

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

MENTION TRES HONORABLE
avec les félicitations du jury,
avec avis favorable pour l'échange
avec les Universités et les
Facultés étrangères
et proposition au prix de thèses.

Année 2003

N° 99 57/03

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en : ENDOCRINOLOGIE, MALADIES METABOLIQUES ET NUTRITION

par

Bertrand CARIOU

né le 27/12/1972 à Montereau Fault-Yonne

Présentée et soutenue publiquement le 31 octobre 2003

***Etude de l'expression des adaptateurs moléculaires
Grb14 et ZIP dans le diabète de type 2.***

Président : Monsieur le Professeur Bernard CHARBONNEL
Directeur de Thèse : Madame le Dr Anne-Françoise BURNOL

BU Santé
Nantes

ABREVIATIONS

- α 2-HSG** : α 2-Heremans Schmid glycoprotein
- ACC** : acétyl-CoA carboxylase
- AMPc** : adénosine mono-phosphate cyclique
- APS** : adapter protein containing a PH and SH2 domain
- ATP** : adénosine tri-phosphate
- BPS** : Between the PH and SH2
- CAP** : Cbl-associated protein
- CBP** : CREB-binding protein
- CHO** : chinese hamster ovary
- CORT** : cloning of receptor target
- CREB** : cAMP response element binding protein
- EGF** : Epidermal growth factor
- ERK** : extra-cellular regulated kinases
- FAS** : fatty-acid synthase
- Gab-1** : Grb2 associated binder-1
- G6P** : Glucose-6-phosphate
- G6Pase** : Glucose-6-phosphatase
- GK** : Goto-Kakizaki
- GLUT** : Glucose transporter
- GM** : Grb/Mig
- GS** : glycogen synthase
- GSK-3** : glycogen synthase kinase-3
- Grb** : Growth-factor receptor bound protein
- IGF-1** : insulin-like growth factor
- IKK β** : IkappaB kinase béta
- IL-1** : interleukine-1
- IRS** : insulin receptor substrate
- JAK** : Janus Kinase
- JNK** : c-Jun N-terminal kinases
- LAP** : Liver-enriched transcriptional activation protein
- LAR** : Leukocyte antigen-related
- LIP** : Liver-enriched transcriptional inhibitory protein
- MAP kinase** : mitogen-activated protein kinase
- MEK** : MAP kinase/ERK kinase
- mTOR** : mammalian target of rapamycine
- Nedd4** : Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4
- PB1** : Phox and Bemp1
- PC-1** : Plasma Cell differentiation antigen 1

PCR : polymerase chain reaction
PDK-1 : PI_(3,4,5)P3-dependent protein kinase-1
PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC-1 : PPAR gamma coactivator-1
PH : pleckstrin homology
PKB (Akt) protéine kinase B
PKC ζ : protein kinase C zeta
PI 3-kinase : phosphatidylinositol-3 kinase
PIP₂ : phosphatidylinositol 3,4-biphosphates
PIP₃ : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphates
PIR : phosphorylated insulin receptor interacting region
PP-1 : protéine phosphatase-1
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
PTB : phosphotyrosine binding
PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PTG : Protein targeting to glycogen
PTP-1B : protéine tyrosine phosphatase-1B
RA : Ras-associated domain
RTK : récepteur à activité tyrosine kinase
Shc : Src homology collagen
SH2 : Src homology domain 2
SH3 : Src homology domain 3
SHIP-2 : SH2-containing inositol 5'-phosphatase-2
SOCS : suppressor of cytokine signaling
SOS : son of sevenless
SREBP-1c : Sterol regulatory element binding protein-1c
STAT : Signal
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TZD : thiazolidinedione
UBA : ubiquitin associated domain
UDPG : uridine diphosphate glucose
ZIP : PKC zeta interacting protein

SOMMAIRE

I – AVANT-PROPOS	3
II – INTRODUCTION	5
1 : La signalisation moléculaire du récepteur de l'insuline	5
1-a : Activation du récepteur de l'insuline	5
1-b : Les substrats du récepteur de l'insuline	7
1-b-1 : Les IRSs	
1-b-2 : Shc	
1-c : Les effecteurs intracellulaires de l'insuline	9
1-c-1 : La voie de la PI-3 Kinase	
1-c-2 : La voie des MAP kinases	
2 : Les actions cellulaires de l'insuline	12
2-a : Le transport de glucose	13
2-b : La synthèse de glycogène	16
2-c : La production hépatique de glucose	17
3 : Les mécanismes de régulation négative du signal de l'insuline	18
3-a : Les tyrosines phosphatases	19
3-b : Les lipides phosphatases	20
3-c : La phosphorylation sur sérine d'IRS-1	22
3-d : Endocytose, ubiquitination, dégradation	23
3-e : Les protéines inhibitrices	24
4 : Grb14 : un nouveau partenaire du récepteur de l'insuline	28
4-a : Les adaptateurs de la famille de Grb7	28
4-a-1 : Structure	
4-a-2 : Expression	
4-a-3 : Localisation subcellulaire	
4-a-4 : Partenaires de liaison	
4-b : Rôle de Grb14 la transduction du signal de l'insuline	32

- 4-b-1 : Liaison de Grb14 au récepteur de l'insuline
- 4-b-2 : Grb14 : un inhibiteur endogène du récepteur de l'insuline
- 4-b-3 : Identification d'un nouveau partenaire de Grb14 : la protéine ZIP

III – MATERIEL ET METHODES	42
1 : Animaux	42
2 : Patients diabétiques de type 2 et sujets témoins	43
3 : Analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel par la méthode SYBR Green en lightCycler	44
4 : Analyse de l'expression des protéines par Western blot	46
5 : Culture cellulaire	47
6 : Statistiques	48
IV – RESULTATS	49
1 : Expression de Grb14 et ZIP dans les tissus insulino-sensibles des souris <i>ob/ob</i> et des rats Goto-Kakizaki	49
2 : Expression de Grb14 et ZIP dans le tissu adipeux et le muscle des diabétiques de type 2	50
3 : Régulation de l'expression de Grb14 et ZIP dans la lignée adipocytaire 3T3-F442A	51
4. Effet des thiazolidinediones sur l'expression de Grb14	52
4-a : <i>In vitro</i> dans les adipocytes 3T3-F442A	
4-b : <i>In vivo</i> chez la souris <i>ob/ob</i>	
V – DISCUSSION	55
VI – CONCLUSION ET PERSPECTIVES	61
VII – BIBLIOGRAPHIE	63

I – AVANT-PROPOS

La prévalence et l'incidence du diabète de type 2 ne cessent d'augmenter dans les pays développés, faisant de cette maladie une des principales menaces pour la santé publique au 21^{ème} siècle (Zimmet 2000). On dénombre actuellement environ 150 millions de diabétiques à travers le monde, dont plus de 90% de diabétiques de type 2. Au rythme actuel, les prévisions pour 2010 font état d'une augmentation de 46% du nombre de cas, soit 221 millions de personnes qui seront concernées par cette épidémie de diabète (Zimmet *et al* 2001). De manière parallèle, la prévalence de l'obésité s'accroît dans les mêmes proportions suggérant l'existence de mécanismes communs à ces deux maladies, récemment regroupées sous le terme de « diabésité » (Astrup & Finer 2000). Cette augmentation préoccupante est essentiellement secondaire à des facteurs environnementaux et comportementaux, tels que la généralisation d'un mode de vie sédentaire et une alimentation trop riche. Dans certains groupes ethniques, la préexistence d'un génotype d'épargne (« thrifty genotype »), initialement sélectionné pour faire face à des périodes de restriction alimentaire, favorise actuellement l'émergence du diabète de type 2 dans une société de surconsommation.

La gravité du diabète de type 2 est liée au développement de complications microangiopathiques et surtout macroangiopathiques qui sont à l'origine d'un excès de morbidité et de mortalité. En effet, cette maladie s'accompagne d'une surmortalité cardiovasculaire et représente la première cause de cécité, d'insuffisance rénale terminale et d'amputation non traumatique de jambe dans les pays industrialisés. Plusieurs études épidémiologiques suggèrent fortement que le risque de complications dégénératives, notamment cardiovasculaires, survient bien avant l'apparition d'un diabète clinique. Ainsi l'intolérance au glucose, qui toucherait 200 millions de personnes dans le monde, s'accompagne d'une augmentation de l'incidence de l'athérosclérose. Ceci est également vrai pour le syndrome métabolique (ou syndrome X), et est en partie la conséquence d'une augmentation de la fréquence des facteurs de risque cardiovasculaire associés

(dyslipidémie, hypertension artérielle, troubles de la coagulation et obésité viscérale) (Haffner *et al* 1990).

L'ensemble de ces pathologies semble partager une base physiopathologique commune : l'insulinorésistance. Cette dernière est définie comme l'incapacité des tissus cibles de l'insuline à répondre normalement à des concentrations physiologiques d'insuline. Elle est principalement responsable d'une diminution du captage de glucose au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux, ainsi que d'une augmentation de la production hépatique de glucose. En réponse à cette résistance à l'action de l'hormone, les cellules béta du pancréas augmentent leur sécrétion d'insuline pour maintenir l'euglycémie. Cependant, une carence insulinosécrétoire progressive s'installe conduisant à l'intolérance au glucose puis au diabète de type 2. Décrypter les mécanismes moléculaires de cette résistance à l'action de l'insuline représente donc une étape indispensable à une meilleure compréhension de la physiopathologie du diabète de type 2 et au développement de nouvelles thérapeutiques.

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons tout particulièrement à une protéine nouvellement impliquée dans la signalisation de l'insuline : Grb14. Grb14 est un adaptateur moléculaire qui se lie directement au domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline activé et inhibe son activité catalytique, se comportant comme un inhibiteur endogène de la transduction du signal de l'insuline (Cariou *et al* 2003). L'objectif de ce travail est d'étudier l'expression de Grb14 dans les tissus cibles de l'insuline en cas de diabète de type 2, afin de préciser son rôle dans la physiopathologie de l'insulinorésistance.

II – INTRODUCTION

1 : La signalisation moléculaire du récepteur de l'insuline

L'insuline exerce ses effets biologiques en se liant à son récepteur qui appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Une fois activé par trans-phosphorylation, le récepteur de l'insuline phosphoryle des substrats sur de nombreux résidus tyrosines, créant des sites de reconnaissance et d'ancrage pour des protéines à domaine SH2 (Src Homology domain 2). Ces protéines vont ensuite initier des cascades d'interactions protéine-protéine et de phosphorylations-déphosphorylations sur des résidus sérines et thréonines, conduisant aux effets mitogéniques et métaboliques de l'hormone (Virkamäki *et al* 1999, Saltiel & Kahn 2001).

