

**L'ACADÉMIE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET PATHOLOGIE
"NICOLAE SIMIONESCU"**

THÈSE
-RÉSUMÉ DU LIVRE-

**La participation des protéines tyrosine phosphatases (PTP)
dans la signalisation intracellulaire**

Coordinateur:
Acad. Maya Simionescu

Doctorant:
Andreea Miruna Nemezc

Bucarest
-2012-

TABLE DES MATIÈRES

Partie I- L'état actuel des connaissances

I. Phosphatases, régulateurs de l'homéostasie

1. Définition, mécanisme d'action et la classification
2. Protéines phosphatases (PP)-classification

II. Protéines Tyrosine Phosphatases (PTP)

1. La classification de PTP
2. La structure de PTP
3. La génétique de PTP
4. Le substrat reconnaissance de PTP
5. La réglementation des PTP
 - a. Le clivage protéolytique
 - b. Phosphorylation
 - c. Dimérisation
 - d. Oxydation
 - e. D'autres modifications post-traductionnelles (sumoilation, acétylation)
 - f. L'inhibition de l'activité enzymatique /expression de la protéine de PTP

III. La signalisation intracellulaire de PTP

1. Localisation et substrates cellulaires
2. Vasculaire PTP – le rôle dans la physiologie vasculaire et la pathologie
 - A. *PTP dans les cellules endothéliales*
 - a. PTP impliqués dans l'angiogénèse
 - VEGFR et PTP
 - Tie2 et PTP
 - b. PTP impliqués dans l'adhésion et la motilité
 - Intégrines et PTP
 - PECAM et PTP
 - c. PTP impliqués dans l'adhésion intracellulaire
 - Cadhérines et PTP
 - B. *PTP dans les cellules musculaires lisses*
PTP impliqués dans l'angiogénèse
 - PDGFR et PTP
 - AT et PTP
 - NO et PTP
3. L'implication PTP dans le diabète sucré
4. Le rôle de PTP dans d'autres maladies

Partie II – Les contributions originales

A. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

B. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES

C. DES ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

I. „*in vitro*” modèle expérimental–cellules musculaires lisses dans cultura; L'effets du stress oxydatif, de la stimulation par l'insuline et des inhibiteurs sur les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire: molécules concernées

1. L'effet de la forte concentration de glucose, le stress oxydatif et l'insuline sur :
 - ERK ½ contrôlée mitogène voie
 - contrôlée par voie métabolique actif Akt
 - voie de signalisation contrôlées par la déphosphorylation de PTP-1BRésultats et discussions
2. L'effet de l'hyperglycémie et le facteur de croissance PDGF-BB sur PTP-1B et les molécules de signalisation de l'insuline voie
Résultats et discussions

3. La modulation de l'expression de protéines et de l'activité des molécules de la voie de signalisation insuline (ERK ½ , Akt and **PTP-1B**) à l'aide d'*oxydants/antioxydants* et des *inhibiteurs*

a. L'effet des *oxydants* et des *inhibiteurs*

Résultats et discussions

b. L'influence de l'*oxydation sur les antioxydants* induite par une concentration élevée en glucose, ainsi que le facteur de croissance PDGF-BB

Résultats et discussions

II. „in vivo” modèle expérimental – Hamsters Syriens Dorés avec streptozotocine diabète; Phosphorylation/Déphosphorylation des événements dans l'aorte

Résultats et discussions

III. Patients atteintes de l'obésité et obésité associée au diabète de Type II; Molécules de la voie de signalisation d'insuline

Résultats et discussions

D. Discussions générales

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES PUBLICATIONS

MOTS-CLÉS

Phosphatases

Kinases

Déphosphorylation

Signalisation intracellulaire

Régulateurs négatifs

Pathologie vasculaire

Insuline

Diabète

L'homéostasie

Glycémie

Phosphatases sont groupe d'enzymes qui dephosphorylate par d'un groupe phosphate à partir de son substrat. Ils catalysent l'hydrolyse des monoesters de l'acide phosphorique dans une molécule et un ion phosphate avec un groupe hydroxyle libre. Cette action est directement opposée à celle de phosphorylases et les kinases, qui sont attachées à des groupes phosphates à leurs substrats à l'aide de molécules énergétiques tels que l'ATP.

Ainsi que les kinases, les phosphatases régular la phosphorylation état de la cellule. L'équilibre entre les événements contrôlés par ces enzymes joue un rôle important dans la signalisation intracellulaire.

