biol Chem*, vol. 276, n° 22, p. 19452-19460.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G. et Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, vol. 275, n° 22, p. 17201-17210.

- Parruti, G., Peracchia, F., Sallese, M., Ambrosini, G., Masini, M., Rotilio, D. et De Blasi, A. (1993). Molecular analysis of human beta-arrestin-1: cloning, tissue distribution, and regulation of expression. Identification of two isoforms generated by alternative splicing. *J Biol Chem*, vol. 268, n° 13, p. 9753-9761.
- Patschinsky, T., Hunter, T., Esch, F.S., Cooper, J.A. et Sefton, B.M. (1982). Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 79, n° 4, p. 973-977.
- Pierce, K.L. et Lefkowitz, R.J. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, n° 10, p. 727-733.
- Poole, A.W. et Jones, M.L. (2005). A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal*, vol. 17, n° 11, p. 1323-1332.
- Premont, R.T., Inglese, J. et Lefkowitz, R.J. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J*, vol. 9, n° 2, p. 175-182.
- Roskoski, R., Jr (2004). Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 324, n° 4, p. 1155-1164.
- Roskoski, R., Jr (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 331, n° 1, p. 1-14.
- Rozengurt, E. (2007). Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol*, vol. 213, n° 3, p. 589-602.

- Sakmar, T.P. (2002). Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. *Curr Opin Cell Biol*, vol. 14, n° 2, p. 189-195.
- Sandilands, E. et Frame, M.C. (2008). Endosomal trafficking of Src tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*, vol. 18, n° 7, p. 322-329.
- Sarkozy, A., Digilio, M.C. et Dallapiccola, B. (2008). Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, vol. 3, p. 13.
- Schubbert, S., Shannon, K. et Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*, vol. 7, n° 4, p. 295-308.
- Shenoy, S.K., Barak, L.S., Xiao, K., Ahn, S., Berthouze, M., Shukla, A.K., Luttrell, L.M. et Lefkowitz, R.J. (2007). Ubiquitination of beta-arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation. *J Biol Chem*, vol. 282, n° 40, p. 29549-29562.
- Shenoy, S.K. et Lefkowitz, R.J. (2005). Receptor-specific ubiquitination of beta-arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes. *J Biol Chem*, vol. 280, n° 15, p. 15315-15324.
- Shenoy, S.K. et Lefkowitz, R.J. (2005). Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Sci STKE*, vol. 2005, n° 308, p. cm10.
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J. et Tao, R. (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, n° 20, p. 6975-6979.

- Sterne-Marr, R., Gurevich, V.V., Goldsmith, P., Bodine, R.C., Sanders, C., Donoso, L.A. et Benovic, J.L. (1993). Polypeptide variants of beta-arrestin and arrestin3. *J Biol Chem*, vol. 268, n° 21, p. 15640-15648.
- Tang, H., Zhao, Z.J., Huang, X.Y., Landon, E.J. et Inagami, T. (1999). Fyn kinase-directed activation of SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-2 by Gi protein-coupled receptors in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, vol. 274, n° 18, p. 12401-12407.
- Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S. et Gelb, B.D. (2001). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet*, vol. 29, n° 4, p. 465-468.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C.M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J.D. et Gelb, B.D. (2003). Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*, vol. 34, n° 2, p. 148-150.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C.M., Shannon, K.M. et Loh, M.L. (2004). SHP-2 and myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol*, vol. 11, n° 1, p. 44-50.
- Thomas, S.M. et Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 13, p. 513-609.

- Turcotte, M-E. (2008). La tyrosine phosphatase Shp2, un nouveau partenaire d'interaction des arrestines non-visuelles. Université de Sherbrooke, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Mémoire, p. 1-156.
- Van Vactor, D., O'Reilly, A.M. et Neel, B.G. (1998). Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Genet Dev*, vol. 8, n° 1, p. 112-126.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. et Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 259, n° 5101, p. 1611-1614.
- Vroon, A., Heijnen, C.J. et Kavelaars, A. (2006). GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol*, vol. 80, n° 6, p. 1214-1221.
- Walter, A.O., Peng, Z.Y. et Cartwright, C.A. (1999). The Shp-2 tyrosine phosphatase activates the Src tyrosine kinase by a non-enzymatic mechanism. *Oncogene*, vol. 18, n° 11, p. 1911-1920.
- Wang, P., Wu, Y., Ge, X., Ma, L. et Pei, G. (2003). Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *J Biol Chem*, vol. 278, n° 13, p. 11648-11653.
- Willoughby, E.A. et Collins, M.K. (2005). Dynamic interaction between the dual specificity phosphatase MKP7 and the JNK3 scaffold protein beta-arrestin 2. *J Biol Chem*, vol. 280, n° 27, p. 25651-25658.
- Xue, Y., Ren, J., Gao, X., Jin, C., Wen, L. et Yao, X. (2008). GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics*, vol. 7, n° 9, p. 1598-1608.

Yamaki, K., Takahashi, Y., Sakuragi, S. et Matsubara, K. (1987). Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 142, n° 3, p. 904-910.

Yan, J.X., Packer, N.H., Gooley, A.A. et Williams, K.L. (1998). Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids. *J Chromatogr A*, vol. 808, n° 1-2, p. 23-41.