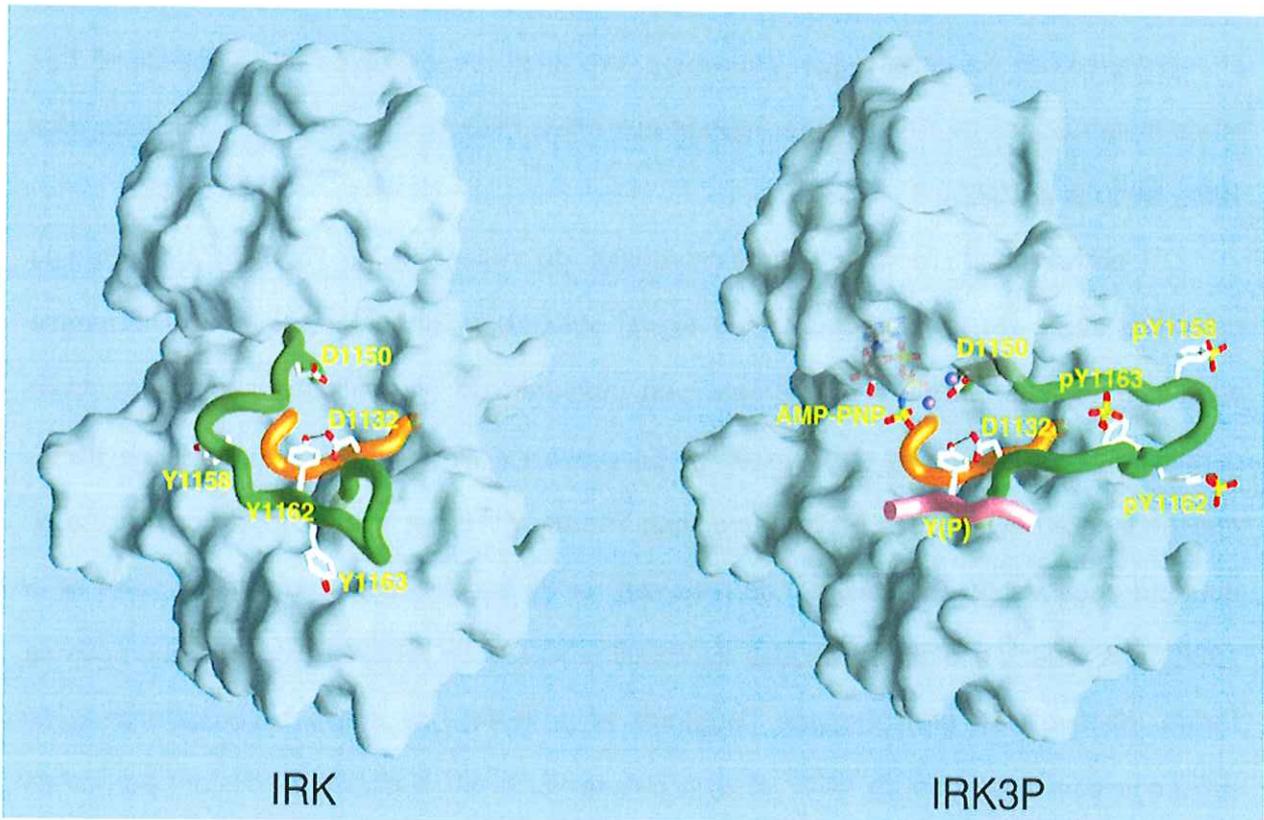
1-a : Activation du récepteur de l'insuline

Les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1) appartiennent à la même sous-classe de RTKs. Ils ont la spécificité d'être constitutivement dimérisés, alors que les autres RTKs ne se dimérisent ou ne s'oligomérisent qu'après la fixation de leur ligand (De Meyts & Whittaker 2002). Ce sont des protéines hétérotétramériques, constituées de deux sous-unités α et de deux sous-unités β ($\alpha_2\beta_2$) reliées entre elles par des ponts disulfures. La sous-unité α est entièrement extracellulaire et possède le site de liaison à l'insuline. La sous-unité β est subdivisée en 3 régions : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. La région intracellulaire comprend le domaine tyrosine kinase (acides aminés 968-1243) qui contient le site de liaison à l'ATP (lysine 1018), ainsi que le domaine catalytique du récepteur. Le domaine juxtamembranaire comprend trois résidus tyrosines (Y 953, Y960 et Y972), qui sont des sites potentiels de trans-phosphorylation. La tyrosine 960 est notamment impliquée dans la liaison des IRSs (Insulin Receptor Substrate) et de Shc (Src homology collagen), jouant un rôle majeur dans la transduction du signal de l'insuline

(White *et al* 1988, Yonezawa *et al* 1994). Le domaine C-terminal de la sous-unité β contient également deux résidus tyrosines (Y1316 et Y1322), qui pourraient être impliqués dans la régulation de l'activité tyrosine kinase du récepteur (Tennagels *et al* 2000). Le récepteur de l'IGF-1 a une identité de séquence avec le récepteur de l'insuline qui varie de 41% à 84% et qui est maximale pour le domaine tyrosine kinase (Virkamäki *et al* 1999). En revanche, les deux récepteurs diffèrent dans leur région cytoplasmique C-terminale. Les résidus phosphotyrosines de cette région pourraient être ainsi responsables de la spécificité des effets métaboliques de l'insuline par rapport aux effets mitogéniques de l'IGF-1 (Takata *et al* 1991, Ando *et al* 1992).

L'activation du domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline constitue la première étape de la transduction du signal insulinique dans la cellule. En l'absence d'insuline, les sous-unités α exercent une inhibition de type allostérique sur l'activité catalytique portée par les sous-unités β . En présence d'insuline, le récepteur se trans-phosphoryle au niveau des résidus tyrosines Y1146, Y1150 et Y1151 de la boucle kinase, qui sont critiques pour l'activation du récepteur et de ses fonctions biologiques (Ellis *et al* 1986). Les études cristallographiques du domaine kinase du récepteur de l'insuline sous sa forme inactive non phosphorylée (Hubbard *et al* 1994), ou active triphosphorylée, en présence d'un analogue de l'ATP et d'un pseudo-substrat (Hubbard 1997), ont permis de décrypter le mécanisme de cette activation. La liaison de l'insuline sur son récepteur provoque des changements conformationnels dans lesquels les sites de liaison de l'ATP et des substrats sont rendus accessibles et les résidus critiques du site actif correctement positionnés. Ainsi, le résidu tyrosine Y1151 phosphorylé par trans-phosphorylation, interagit par une liaison hydrogène avec le résidu aspartate R1143 situé au début de la boucle kinase, la stabilisant dans une position ouverte. De plus, des expériences de cartographie des sites de trans-phosphorylation ont montré que le résidu Y1151 était le dernier des trois résidus tyrosines du site actif à être phosphorylé (Wei *et al* 1995). Ces données sont en accord avec un mécanisme graduel d'activation dans lequel chaque événement de phosphorylation participe à la stabilisation de la conformation active de la boucle, avec une

Schéma 1 : Cristallographie du domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline



**Domaine tyrosine kinase inactif,
non phosphorylé.**

**Domaine tyrosine kinase actif,
triphosphorylé.**

La boucle régulatrice est représentée en vert, la boucle catalytique en orange, et le peptide substrat en rose. Les atomes de carbone sont représentés en blanc, les atomes d'azote en bleu, et les atomes de phosphore en jaune. Les résidus tyrosines 1158, 1162 et 1163 correspondent respectivement aux résidus tyrosines 1146, 1150, 1151, dans la nomenclature utilisée dans ce mémoire.

Schéma issu de Hubbard *et al.*, 1997

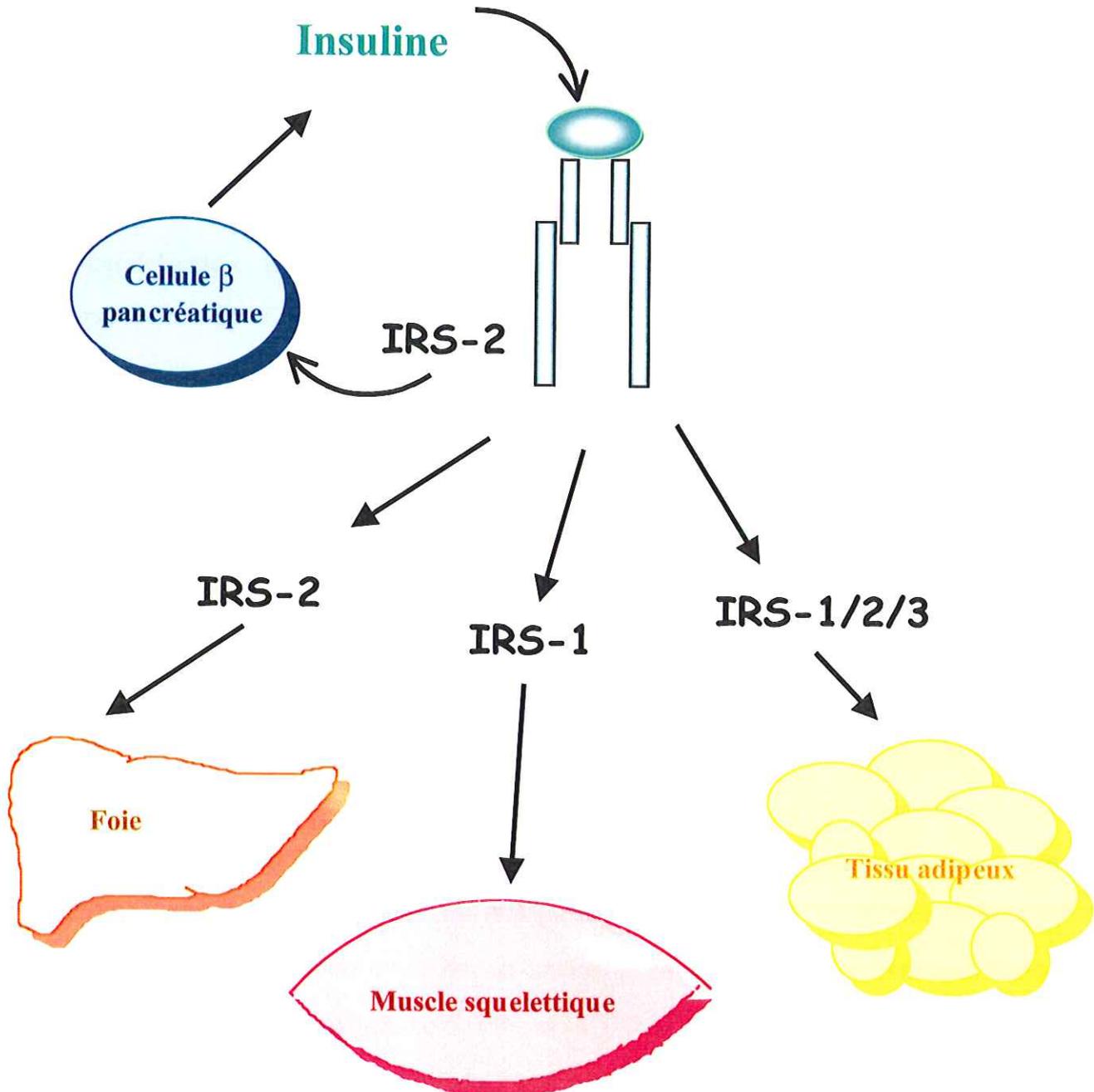
activation complète uniquement après phosphorylation du résidu Y1151 (Hubbard 1997). Dans cette conformation ouverte, le récepteur peut ensuite phosphoryler les peptides substrats (**Schéma 1**).