Depuis protéines kinases (PK) phosphorylates fréquemment des substrats des protéines sur résidus tyrosine, sérine et thréonine, la protéine phosphatases (PP) exercer l'effet d'engagement réversible habituellement les mêmes acides aminés dans les protéines.

Protéines tyrosine phosphatases (PTP) sont enzyme qui élimine groupes phosphate à partir de résidus de tyrosine dans les protéines différentes. Phosphorylation de protéines sur tyrosine résidus (pTyr) est un sujets communs de modifications post-traductionnelles qui peuvent créer une reconnaissance nouvelle pour les interactions entre protéines et la localisation cellulaire, affecter la stabilité des protéines et l'activité enzymatique. Ils peuvent aussi être un des éléments clés de réglementation dans les voies de traduction du signal et ils sont très importants dans le contrôle de la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation.

PTP sont des régulateurs essentiels de la transduction du signal dans des conditions normales et physiopathologiques. Ces protéines exercent un effet régulateur sur la signalisation de transduction à différents niveaux par la déphosphorylation des récepteurs membranaires tels que protéines tyrosine kinases (PTK) et des canaux ioniques. Ils peuvent moduler cascades de signalisation par la déphosphorylation de molécules adaptatrices, les kinases intracellulaires et des facteurs de transcription. PTK ont été identifiés comme cibles pour PTP. PTP beaucoup plus déphosphorylate une PTK, et presque chaque PTK est déphosphorylée par plus d'une PTP.

Selon la spécificité de substrat, vasculaire PTP contribue à la pathologie vasculaire. PTP sont des régulateurs essentiels des événements de signalisation dépendentes de la phosphorylation de la tyrosine, et peuvent représenter de nouvelles cibles pour une intervention thérapeutique dans une variété de maladies humaines. PTP sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et cascades de signalisation mitogéniques de l'Ang II, l'insuline, l'IGF-1, EGF et PDGF dans plusieurs types de cellules, y compris les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Marrero, 2004).

Parce que d'une étape cruciale de réglementation dans la transduction signalisation de l'insuline est la déphosphorylation de molécules de signalisation par PTP, il est plausible que l'activité accrue d'un ou plusieurs PTP pourrait conduire à l'insulino-résistance (Choi et al., 2010).

La première partie de mon ouvrage „**L'état actuel des connaissances**” présente PTP tout au long de trois chapitres.

Le premier chapitre présente la classification et mécanisme catalytique des phosphatases. L'équilibre entre les réactions exercées par les phosphatases et celui effectué par les kinases semble être d'une grande importance dans la signalisation intracellulaire. Phosphatases jouent un rôle crucial dans l'homéostasie.

Le deuxième chapitre décrit la classification et de la structure PTP. En outre, révèle certains aspects concernant le reconnaissance du substrat et mécanisme d'action de PTP, ainsi que les principaux processus de régulation de l'action des PTP

Dans le dernier chapitre on montre la localisation des PTP et leurs molécules de substrate. Cette partie de mon travail présente PTP localisée dans la paroi vasculaire. Selon la localisation de types de cellules, PTP vasculaires réguler les processus de l'angiogenèse comme l'adhésion cellulaire et la motilité. PTP contrôler les voies de signalisation impliquant les facteurs de croissance et des molécules d'adhésion. De cette façon, PTP ont un rôle crucial dans la physiologie et la pathologie vasculaire. Dans le même chapitre sont présentés PTP qui régule la voie de signalisation du récepteur d'insuline. Ces enzymes jouent un rôle important dans la signalisation de l'insuline en réduisant la signalisation et la déphosphorylation récepteur de l'insuline. Avec le diabète sucré il décrit également certains autre pathologies dans lesquelles PTP jouent un rôle central. Pour l'activité des PTP, il est important de l'état d'oxydation des enzymes, ainsi que les processus d'oxydation/antioxydation développé à ce niveau.

Notre recherche, axé sur la recherche de nouvelles méthodes pour la manipulation activité des PTP, en utilisant des inhibiteurs et des effets des oxydants/antioxydants sur des molécules clés de la voie signalisation de l'insuline. Par conséquent, dans la deuxième partie de mon travail „**Les contributions originales**”, il ya eu deux objectifs majeurs :

1. L'analyse de changements induits par hyperglycémie dans le niveau protéique de PTP-1B, ainsi que du niveau de la protéines des kinases impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline. **(chapitre I, II si III)**

1a. Le conséquences de peroxide d'hydrogène et action de l'insuline.