1- b : Les substrats du récepteur de l'insuline

Contrairement à la majorité des RTKs, le récepteur de l'insuline ne s'associe pas de façon directe avec les nombreux effecteurs intracellulaires, mais recrute et phosphoryle sur des résidus tyrosines des protéines d'ancrage, appelées aussi « plateformes », responsables ensuite de la formation de complexes multi-protéiques. Ces assemblages moléculaires nécessitent la présence de plusieurs domaines conservés d'interaction protéine-protéine et protéine-lipides (Virkamäki *et al* 1999). Les mieux caractérisés dans la signalisation de l'insuline sont les domaines PH (Pleckstrin Homology), PTB (PhosphoTyrosine Binding), SH2 et SH3 (Src Homology 3). Les domaines PH se lient aux phospholipides et jouent un rôle dans la localisation des effecteurs aux membranes cellulaires (Gibson *et al* 1994). Les domaines PTB reconnaissent des résidus phosphotyrosines dans un motif NPXpY (Asn-Pro-X-PhosphoTyr), présent sur plusieurs RTKs et notamment sur le récepteur de l'insuline (Gustafson *et al* 1995). Les domaines SH2, se lient également à des résidus phosphotyrosines. Ils sont constitués d'une centaine d'acides aminés et comportent une poche de liaison aux résidus phosphotyrosines hautement conservée, comprenant la séquence FLVRES qui est la signature des domaines SH2. Les acides aminés présents en C-terminal du résidu phosphotyrosine participent à la spécificité de liaison des domaines SH2 (Pawson *et al* 2001, Songyang & Cantley 1995). Les domaines SH3 reconnaissent des motifs riches en résidus prolines, avec le site consensus XPxXP où X est un résidu à chaîne latérale aliphatique.

Au moins onze substrats intracellulaires de l'insuline ont été identifiés jusqu'à présent. Les protéines IRSs comptent six membres (IRS-1 à IRS-6) et on dénombre trois isoformes de Shc (ShcA, B et C). Parmi les autres substrats, on retrouve les protéines Gab-1

Schéma 2 : Spécificité d'action des IRSs



(Grb2 associated binder-1), APS (Adapter protein containing a PH and SH2 domain), p62^{dok}, et le proto-oncogène Cbl (Saltiel & Kahn 2001).

1-b-1 : Les IRSs

Les six membres de la famille des IRSs possèdent une structure commune très conservée, constituée d'un domaine PH N-terminal, d'un domaine PTB, situé immédiatement en C-terminal du domaine PH, qui est impliqué dans la liaison à la phosphotyrosine 960 du domaine juxtamembranaire du récepteur de l'insuline, et d'un long domaine C-terminal moins conservé, qui possède de nombreux sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine permettant le recrutement de protéines à domaine SH2 (White 1997). Néanmoins, ces protéines présentent des différences entre-elles, concernant leur distribution tissulaire, leur localisation cellulaire, leur cinétique d'activation, ainsi que le recrutement des effecteurs intra-cellulaires. Les résultats de l'inactivation des gènes d'IRS-1 et IRS-2 chez la souris ont permis d'avancer dans la compréhension du rôle respectif de ces deux effecteurs dans le contrôle de l'action de l'insuline. Alors que les deux effecteurs sont impliqués dans le contrôle de l'action périphérique de l'insuline, IRS-2 joue un rôle crucial dans le développement de la masse des cellules β et dans la mise en place de l'hyperinsulinémie compensatrice. Par ailleurs, il semble qu'IRS-1 soit l'effecteur prépondérant de l'action de l'insuline dans le muscle et qu'IRS-2 le soit dans le foie (Kido *et al* 2000) (**Schéma 2**). Actuellement, le rôle des autres IRSs (3-6) n'est pas encore élucidé.

1-b-2 : Shc

Les protéines Shc (Src homology 2/ α -collagen-related) désignent l'autre grande famille de substrats du récepteur de l'insuline. Trois gènes *shc* ont été identifiés chez les mammifères (*shc*, *rai* et *sli*) codant pour les trois protéines ShcA, ShcB, et ShcC (Luzi *et al* 2000). Les protéines de la famille Shc sont constituées d'un domaine PTB N-terminal, d'une région centrale riche en résidus glycines et prolines appelée CH1, qui contient des sites de phosphorylation sur des résidus tyrosines, et d'un domaine SH2 C-terminal. Les domaines

PTB de Shc et IRS-1 ne présentent que très peu de similitudes de séquence, mais l'analyse cristallographique révèle qu'ils possèdent la même structure tridimensionnelle (Zhou *et al* 1995). Ces deux domaines PTB se lient au niveau du même résidu tyrosine (Y960), ce qui laisse suggérer une compétition entre ces deux substrats pour la liaison au récepteur de l'insuline. L'interaction de l'une ou l'autre de ces protéines pourrait alors dépendre de leurs niveaux d'expression relatifs ou de leur localisation subcellulaire. Shc est essentiellement impliquée dans le contrôle des effets mitogéniques de l'insuline (Pellici *et al* 1992). En effet, le recrutement du complexe Grb2-SOS à la membrane, permet l'activation de la protéine Ras et l'initiation de la cascade de phosphorylations conduisant à l'activation des MAP kinases. La mutation du résidu tyrosine Y317 de Shc entraîne une inhibition de la voie des MAP kinases et des effets mitogéniques de l'insuline dans des cellules fibroblastiques de rat, confirmant le rôle majeur de Shc dans les effets de l'hormone (Ishihara *et al* 1997a).

1-c : Les effecteurs intra-cellulaires

1-c-1 : La voie de la PI 3-Kinase

Les PI 3-kinases de classe 1a sont des lipides kinases qui catalysent la phosphorylation de phosphoinositides en position D3 pour produire des phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphates (PIP₃) et des phosphatidylinositol 3,4-biphosphates [PI(3,4)P₂] (Shepherd *et al* 1998). L'insuline stimule l'activité de la PI 3-kinase et la production de PIP₃ *in vivo*. L'augmentation de la concentration des PIP₃ dans un compartiment cellulaire précis active alors plusieurs voies de signalisation impliquées dans les effets métaboliques de l'insuline. Sur le plan structural, les PI 3-kinases de classe 1a sont des protéines hétérodimériques constituées d'une sous-unité catalytique p110 et d'une sous-unité régulatrice p85. Contrairement aux autres RTKs, le récepteur de l'insuline ne semble pas recruter directement la PI-3 kinase. En effet, l'activation de la PI 3-kinase se fait *via* l'interaction des domaines SH2 de la sous-unité p85 avec des résidus phosphotyrosines au sein de motifs pYMXM et pYXXM portés par les protéines IRSs (Myers *et al* 1992).

L'activation maximale est obtenue lorsque les deux domaines SH2 de la sous-unité p85 sont recrutés par IRS-1 (Backer *et al* 1992). Cette interaction permet la translocation de la PI 3-kinase vers la membrane, à proximité de ses substrats, et la levée d'inhibition de la sous-unité p85 sur l'activité catalytique portée par la sous-unité p110 (Vivanco & Sawyers 2002). Par ailleurs, la spécificité d'action du pool de PI 3-kinase recruté par l'insuline pourrait être liée à sa localisation cellulaire particulière, elle-même déterminée par les IRSs (Shepherd *et al* 1998).

Les PIP₃ régulent trois grandes classes d'effecteurs : les sérine/thréonine kinases de la famille AGC (proteine kinase A/cGMP-dependent protein kinase/protein kinase C), les petites protéines G de la famille Rho et les tyrosines kinases de la famille TEC. La PI 3-kinase active également la voie de signalisation impliquant mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), et pourrait réguler l'activité de la phospholipase D (Saltiel & Kahn 2001). Les PIP₃ agissent en se liant au domaine PH de ces effecteurs, modifiant ainsi leur activité catalytique et/ou leur localisation subcellulaire (Lietzke *et al* 2000). Parmi les effecteurs de la PI 3-kinase, la protéine Akt, également appelée protéine kinase B (PKB), a un rôle central dans le contrôle des effets métaboliques de l'insuline (Whiteman *et al* 2002). Akt est une sérine/thréonine kinase de la famille AGC, possédant un domaine PH qui interagit directement avec les PIP₂ et les PIP₃ (Chan *et al* 1999). Trois isoformes de la protéine ont été identifiées chez les mammifères : Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) et Akt3 (PKB γ). Akt2 est l'isoforme majeure activée par l'insuline au niveau du foie et du muscle squelettique. L'insuline stimule également l'activation d'Akt1 et d'Akt2 dans les adipocytes, alors qu'elle n'a aucun effet sur l'activation d'Akt3 dans les tissus cibles de l'hormone (Walker *et al* 1998). Bien que les PIP₂ et les PIP₃ s'associent à Akt, ils n'activent pas directement la kinase (Alessi *et al* 1997). En réponse à l'insuline, la liaison d'Akt aux phosphoinositides permet son ciblage à la membrane où elle est phosphorylée et activée par la kinase PDK-1 (PI_(3,4,5)P3-Dependent protein Kinase-1) (Alessi *et al* 1997). Ainsi, les PIP₃ agiraient surtout en favorisant la co-localisation membranaire d'Akt et de PDK-1, rapprochant ainsi la kinase et son substrat (Shepherd *et al* 1998). De plus, un mutant d'Akt ciblé à la membrane est phosphorylé dans

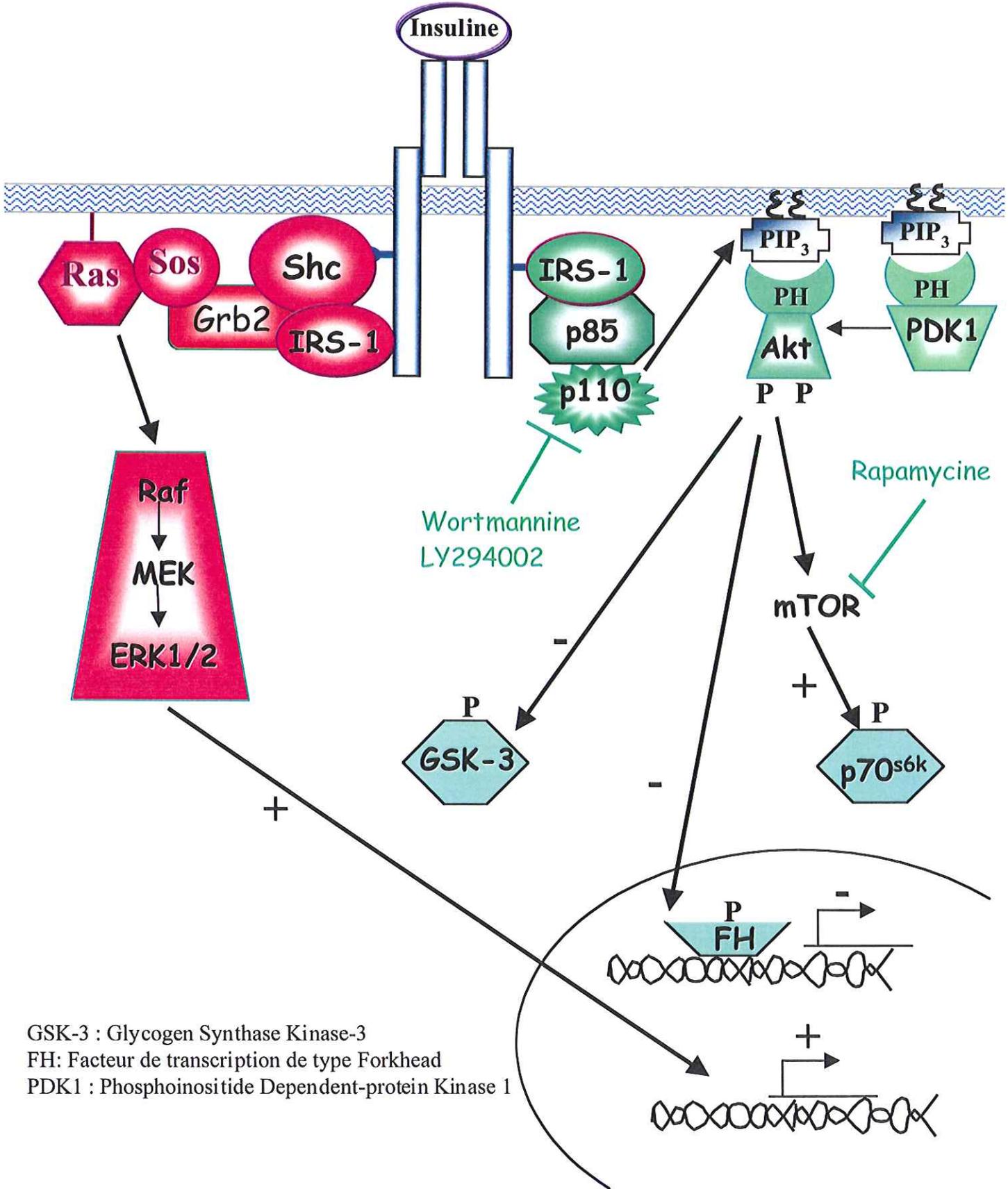
les cellules non stimulées, confirmant le rôle du ciblage à la membrane d'Akt dans son activation (Kohn *et al* 1996, Hajdуч *et al* 1998). Une fois activée, Akt se détache de la membrane et phosphoryle différents substrats situés dans le cytoplasme ou le noyau, tels que la GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3), ou des facteurs de transcription de type Forkhead ou CREB (cAMP response element binding protein) (Cross *et al* 1995). La GSK-3 est constitutivement activée à l'état basal, et phosphoryle la glycogène synthase (GS) pour la maintenir dans un état inactif. La phosphorylation de la GSK-3 par Akt diminue l'activité de cette dernière, conduisant ainsi à l'augmentation de la synthèse de glycogène par la GS (Cantley 2002). Une fois phosphorylés par Akt, les facteurs de transcription Forkhead (Foxo) sortent du noyau vers le cytoplasme où ils sont retenus par leur interaction avec les protéines 14-3-3, ce qui permet la répression de l'expression de gènes cibles de l'insuline (**Schéma 3**) (Nakae *et al* 1999, Nakae *et al* 2000).

La protéine kinase C ζ est une autre kinase de la famille AGC impliquée dans le contrôle des effets métaboliques de l'insuline (Standaert *et al* 1997). Elle fait partie avec la PKC λ/ι de la famille des PKC atypiques, qui se distinguent des autres PKCs par leur absence de régulation par le calcium et les diacylglycérols (Nakanishi *et al* 1993). Des études *in vitro* et *in vivo* dans des adipocytes de rat ont démontré que les PIP₃ augmentaient l'activation de la PKC ζ (Standaert *et al* 1997, Nakanishi *et al* 1993). Comme nous le verrons plus loin, Akt et la PKC ζ sont toutes deux impliquées dans le transport de glucose insulinosensible.

1-c-2 : La voie des MAP kinases

Les MAP kinases sont des sérine/thréonine kinases activées par une très grande variété de signaux extra-cellulaires. Chez les mammifères, il existe trois grandes classes de MAP kinases. Elles incluent les ERK1 et ERK2, les JNKs (c-Jun N-terminal Kinases) et les p38 MAP kinases. L'insuline stimule préférentiellement les ERKs qui régulent la croissance et la différenciation cellulaire (Boulton *et al* 1991). Cette stimulation a été démontrée *in vivo* dans les tissus insulino-sensibles comme le foie, le muscle et le tissu adipeux (Denton et

Schéma 3: Les voies de signalisation de l'insuline



GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase-3
 FH: Facteur de transcription de type Forkhead
 PDK1 : Phosphoinositide Dependent-protein Kinase 1

Tavare 1995). Les cascades d'activation des MAP kinases sont organisées en une succession de trois protéines kinases : une MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), une MAP Kinase Kinase (MAPKK) et une MAP Kinase. Le signal est transmis par des phosphorylations séquentielles qui activent chaque protéine de la cascade (**Schéma 3**). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la voie Raf (MAPKKK)-MEK (MAPKK)-ERK (MAPK).

L'activation des ERKs implique la phosphorylation sur tyrosines des IRSs et/ou de Shc, qui vont alors interagir avec l'adaptateur Grb2 (Sun *et al* 1993, Pronk *et al* 1993). Grb2 est constitutivement associé au facteur d'échange nucléotidique SOS (Son Of Sevenless) et permet son recrutement à la membrane plasmique (Chardin *et al* 1993, Simon *et al* 1993). La translocation du complexe Grb2-SOS est le principal mécanisme par lequel les facteurs de croissance, dont l'insuline, activent la protéine p21^{Ras} (Ras). Une fois activée, Ras se lie au domaine régulateur de la sérine/thréonine kinase Raf, ce qui permet son recrutement à la membrane et son activation (Moodie *et al* 1993). Raf phosphoryle et active à son tour les protéines MEKs (MAP kinase/ERK Kinase), initiant ainsi la voie des MAP kinases conduisant à l'activation des protéines FRKs (Dent *et al* 1992). Les MEKs phosphorylent à leur tour les protéines ERK1 et ERK2, à la fois sur des résidus thréonines et tyrosines (Crews *et al* 1992). Les ERKs se localisent alors dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription comme Elk1 ou la protéine p62^{TCF}, conduisant les cellules vers un processus de prolifération ou de différenciation (Boulton *et al* 1991). La translocation nucléaire des ERKs est une étape clef des effets mitogéniques de l'insuline (Brunet *et al* 1999), alors que le blocage de cette voie n'a aucun effet sur les actions métaboliques de l'hormone (Lazar *et al* 1995).

2 : Les actions cellulaires de l'insuline

L'insuline est la plus puissante hormone anabolique de l'organisme : elle joue un rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, surtout en période post-prandiale, en

stimulant le captage du glucose dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux et en favorisant son stockage sous forme de glycogène. De plus, elle diminue la production hépatique de glucose en inhibant les voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse. Sur le plan métabolique, cette hormone favorise également le stockage des acides gras sous forme de trigycérides en augmentant la lipogénèse et en diminuant la lipolyse et stimule la synthèse des protéines.

2-a : Le transport de glucose

Chez les mammifères, le transport de glucose est assuré par une famille de transporteurs spécifiques : les GLUTs (Glucose Transporters). Ces transporteurs permettent l'entrée du glucose dans les cellules par diffusion facilitée. On dénombre actuellement 13 membres dans cette famille (GLUT1-12 et HMIT1 [human myo-inositol transporter 1]), les mieux caractérisés étant ceux de la classe I (GLUT1-4). Ils diffèrent les uns des autres par leur distribution tissulaire, leur affinité de liaison pour le glucose ou leur localisation subcellulaire (Kahn & Pessin 2002). Le transporteur GLUT4 est spécifiquement exprimé dans le tissu adipeux et le muscle squelettique, où il assure le transport de glucose en réponse à l'insuline (James *et al* 1988).

A l'état basal, la plupart des molécules de GLUT4 sont localisées dans des compartiments vésiculaires intracellulaires, appelés « vésicules GLUT4 ». Suite à la stimulation par l'insuline, les vésicules GLUT4 fusionnent avec la membrane plasmique par un processus d'exocytose, alors que leur recyclage vers leurs compartiments intracellulaires est faiblement diminué (Slot *et al* 1991, Czech & Buxton 1993). Cette translocation membranaire de GLUT4 permet une entrée massive de glucose dans la cellule et représente l'étape limitante du transport de glucose insulinosensible. Les voies de signalisation conduisant du récepteur de l'insuline à la translocation membranaire de GLUT4 sont multiples, complexes et incomplètement élucidées (**Schéma 4**). L'importance de la voie de la PI 3-kinase a été démontrée par plusieurs approches expérimentales. Il est important de

Schéma 4 :
Voies de signalisation impliquées dans la
translocation de GLUT4 dans les adipocytes