1b. Les effets de la stimulation avec facteur de croissance PDGF-BB.

Les modèles expérimentaux:

- „*in vitro*”, les cellules musculaires lisses isolées de l'aorte humaine, lignée cellulaire
- „*in vivo*”, hamsters dorés syriens injection de streptozotocine
- un matériau biologique humain, des patients atteintes de l'obésité et obésité associée au diabète de Type II

2. Enquête sur les mécanismes par lesquels les oxydants/antioxydants et des inhibiteurs agissent sur PTP-1B et les kinases de signalisation de l'insuline voie. **(chapitre I)**

2a. Le rôle du glucose élevé et orthovanadate de sodium.

- 2b. Modulation de l'expression des molécules of molecules dans des conditions hyperglycémiques et stimulation de PDGF-BB après l'action de catalase et superoxyde dismutase.

Les modèles expérimentaux:

- „*in vitro*”, les cellules musculaires lisses isolées de l'aorte humaine, lignée cellulaire

DISCUSSIONS GÉNÉRALES

Appréhender les voies de signalisation ainsi que des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire de paroi vasculaire, sont essentiels pour une meilleure compréhension de diabète associés à des dysfonctionnements endothéliaux.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la structure et l'activité enzymatique de la PTP les études menées poursuivi deux objectifs principaux:

1. Changements de la teneur en protéines des molécules de la voie de signalisation d'insuline induite par le glucose élevé associé à la stimulation des facteurs de croissance et des antioxydants (**chapitre I, II and III**).
2. Les mécanismes par lesquels les antioxydants et des inhibiteurs agissent sur les molécules de la voie de signalisation d'insuline, en rétablissant la fonction physiologique (**chapitre I**).

Results des „ Les contributions originales” présentés sur trois chapitres:

1. Glycémie élevée, le stress oxydatif et l'insuline induit un déséquilibre de la signalisation des molécules d'insuline phosphorylation dans les CML. L'hyperglycémie déterminants sur l'expression de molécules (à l'exception Akt activée), le stress oxydatif a le même effet (moins de PTP-1B), tandis que l'insuline exerce des effets antagonique des deux molécules;

L'originalité de l'étude: ***J'ai démontré que la surexposition des CML à glycémie élevée a un effet activateur sur une forte Akt. ERK ½ était judicieux de H₂O₂, mais ne répondent pas à l'insuline. Exposition de longue durée à des CML une concentration encore plus élevée de glucose (soit 30 mM) conduit à l'apparition d'une bande supplémentaire réactif avec l'anticorps PTP-1B, de masse moléculaire apparente légèrement supérieur à 51 kDa.***

2. Stimulation de la CMS avec PDGF-BB détermine une surexpression de molécules de signalisation d'insuline. Alors que l'expression des protéines PTP-1B est augmentée

par stimulation avec PDGF-BB d'une manière dose-dépendante, pAkt et pERK $\frac{1}{2}$ atteindre une valeur maximale de 2 ng / ml.

L'originalité de l'étude consiste: ***stimulation par le PDGF-BB des CML cultivées dans du glucose élevé, amplifie l'effet de PDGF-BB sur les molécules de signalisation d'insuline***

3. Entretien des CML de la glycémie élevée ainsi que dans la stimulation aiguë H_2O_2 , entraînent une diminution de l'activité des PTP due à l'oxydation. $NaVO_4$, non spécifique l'inhibiteur des PTP, induit la diminution de l'expression des protéines PTP-1B suivie d'une modification moléculaire de $\frac{1}{2}$ pAkt et pERK

L'originalité de l'étude ***J'ai établi qu'une partie de l'oxydation endogène (glycémie élevée) et exogènes un (H_2O_2) responsable de activation des PTP réduite sont réversibles. Dans une hyperglycémie, une enzyme d'oxydation PTP-1B sont également réversible, susceptible d'influencer l'activité catalytique de la phosphatase et la régulation de cette voie de signalisation de l'insuline. Dans des conditions élevées de glucose, $NaVO_4$ conduit à PTP-1B régulation à la baisse dans les CML***

4. La surexposition des molécules clés de la voie de signalisation d'insuline, suite à une culture prolongée des CML dans des conditions oxydantes hyperglycémiques, peut être inversé en antioxydants. La superoxyde dismutase et de la catalase sont également en mesure de la teneur en protéines de rétablir ces molécules, augmenté en raison de oxydations à la suite de la stimulation du PDGF-BB