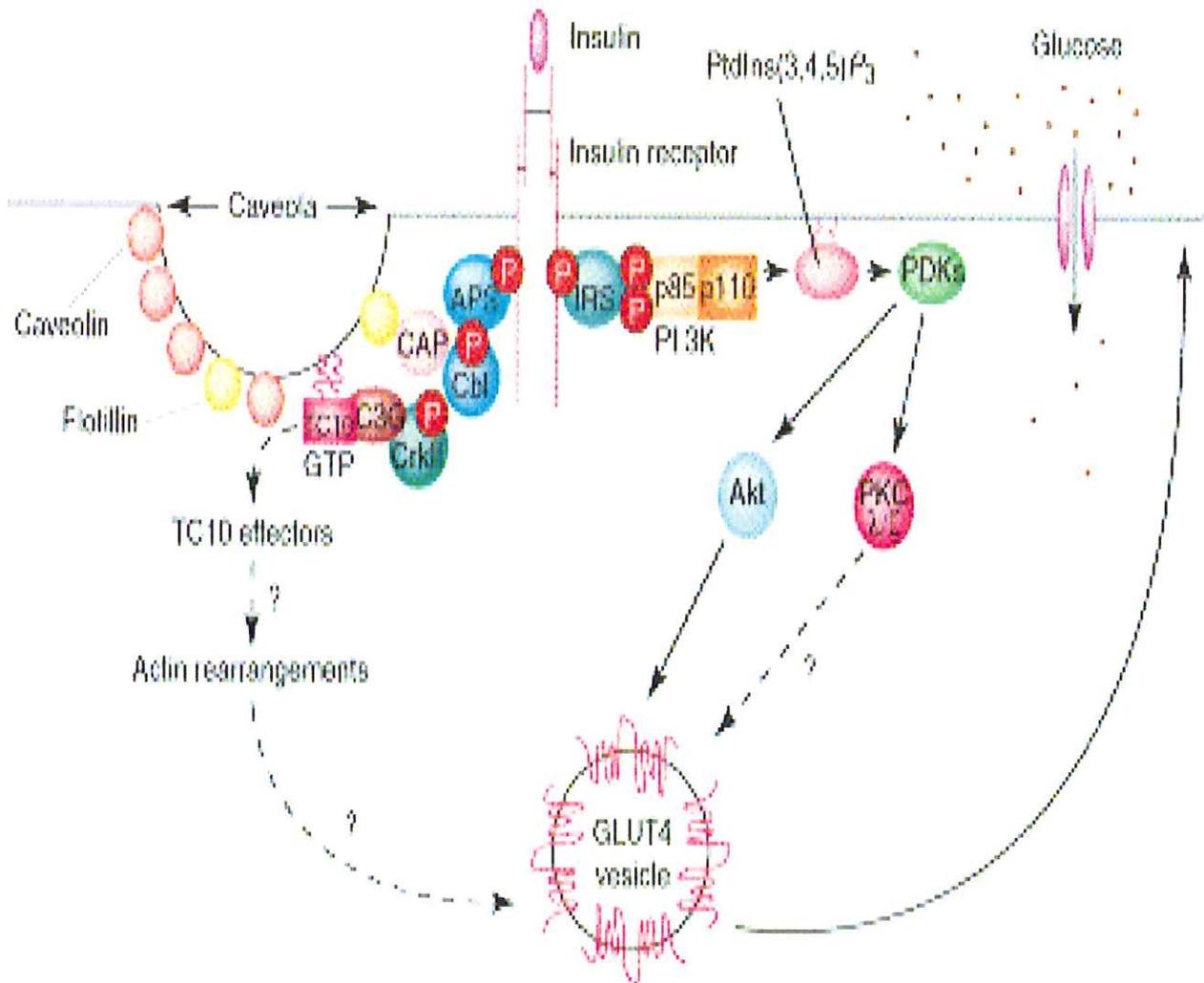


Schéma issu de Whiteman E.L. et al 2002

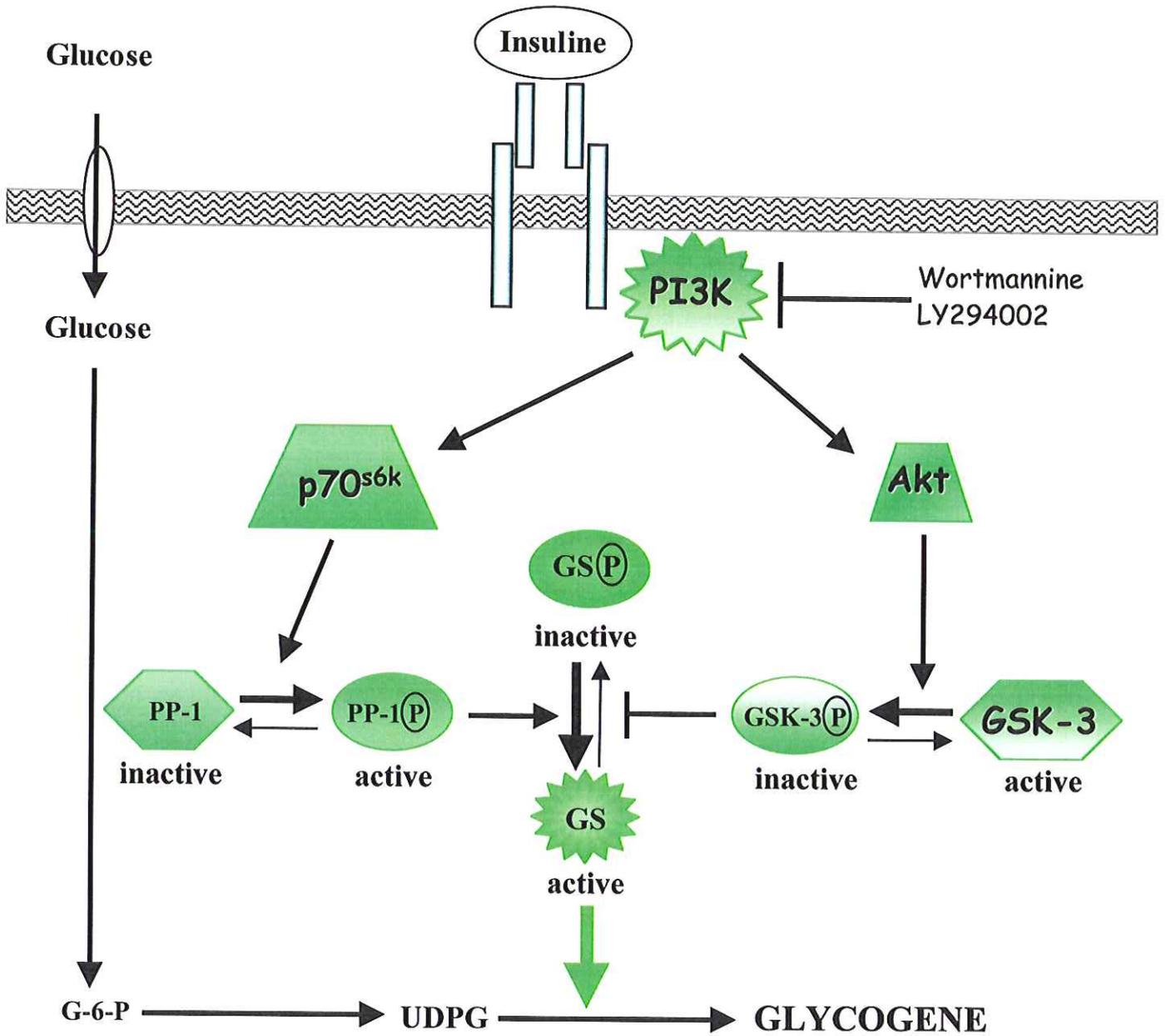
noter que si l'insuline et le PDGF stimulent tous deux l'activité PI 3-kinase, seule l'insuline est en mesure de stimuler le transport de glucose (Ricort *et al* 1996), suggérant que seuls certains pools localisés dans des compartiments cellulaires spécifiques participent à cet effet.

Actuellement, la contribution respective des effecteurs de la PI 3-kinase, Akt et PKC ζ , dans le transport de glucose est controversée. Concernant Akt, les données de la littérature sont contradictoires. En effet, l'utilisation de dominants négatifs d'Akt n'affecte pas (Kitamura *et al* 1998) ou diminue la translocation de GLUT4 (Cong *et al* 1997). Néanmoins, des expériences de surexpression ou de microinjection d'une forme constitutivement active d'Akt mettent en évidence une stimulation du transport de glucose dans des adipocytes et des cellules musculaires L6, même si le délai d'activation est plus long qu'après une stimulation par l'insuline (Kohn *et al* 1996, Hajdich *et al* 1998). Les souris invalidées pour le gène d'Akt2 (PKB β) sont insulino-résistantes et ont des glycémies élevées, surtout à l'état nourri (Cho *et al* 2001). Le phénotype de ces souris Akt2 *-/-* est essentiellement lié à leur incapacité à freiner leur production hépatique de glucose. Le transport de glucose insulinosensible est, quant à lui, modérément diminué au niveau des muscles glycolytiques comme l'EDL (extensor digitorum longus), alors qu'il n'est pas diminué au niveau des muscles oxydatifs comme le soleus. L'ensemble de ces données suggère que d'autres voies de signalisation que celle activant Akt, sont impliquées dans le transport du glucose.

Les PKCs atypiques sont également activées par la PI 3-kinase en réponse à l'insuline et semblent jouer un rôle majeur dans la translocation de GLUT4 (Standaert *et al* 1997). En effet, l'utilisation de mutants dominant négatifs de la PKC ζ et de la PKC λ diminue d'environ de moitié le transport de glucose insulinosensible dans les adipocytes 3T3-L1 (Kotani *et al* 1998) ou les myotubes de rat en culture primaire (Braithwaite *et al* 2001). De plus, la surexpression adénovirale de la PKC ζ *in vivo* dans les muscles de rat augmente le transport de glucose à l'état basal et en réponse à l'insuline (Etgen *et al* 1999). Enfin des études très récentes ont mis en évidence un défaut d'activation de la PKC ζ dans le muscle de sujets diabétiques de type 2 (Beeson *et al* 2003, Kim *et al* 2003).

Bien que l'activation de la PI 3-kinase soit indispensable au transport de glucose insulinosensible, il existe plusieurs arguments en faveur de l'existence de voies de signalisation complémentaires. Ainsi, l'insuline est encore capable d'augmenter le transport de glucose dans des adipocytes surexprimant la sous-unité catalytique p110 constitutivement activée (Frevet *et al* 1997). Cette nouvelle voie pourrait passer par l'adaptateur moléculaire CAP et le proto-oncogène Cbl (**Schéma 4**) (Ribon *et al* 1998, Baumann *et al* 2000). La protéine CAP interagit à la fois avec Cbl et avec la flotilline, une protéine appartenant aux rafts lipidiques. Le rôle de CAP est donc de recruter le proto-oncogène Cbl dans cette structure sub-cellulaire spécifique. Les cavéoles forment un sous-groupe de rafts lipidiques riches en protéines de signalisation. Elles sont particulièrement abondantes dans les adipocytes et le muscle squelettique (Smart *et al* 1999, Watson *et al* 2001). En réponse à l'insuline, Cbl est phosphorylé sur tyrosines, ce qui permet le recrutement au sein des cavéoles de l'adaptateur CrkII par l'intermédiaire de son domaine SH2. CrkII est constitutivement associé au facteur d'échange nucléotidique C3G, qui va catalyser l'activation de la petite protéine G TC10 (Chiang *et al* 2001). L'activation de TC10 provoque la translocation de GLUT4 probablement *via* des modifications du cytosquelette d'actine (Kahn & Pessin 2002). TC10 est activée en réponse à l'insuline et n'est pas inhibée par la wortmanine, confirmant que cette nouvelle voie de signalisation est indépendante de l'activation de la PI 3-kinase. En revanche, TC10 doit être impérativement localisée au sein des cavéoles pour stimuler le transport de glucose (Watson *et al* 2001). De plus, la dissolution des cavéoles par la β -cyclodextrine ou par un mutant dominant négatif de la cavéoline inhibe le transport de glucose en réponse à l'insuline (Watson *et al* 2001, Gustavsonn *et al* 1999). Ainsi, cette compartimentalisation cellulaire pourrait participer à la spécificité de cette cascade de signalisation, sachant qu'elle n'est pas activée par d'autres facteurs de croissance que l'insuline (Watson *et al* 2001). Néanmoins, l'ensemble de ces données a été obtenu *in vitro* dans la seule lignée cellulaire d'adipocytes 3T3-L1. Dès lors, d'autres études (dans le muscle notamment) s'avèrent nécessaires pour préciser l'importance physiologique de cette nouvelle voie de signalisation.

Schéma 5 : Effet de l'insuline sur la synthèse de glycogène



PP-1: Protein Phosphatase-1

GSK-3: Glycogen Synthase Kinase-3

GS : Glycogen Synthase

Ces enzymes peuvent être sous forme phosphorylée ou déphosphorylée et leur niveau de phosphorylation contrôle leur activité catalytique.

2-b : La synthèse de glycogène

L'insuline stimule le stockage du glycogène en augmentant à la fois le transport du glucose et la synthèse de glycogène. Après son entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé par des hexokinases dans le muscle et le tissu adipeux et par la glucokinase dans le foie, pour être converti en glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P peut alors entrer soit dans la voie de la glycolyse soit dans la voie de synthèse du glycogène. Au cours de cette dernière, il est transformé en UDPG (Uridine DiPhosphate Glucose) pour être incorporé dans la molécule de glycogène. Cette incorporation est effectuée par la glycogène synthase (GS), enzyme clef de la synthèse de glycogène. La GS est régulée par des modifications allostériques et des liaisons covalentes (Lawrence *et al* 1999). L'insuline stimule la déphosphorylation de la GS sur des résidus sérines et thréonines, qui se trouve alors sous forme active. Pour cela, elle inhibe la GSK-3 (Cross *et al* 1995) et active la protéine phosphatase 1 (PP-1) (Brady *et al* 1997). Par ailleurs, le G6P permet l'activation allostérique de la GS et augmente la déphosphorylation induite par la PP-1 (**Schéma 5**) (Cadefau *et al* 1997).

Ces effets de l'insuline requièrent l'activation de la PI 3-kinase et de son effecteur Akt. En effet, Akt phosphoryle un résidu sérine sur la GSK-3, ce qui provoque son inactivation. L'activité de la GS est aussi contrôlée par la PP-1 par une voie PI 3-kinase-dépendante (Shepherd *et al* 1998). La PP-1 est une enzyme ubiquitaire qui est présente dans tous les compartiments cellulaires. La phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la PP-1 associée au glycogène permet l'activation de la phosphatase, qui peut alors activer la GS par déphosphorylation (Lawrence *et al* 1999). L'insuline stimule l'activation de pools de phosphatases localisés au niveau des particules de glycogène, grâce à des sous-unités de la PP-1 qui servent d'adaptateurs en plaçant l'enzyme directement au contact de son substrat, la glycogène synthase (Newgard *et al* 2000). L'importance de ce ciblage spécifique de la PP-1 a été récemment confirmée par les données de l'invalidation d'une de ces sous-unités, la PTG (Protein Targeting to Glycogen). Les souris hétérozygotes PTG +/- ont une

synthèse de glycogène diminuée et développent progressivement une intolérance au glucose et une insulino-résistance musculaire (Crosson *et al* 2003).

2-c : La production hépatique de glucose

Le foie est le site principal de production du glucose. Pour cela, il utilise deux voies métaboliques. La première est celle de la glycogénolyse, qui permet de répondre aux besoins à court terme en mobilisant rapidement les stocks de glycogène hépatique. La seconde est la voie de la néoglucogénèse, qui intervient pour faire face à des périodes de jeûne plus prolongées et qui met en jeu la synthèse de glucose *de novo* à partir des précurseurs que sont le lactate, le pyruvate, le glycérol et certains acides aminés (alanine). La voie de la néoglucogénèse est régulée au niveau de trois enzymes clés : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose-1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase (G6Pase). Ces enzymes sont contrôlées au niveau transcriptionnel par plusieurs hormones. Le glucagon *via* son second messager l'AMPc et les glucocorticoïdes stimulent l'expression de la PEPCK, alors qu'inversement l'insuline l'inhibe (Pilkis & Granner 1992). L'insuline diminue également l'expression de la fructose-1,6-biphosphatase et de la G6Pase et stimule l'expression des gènes de la glycolyse (glucokinase, pyruvate-kinase) et de la lipogénèse (FAS, ACC). L'absence de freinage de la production hépatique de glucose (PHG) est une des caractéristiques métaboliques du diabète de type 2, et elle est en partie secondaire à une insulino-résistance hépatique. Les mécanismes moléculaires responsables de cet effet inhibiteur de l'insuline sur la transcription des gènes de la néoglucogénèse ne sont qu'imparfaitement connus, mais seraient dépendants de l'activation de la PI 3-kinase (Gabbay *et al* 1996). Récemment, l'analyse de la régulation du promoteur de la PEPCK *in vivo* dans une lignée de cellules hépatomateuses a permis de décrypter partiellement le mécanisme d'action de l'insuline sur l'expression de ce gène (Duong *et al* 2002). Dans ce modèle cellulaire, l'insuline augmente l'expression de la protéine LIP (Liver-enriched transcriptional Inhibitory Protein), une isoforme inhibitrice du facteur de transcription C/EBP β . La fixation de LIP au niveau du promoteur de la PEPCK déplace alors l'isoforme activatrice

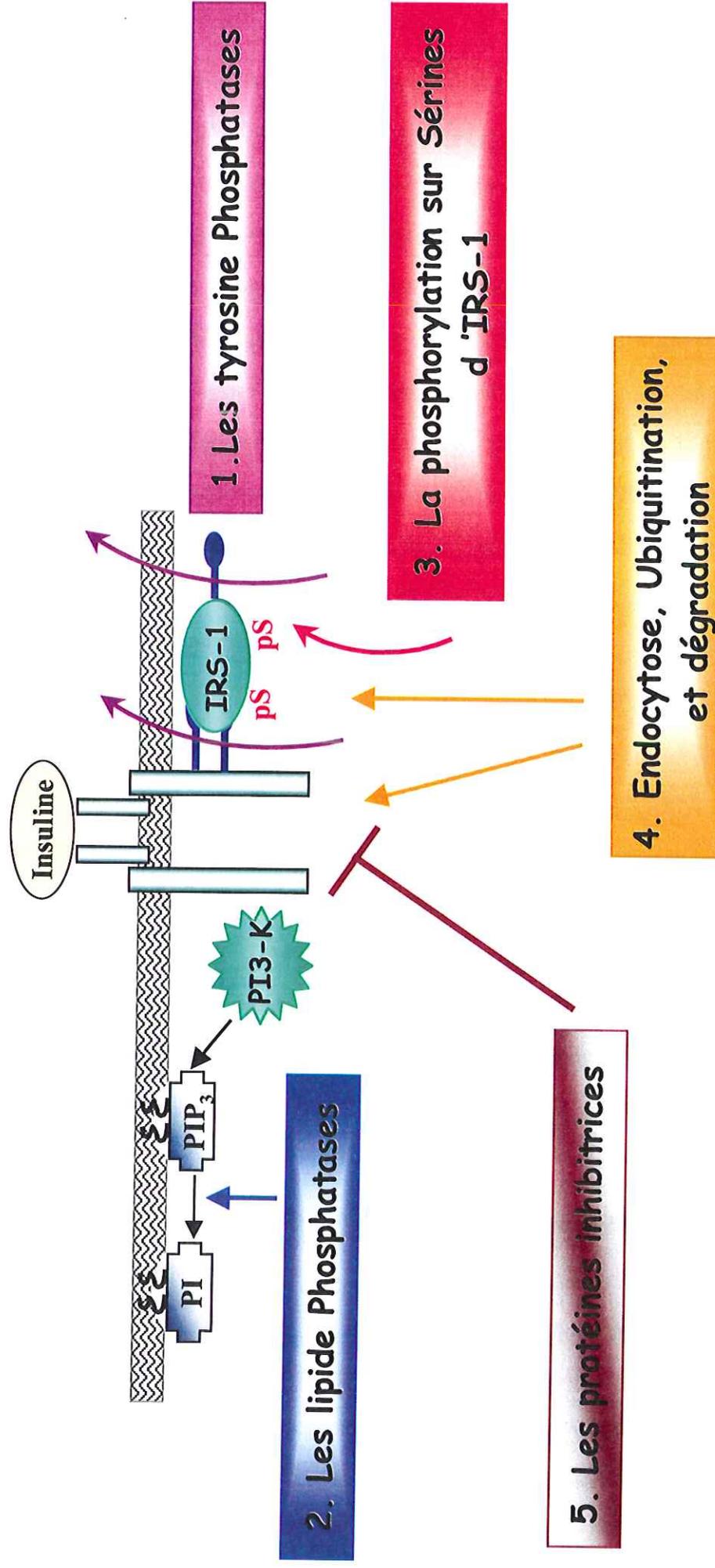
de C/EBP β , LAP (Liver-enriched transcriptional Activation Protein), empêchant ainsi le recrutement du facteur de transcription CBP (CREB-Binding Protein) et de l'ARN polymérase II. Des études récentes suggèrent que la protéine kinase Akt pourrait également participer à ce contrôle. En effet, l'inactivation du gène Akt2 provoque une augmentation de la PHG à l'origine d'une intolérance au glucose et d'un diabète de type 2 (Cho *et al* 2001). D'autres travaux suggèrent que le facteur de transcription PGC-1 α (PPAR Gamma Coactivator 1 α) serait impliqué dans la stimulation de l'expression des enzymes clés de la néoglucogénèse (Puigserver et Spiegelman 2003). Inversement, la surexpression adénovirale du facteur de transcription SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c) *in vivo* dans le foie de souris rendues diabétiques par l'injection de streptozotocine, permet d'inhiber l'expression de la PEPCCK et d'améliorer l'hyperglycémie (Bécard *et al* 2001). La participation relative de ces deux voies de signalisation dans le contrôle de la PHG en réponse à l'insuline reste cependant à déterminer.