L'originalité de l'étude consiste: ***la fois l'exercice antioxydants effet important sur hyperglycémis et PDGF-BB seul, engendrés par les oxydations, mais surtout sur l'hyperglycémie et PDGF-BB cumulatif, engendrés par les oxydations***

5. Dans hamsters dorés syriens injection de streptozotocine, déséquilibre de l'hyperglycémie diabétique, l'expression de phosphatases (c.-à-PTP-1B) par rapport aux kinases (PI3K soit activé et Akt) de la voie de signalisation de l'insuline. Ce déséquilibre est associé à la perméabilité endothéliale marquée et l'apoptose SMC, et peut également souligner le dysfonctionnement paroi aortique comme conséquence de nombreux changements dans ces cellules.

L'originalité de l'étude consiste: **démonstration de circulation effets hyperglycémie sur l'équilibre entre les kinases / PTP-1B qui agit dans la paroi aortique, dans le cas du diabète de type I.**

6. L'obésité, ainsi que l'obésité associée à diabète de type II influence l'expression protéique des molécules associées à la signalisation de l'insuline. Dans les artérioles du tissu adipeux sous-cutané, l'obésité induit une régulation négative des molécules de signalisation d'insuline. Ce processus est ralenti dans le cas de l'obésité associée avec le diabète de type II.

L'originalité de l'étude consiste: **J'en ai conclu que dans les deux patients obèses et obèses associés aux patients diabétiques de type II, les artérioles du tissu adipeux sous-cutané ont montré des changements dans l'expression des molécules de signalisation de l'insuline dans les deux maladies importantes.**

Le déséquilibre dans l'hyperglycémie induite par événements de la phosphorylation / déphosphorylation sont accompagnés de plusieurs oxydations réversibles et irréversibles qui peuvent interférer au diabète associé dysfonctionnement vasculaire de la paroi aortique. Utilisation PTP antioxydants ainsi que les inhibiteurs pourraient inverser les changements survenus dans les cellules musculaires lisses ou des cellules endothéliales et qui peuvent améliorer la fonction vasculaire. Envisage donc de PTP cibles thérapeutiques apporterait de nouveaux éléments dans la physiopathologie cardiovasculaire.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Marrero, M.B. Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascul Pharmacol.* 2005; **43**: 307–309
2. Choi, K. And Kim, Y.-B., Molecular Mechanism of insulin Resistance in Obesity and type 2 Diabetes. *Korean J Intern Med.* 2010; **25**: 119-129

LISTE DES PUBLICATIONS:

Articles publiés dans des revues indexées ISI avec facteur d'impact

1. Popov Doina, **Nemecz Miruna**, Dumitrescu Madalina, Georgescu Adriana, Böhmer Frank D. Long-term high glucose concentration influences Akt, ERK1/2, and PTP1B protein expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(1):51-55, 2009 (IF: 2.64)

2. Adriana Georgescu, Doina Popov, Anamaria Constantin, **Miruna Nemecz**, Nicoleta Alexandru, Daniel Cochior, Aura Tudor. Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clinical Science*, 120(10): 463-472; 2011 (IF: 4.2)- premiat in 2011

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, **Miruna Nemecz**, Irina Titorencu, Doina Popov. Enoxaparin reduces adrenergic contraction of resistance arterioles in aging and in aging associated with diabetes via engagement of MAP kinase pathway. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 22(4): 310:316, 2011 (IF: 1.4)-premiat in 2011

Articles publiés dans des revues indexées pour la base de données internationale

Miruna Nemecz, Doina Popov, Adriana Georgescu. Phosphorylation/dephosphorylation signaling events in the aorta of streptozotocin-injected Golden Syrian Hamsters. *Annals of RSCB*, vol XV, issue 1, 28-34, 2010, edited by A. Ardelean et. al. (indexat CNCSIS B+)

Les résumés présentés lors de réunions internationales

1. Microparticles as potential markers in venous insufficiency. A. Georgescu, N. Alexandru, H. Maniu, **M. Nemecz**, D. Popov in *Book of Abstracts* , at *Romanian Society for Cell Biology at 25 years-Aniversary Workshop: "From Basic Science to Therapeutic Applications"*. p.4, 2007, Bucharest, Romania

2. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemecz**, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, in *Journal of Vascular Research*, vol. 45, supplements 2, p.146, at "25th Conference of the European Society for