A côté de son action directe au niveau des hépatocytes, l'insuline peut également contrôler la PHG de manière indirecte en régulant le flux des acides gras libres. En effet, de par son action antilipolytique, l'insuline diminue le flux d'acides gras libres au niveau de la veine porte. La β -oxydation des acides gras au niveau hépatique produit du glycérol et est à l'origine d'une augmentation du ratio NADPH/NAD, conduisant à l'augmentation de la PHG. Dans ce modèle, l'augmentation de la PHG observée dans le diabète de type 2 serait secondaire à une insulino-résistance primitivement adipocytaire et non pas hépatique (Bergman 1997).

3 : Les mécanismes de régulation négative du signal de l'insuline

La transduction d'un signal hormonal met en jeu des mécanismes d'atténuation qui font suite à l'état d'activation et visent à assurer le retour à l'état basal de la cellule cible (Schéma 6). Le dérèglement de ces rétrocontrôles peut conduire à des situations pathologiques telles que l'insulino-résistance et le diabète de type 2. Un premier rétrocontrôle

Figure 6 : La régulation négative du signal insulinique



existe au niveau de la quantité de ligand disponible. Concernant l'action de l'insuline, la baisse de la glycémie plasmatique diminue la sécrétion d'insuline, limitant ainsi la quantité d'hormone capable de se lier aux récepteurs. Les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation du récepteur et de ses effecteurs intracellulaires constituent également une voie très importante de la régulation négative du signal insulinaire. La cellule peut aussi réguler la quantité de récepteurs présents à la membrane plasmique, et donc accessibles au ligand, par un mécanisme d'internalisation. Le récepteur lui-même ou ses effecteurs intracellulaires, IRS-1 notamment, peuvent être soumis à une dégradation contrôlée par le protéasome (ubiquitination). Enfin, nous verrons que plusieurs partenaires du récepteur de l'insuline peuvent se comporter comme des inhibiteurs endogènes de l'action de l'insuline.

3-a : Les tyrosines phosphatases

Les protéines tyrosine phosphatases (PTP) sont divisées en deux groupes : les PTPs intracellulaires qui possèdent un seul domaine catalytique (*i.e.* PTP-1B) et les PTPs transmembranaires qui ont une structure comparable à un récepteur membranaire avec un domaine extracellulaire, un segment transmembranaire et un ou deux domaines catalytiques intracellulaires (*i.e.* LAR). Le site actif des PTPs est remarquablement bien conservé avec notamment un résidu cystéine indispensable au maintien de l'activité enzymatique (Cheng *et al* 2002). Les deux PTPs principalement impliquées dans le contrôle de l'action de l'insuline sont la PTP-1B et la PTP transmembranaire LAR (Leukocyte Antigen-Related) (Goldstein 2002).

La protéine LAR interagit avec le récepteur de l'insuline au niveau de la membrane plasmique et le déphosphoryle spécifiquement au niveau des résidus tyrosines critiques pour son activité catalytique (Ahmad & Goldstein 1997). Des données obtenues chez l'homme semblent confirmer l'importance physiologique de LAR dans la régulation de l'action de l'insuline. En effet, l'expression de LAR est augmentée dans le tissu adipeux et le muscle

squelettique de sujets obèses (Ahmad 1997). De plus, l'immunodéplétion de la protéine LAR du tissu adipeux de ces sujets permet de normaliser l'activité tyrosine phosphatase vis-à-vis du récepteur de l'insuline, suggérant que dans le tissu adipeux, LAR joue un rôle prépondérant par rapport à la PTP-1B. Nous verrons que cette tissu-spécificité des PTPs se retrouve avec la PTP1B.

La PTP-1B est une phosphatase abondamment exprimée qui est présente dans tous les tissus cibles de l'insuline. La PTP-1B se lie au domaine kinase du récepteur de l'insuline activé. Les résultats obtenus grâce à l'inactivation du gène *in vivo* chez la souris ont apporté des arguments décisifs en faveur de l'importance de la PTP-1B dans la signalisation de l'insuline (Elchebly *et al* 1999, Klamann *et al* 2000). En effet, les souris PTP-1B *-/-* ont une sensibilité à l'insuline augmentée à jeun et lors d'épreuves de clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques. Par ailleurs, ces études *in vivo* ont confirmé la spécificité tissulaire de l'action de la PTP-1B. Ainsi, le transport de glucose est augmenté dans le muscle squelettique des souris PTP-1B *-/-*, mais pas dans le tissu adipeux. De même, la signalisation du récepteur de l'insuline n'est pas modifiée dans les adipocytes de ces animaux. Comme pour la phosphatase LAR, la PTP1-B est surexprimée dans le muscle squelettique des sujets obèses insulino-résistants non diabétiques. De façon surprenante, l'activité tyrosine phosphatase est diminuée dans le muscle des sujets diabétiques de type 2, avec une diminution de l'expression des enzymes PTP-1B et LAR (Ahmad *et al* 1997, Worm *et al* 1996). Cette observation suggère qu'une dérégulation de l'activité des PTPases pourrait participer à la phase dynamique de l'insulino-résistance, avant le stade de diabète avéré. A noter enfin, que des études génétiques ont démontré que le gène de la PTP-1B est situé sur un locus de susceptibilité pour l'obésité (20q13.1-q13.2) (Lembertas *et al* 1997).

3-b : Les lipides phosphatases

Les lipides phosphatases déphosphorylent les PIP_3 produits en réponse à l'insuline et régulent ainsi de façon négative les voies de signalisation en aval de la PI 3-kinase. Deux de

ces enzymes sont impliquées dans la régulation de l'action de l'insuline : SHIP-2 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase-2) et PTEN (phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10).

SHIP-2 est une lipide phosphatase qui hydrolyse les PIP_3 en position D5. Contrairement à son isoforme SHIP-1 majoritairement présente dans les cellules hématopoïétiques, elle est spécifiquement exprimée dans les tissus cibles de l'insuline (Ishihara *et al* 1997b). La participation de SHIP-2 dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline a été clairement démontrée *in vivo* par les résultats de l'inactivation ciblée du gène chez la souris (Clement *et al* 2001). Les souris homozygotes SHIP-2 $-/-$ ont une sensibilité accrue à l'insuline, reflétée par des hypoglycémies sévères responsables d'une létalité périnatale. Ces hypoglycémies sont secondaires à une répression des gènes clefs de la néoglucogénèse et notamment de la PEPCK. Chez les souris hétérozygotes SHIP-2 $+/-$, on observe une augmentation de la tolérance au glucose, avec une augmentation de la translocation de GLUT4 et de la synthèse de glycogène dans le muscle squelettique. Il est intéressant de noter que ces résultats sont corrélés avec l'augmentation de l'expression de la protéine SHIP-2 chez la souris diabétique *db/db* ou chez la souris sauvage soumise à un régime riche en graisses (Hori *et al* 2002). Son expression est ainsi augmentée de 50% dans le muscle et de 100% dans le tissu adipeux, tandis qu'elle ne varie pas au niveau du foie. En accord avec ces résultats, une étude a mis en évidence l'existence de mutations du gène de SHIP-2 associées à des diabètes de type 2 chez le rat et chez l'homme (Marion *et al* 2002).

PTEN est un gène suppresseur de tumeurs qui est retrouvé muté dans de nombreux cancers chez l'homme. L'inhibition de l'expression de PTEN obtenue *in vivo* suite à l'injection d'oligonucléotides anti-sens, normalise la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline chez les souris *db/db* et *ob/ob*. Cette amélioration est secondaire à une diminution de l'expression de la protéine au niveau du foie et du tissu adipeux, respectivement de 90 et 75%. Chez les souris traitées avec les oligonucléotides anti-sens, la phosphorylation d'Akt est augmentée en réponse à l'insuline au niveau hépatique (Butler *et al* 2002). Chez l'homme, on peut relever l'observation d'un patient ayant une mutation hétérozygote de PTEN dans le cadre

d'un syndrome de Cowden, chez qui la réalisation d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique mettait en évidence une sensibilité à l'insuline accrue (Iida *et al* 2000). Ces données semblent donc en faveur d'un rôle de PTEN dans le contrôle de l'homéostasie glucidique *in vivo*.

3-c : La phosphorylation sur sérine d'IRS-1

La phosphorylation sur sérine des IRSs apparaît à l'heure actuelle comme un des principaux mécanismes d'atténuation du signal de l'insuline (Sykiotis & Papavassiliou 2001). Il est surtout intéressant de noter que la phosphorylation sur sérine d'IRS-1 est augmentée en réponse à plusieurs stimuli impliqués dans la physiopathologie de l'insulinorésistance, comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor- α), les acides gras libres, les céramides, l'hyperinsulinémie ou l'hyperglycémie (Shulman 2000). Les données concernant IRS-2 sont à l'heure actuelle beaucoup moins nombreuses, même si l'homologie de structure et de fonction avec IRS-1 laisse supposer que ce mécanisme de régulation négative concerne aussi IRS-2. Les mécanismes moléculaires qui conduisent de cette phosphorylation sur sérine d'IRS-1 à l'inhibition de la signalisation de l'insuline sont multiples. Premièrement, elle favorise la dissociation de l'interaction entre le domaine PTB d'IRS-1 et le récepteur de l'insuline, diminuant ainsi de 50% la phosphorylation sur tyrosine d'IRS-1 (Aguirre *et al* 2002). De plus, la phosphorylation de certains résidus sérines proches des motifs phosphotyrosines conservés (pYxxM) diminue le recrutement des protéines à domaine SH2 et notamment de la sous-unité p85 de la PI 3-kinase (Mothe *et al* 1996). Enfin, il semble que la phosphorylation sur sérine d'IRS-1 favorise son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Sun *et al* 1999).

Les kinases responsables de cette (ces) phosphorylation(s) ne sont pas précisément identifiées. Des données récentes suggèrent que la kinase IKK β , qui est activée en réponse au TNF α , pourrait être un candidat potentiel. En effet, des cellules de rat prétraitées par un inhibiteur d'IKK β ou des cellules dérivées de souris IKK α/β *-/-* présentent une diminution de

la phosphorylation sur sérine d'IRS-1 en réponse au $\text{TNF}\alpha$ (Gao *et al* 2002). Cette phosphorylation d'IRS-1 pourrait représenter le mécanisme moléculaire de l'action hypoglycémiante de l'aspirine, qui à forte dose (7g/jour) inhibe $\text{IKK}\beta$ (Yuan *et al* 2001). Par ailleurs, cette phosphorylation sur sérine d'IRS-1 pourrait aussi s'intégrer dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle induite par la fixation de l'insuline sur son récepteur, participant ainsi à l'arrêt du signal insulinique. Il a été en effet démontré que l'insuline stimulait la phosphorylation sur sérine d'IRS-1 dans les muscles de sujets sains. Là encore, les kinases en cause ne sont pas identifiées. La $\text{PKC}\zeta$, située en aval de la PI 3-kinase, pourrait être impliquée dans ce rétrocontrôle (Liu *et al* 2001). Cette phosphorylation a été confirmée *in vivo* dans plusieurs modèles d'insulinorésistance. Ainsi, le niveau de sérine phosphorylation d'IRS-1 est augmenté dans le foie et le muscle de rats *fa/fa*, alors que l'expression même de la protéine est diminuée par rapport aux animaux témoins (Quiao *et al* 2002, Hotamisligil *et al* 1996). De plus, une étude récente réalisée sur des cellules musculaires de diabétiques de type 2 a pu mettre en évidence une augmentation de la phosphorylation sur la sérine 636 d'IRS-1 à l'état basal (Bouzakri *et al* 2003).