Microcirculation: Integrating Vascular Biology & Medicine Basic and Clinical Science, August 26-29, 2008, Budapest, Hungary

3. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemezc**, Eugen Andrei, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila, Maya Simionescu. Elevated level of circulating microparticles in chronic venous insufficiency. *in Book of Abstracts*, p. 31, at Biomedicine Workshop "From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research", September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

4. Adriana Georgescu, Nicoleta Alexandru, Doina Popov, Manuela Amuzescu, **Miruna Nemezc**, Constantin Zamfir, Horia Maniu, Adrian Badila. Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles. *Journal of Clinical Lipidology*, vol. 2, no. 5S, p. 64-67- at 7th International Symposium on "MULTIPLE RISK FACTORS IN CARDIOVASCULAR DISEASES – Prevention and Intervention – Health Policy", October 22-25, 2008, Venice, Italy

5. **M. Nemezc**, A. Georgescu, D. Popov. Protein Tyrosine Phosphatase 1B expression in the smooth muscle cells in aorta in hyperglycemia conditions, at "Biomedicine Workshop, From fundamental research to therapeutic applications", "Conference, Diaspora in Romanian Sciences Research", September 17-18, 2008, Bucharest, Romania

6. A. Georgescu, N. Alexandru, D. Popov, M. Amuzescu, E. Andrei, **M. Nemezc**, C. Zamfir, A. Badila, M. Simionescu. Elevation of endothelial and platelet microparticles in patients with chronic venous insufficiency, at XXII Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, July 11-16, 2009, Boston, USA

7. L-D. Popov, **M. Nemezc**, M. Dumitrescu, A. Georgescu, F. D. Böhmer. Long time culture of human aortic smooth muscle cells in high glucose concentration up-regulates ERK1/2 activation and PTP1B protein expression, at 45th EASD Annual Meeting, Vienna, Austria, 29.09.2009-02.10.2009, published in *Diabetologia*, 52, Suppl. 1, p.S515, no. 1336, 2009

8. **Miruna Nemezc**, Adriana Georgescu, Doina Popov. Influence of antioxidants on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose, in *Bulletin of Romanian Society for Cell Biology*, p. 91, no.39, at The 3rd International Congress and 29th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology, June 8-12, 2011, Arad-Szeged, Romania-Hungary

9. Miruna Nemezc, Adriana Georgescu, Doina Popov. The effect of antioxidants on high glucose and platelet derived growth factor stimulated human vascular smooth muscle cells. *'Inflammation and Cardiovascular Disease" Summer School*, Obergurgl, Austria, September 29 - October 2, 2011

10. Adriana Georgescu, **Miruna Nemezc**, Nicoleta Alexandru, Aura Tudor, Daniel Cochior, Doina Popov. Dysfunction of Human Subcutaneous Fat Arterioles in Obesity Alone or Obesity Associated with Type 2 Diabetes, at *'4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group'*, October 27–29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.37.

11. M. Nemezc, A. Georgescu, D. Popov, M. Simionescu. Influence of catalase and superoxide dismutase on human vascular smooth muscle cells grown in high glucose. at *'4th Annual Meeting of the Diabetes and Cardiovascular Disease EASD Study Group'*, October 27-29, 2011, Munich, Germany, Book of Abstracts, p.33

Les résumés présentés lors des réunions nationales

1. A. Georgescu, N. Alexandru, M. Amuzescu, **M. Nemezc**, C. Zamfir, H. Maniu, A. Badila, D. Popov. Insuficienta venoasa cronica este asociata cu un nivel crescut de microparticule circulante/ Chronic venous insufficiency is associated with elevated level of circulating microparticles, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 50/p. 50, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology* , 12-15 iunie 2008/ June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania

2. Miruna Nemezc, Adriana Georgescu, Doina Popov. Expresia protein tirozin fosfatazei 1B in celulele musculare netede si aorta in conditii de glucoza crescuta/The expression of protein tyrosine phosphatase 1B in smooth muscle cells and aorta in hyperglycemia conditions, *in Buletinul SNBC/ in Bulletin of Romanian Society for Cell Biology* , pag . 52/p.52, nr.36/no.36, *la a XXVI-A Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Nationale de Biologie Celulara/ at The 26th Annual Scientific Session of Romanian Society for Cell Biology*, 12- 15 iunie/June 12-15, 2008, Cluj-Napoca, Romania