3-d : Endocytose, ubiquitination et dégradation

Concernant le récepteur de l'insuline, la liaison du ligand entraîne son internalisation rapide. Les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas complètement élucidés, mais nécessitent l'activation du récepteur et la présence de son domaine intracellulaire juxtamembranaire. Des pompes à protons acidifient le contenu des endosomes et activent une insulinase qui va dégrader l'hormone. Cette acidification serait également responsable d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur en modifiant la conformation du site actif. De plus, le récepteur de l'insuline serait majoritairement déphosphorylé par la PTP-1B au niveau des endosomes. Le récepteur est ensuite recyclé à la membrane pour pouvoir être de nouveau activé. L'ensemble de ces données suggère que l'internalisation des récepteurs est responsable de l'atténuation du signal insulinique (pour revue Wiley & Burke 2001).

L'ubiquitination du récepteur lui-même ou de ses effecteurs intracellulaires apparaît comme un nouveau mécanisme de régulation négative de la signalisation des RTKs. Il s'agit de la dégradation contrôlée de protéines par la voie du protéasome, qui se déroule en trois étapes (pour revue Ciechanover 1998). L'ubiquitine est d'abord activée par une enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme). Interviennent ensuite une ou plusieurs enzymes E2 (ubiquitin-conjugating proteins) qui transfèrent l'ubiquitine à une ubiquitine ligase (E3). Cette dernière enzyme catalyse le transfert de l'ubiquitine sur la protéine substrat, qui sera alors reconnue et dégradée par le protéasome. Si plusieurs études ont clairement démontré l'ubiquitination du récepteur de l'EGF et le rôle important joué par Cbl dans ce processus (Levkowitz *et al* 1999), celles concernant le récepteur de l'insuline sont encore préliminaires. En revanche, il apparaît que les IRSs peuvent être dégradées par la voie du protéasome. En effet, l'exposition pendant plusieurs heures à une stimulation insulinique conduit à la dégradation des IRSs dans plusieurs lignées cellulaires (Sun *et al* 1999). Les mécanismes moléculaires conduisant à l'ubiquitination des IRSs sont imparfaitement connus. Une première hypothèse suggère que la phosphorylation sur certains résidus sérines d'IRS-1 pourrait jouer un rôle. D'autre part, il semble que les protéines SOCS-1 et SOCS-3 soient impliquées dans l'ubiquitination d'IRS-1 et d'IRS-2. En effet, l'expression adénovirale de ces deux adaptateurs diminue l'expression des IRSs au niveau hépatique. Les SOCS agiraient en se liant aux IRSs et en recrutant *via* leur domaine SOCS box l'élongine B, qui est une ubiquitine ligase E3. En accord avec cette hypothèse, la mutation du domaine SOCS box prévient l'ubiquitination d'IRS-1 et d'IRS-2 (Rui *et al* 2002). Comme nous allons le voir, ce mécanisme participe à l'action inhibitrice des SOCSs sur la signalisation de l'insuline.

3-e : Les protéines inhibitrices

Certains adaptateurs moléculaires peuvent inhiber la transduction du signal de l'insuline, en régulant de façon directe ou indirecte l'activité catalytique du récepteur de l'insuline ou en agissant au niveau du recrutement et de la dégradation de ses effecteurs intracellulaires. Nous détaillerons dans ce chapitre, les SOCS, la protéine transmembranaire

PC-1 et la fétuine. Les adaptateurs de la famille de Grb7, et notamment Grb14, seront revus en détail dans le prochain chapitre.

3-e-1 Les SOCSs

Les protéines de la famille des SOCSs (Suppressors Of Cytokine Signaling) ont été initialement décrites comme des effecteurs négatifs de l'action des cytokines, *via* l'inhibition de la voie JAK/STAT. A l'heure actuelle, il existe plusieurs données concordantes témoignant de la participation des SOCSs à la régulation du signal de l'insuline (pour revue Johnston *et al* 2003). SOCS-1 et -6 pourraient inhiber l'activité catalytique du récepteur de l'insuline vis-à-vis de ses substrats (Mooney *et al* 2001). Par leur liaison directe au récepteur de l'insuline, les SOCSs diminuent le recrutement des effecteurs intracellulaires. Ainsi, il a été démontré que SOCS-3 se lie au niveau de la tyrosine Y960 juxtamembranaire. Elle pourrait ainsi entrer en compétition avec les protéines IRSs et Shc (Emanuelli *et al* 2000). Enfin, SOCS-1 et SOCS-3 (et non SOCS-2) favorisent l'ubiquitination des IRSs (voir chapitre précédent).

Plusieurs études réalisées *in vivo* ont confirmé le rôle des SOCSs dans la régulation des actions de l'insuline. SOCS-3 semble plus particulièrement impliquée dans les états d'insulinorésistance induits par le TNF α . En effet, son expression est augmentée dans le tissu adipeux des souris *ob/ob*, mais elle est diminuée dans le tissu adipeux des souris *ob/ob* n'exprimant pas le récepteur au TNF α . De plus, l'injection intrapéritonéale de TNF α augmente l'expression de l'ARNm de SOCS-3 dans le tissu adipeux de souris non obèses (Emanuelli *et al* 2001). Dans une autre étude, l'injection systémique chez la souris d'adénovirus codant pour la protéine SOCS-1 s'accompagne d'une perturbation de l'homéostasie glucidique associant une hyperglycémie à jeun, une hyperinsulinémie compensatrice et une insulinorésistance authentifiée lors d'un test de tolérance à l'insuline. Ces anomalies sont vraisemblablement secondaires à l'ubiquitination et à la dégradation d'IRS-1 au niveau hépatique (Rui *et al* 2002). Les résultats de l'inactivation du gène de SOCS-1 sont concordants, avec des souris SOCS-1 *-/-* présentant une sensibilité à l'insuline

accrue, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine d'IRS-1 en réponse à l'insuline (Kawazoe *et al* 2001).

En résumé, si les SOCSs apparaissent clairement comme des effecteurs négatifs de la signalisation de l'insuline, des études sont nécessaires pour préciser leur mécanisme d'action. Ce dernier pourrait varier selon la nature de l'isoforme des SOCSs et du tissu cible de l'insuline en cause.

3-e-2 : PC-1

La glycoprotéine membranaire PC-1 (Plasma Cell differentiation antigen 1) a été initialement identifiée comme étant un alloantigène membranaire participant à la différenciation finale des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'immunoglobulines (Takahashi *et al* 1970). La participation de PC-1 dans la signalisation de l'insuline a été suggérée par sa découverte dans les fibroblastes de patients très insulino-résistants (Maddux *et al* 1995). Par la suite, d'autres études ont retrouvé une corrélation statistique entre le niveau d'expression de cette glycoprotéine dans le muscle squelettique de sujets sains et le niveau d'insulino-résistance mesuré lors d'un test de tolérance à l'insuline effectué par voie intraveineuse (Frittitta *et al* 1996). De même, la diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline mesurée *in vitro* est corrélée au niveau d'expression musculaire de PC-1 chez des femmes ayant un diabète gestationnel (Shao *et al* 2000). Néanmoins, les preuves d'une relation directe de cause à effet sont moins nombreuses. Une étude utilisant plusieurs approches complémentaires ne confirme pas l'importance de PC-1 dans la signalisation de l'insuline. En effet, l'expression de PC-1 varie peu dans plusieurs modèles animaux de diabète de type 1 ou de type 2. Surtout, la surexpression adénovirale de PC-1 dans les adipocytes 3T3-L1 ne modifie ni la signalisation de l'insuline ni le transport de glucose (Sakoda *et al* 1999). Les études génétiques sont également discordantes. Selon une équipe italienne, le polymorphisme de l'exon 4 du gène de PC-1 (K121Q) serait associé à une insulino-résistance (authentifiée lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique) chez des siciliens non obèses et non diabétiques (Pizutti *et al* 1999). Inversement, une étude

danoise ne retrouve pas d'association de ce polymorphisme au diabète de type 2 ou à l'insulinorésistance (Rasmussen *et al* 2000).

Dans l'état actuel des connaissances, le rôle de PC-1 dans la physiopathologie de l'insulinorésistance n'est donc pas clairement établi.

3-e-3 : La fétuine

La fétuine, connue aussi sous le nom de α 2-HSG (α 2-Heremans Schmid glycoprotein), est une glycoprotéine sérique sécrétée par les hépatocytes, qui fait partie de la superfamille des cystatines (Le Cam *et al* 1985). La fétuine se comporte comme un inhibiteur de l'activité catalytique du récepteur de l'insuline dans plusieurs espèces. De plus cette inhibition apparaît spécifique, puisqu'elle n'est pas observée avec le récepteur de l'IGF-1 (Srinivas *et al* 1993). Le mécanisme de cette inhibition n'est pas parfaitement élucidé. Il a été démontré que la fétuine ne modifiait pas l'affinité de liaison de l'insuline sur son récepteur (Auberger *et al* 1989, Srinivas *et al* 1993). Des expériences de co-immunoprécipitation réalisées dans des fibroblastes surexprimant le récepteur de l'insuline ont retrouvé une association entre les deux protéines, augmentant après stimulation par l'insuline (Mathews *et al* 2000). Cependant, en l'absence d'études *in vitro*, on ne peut pas exclure que cette liaison soit indirecte.

Concernant les voies de signalisation de l'insuline, il semble que la fétuine inhibe spécifiquement les effets mitogéniques de l'insuline, sans modifier ses effets métaboliques. La surexpression du variant humain de la fétuine (α 2-HSG) ne modifie pas la translocation de GLUT4 ou le transport de glucose, alors qu'elle inhibe l'activation des MAP kinases, comme en témoigne la diminution la phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 (Cheng *et al* 1998). Le rôle physiologique de la fétuine dans la régulation de l'action de l'insuline *in vivo* a été suspecté devant une augmentation de son expression dans le tissu adipeux de rats soumis à un régime riche en graisses (Lin *et al* 1998). En revanche, l'inactivation de l'homologue murin du gène de la fétuine (AHSG) n'a pas entraîné de perturbations majeures de l'homéostasie glucidique (Mathews *et al* 2002). La relative

Schéma 7: Structure des protéines de la famille Grb7

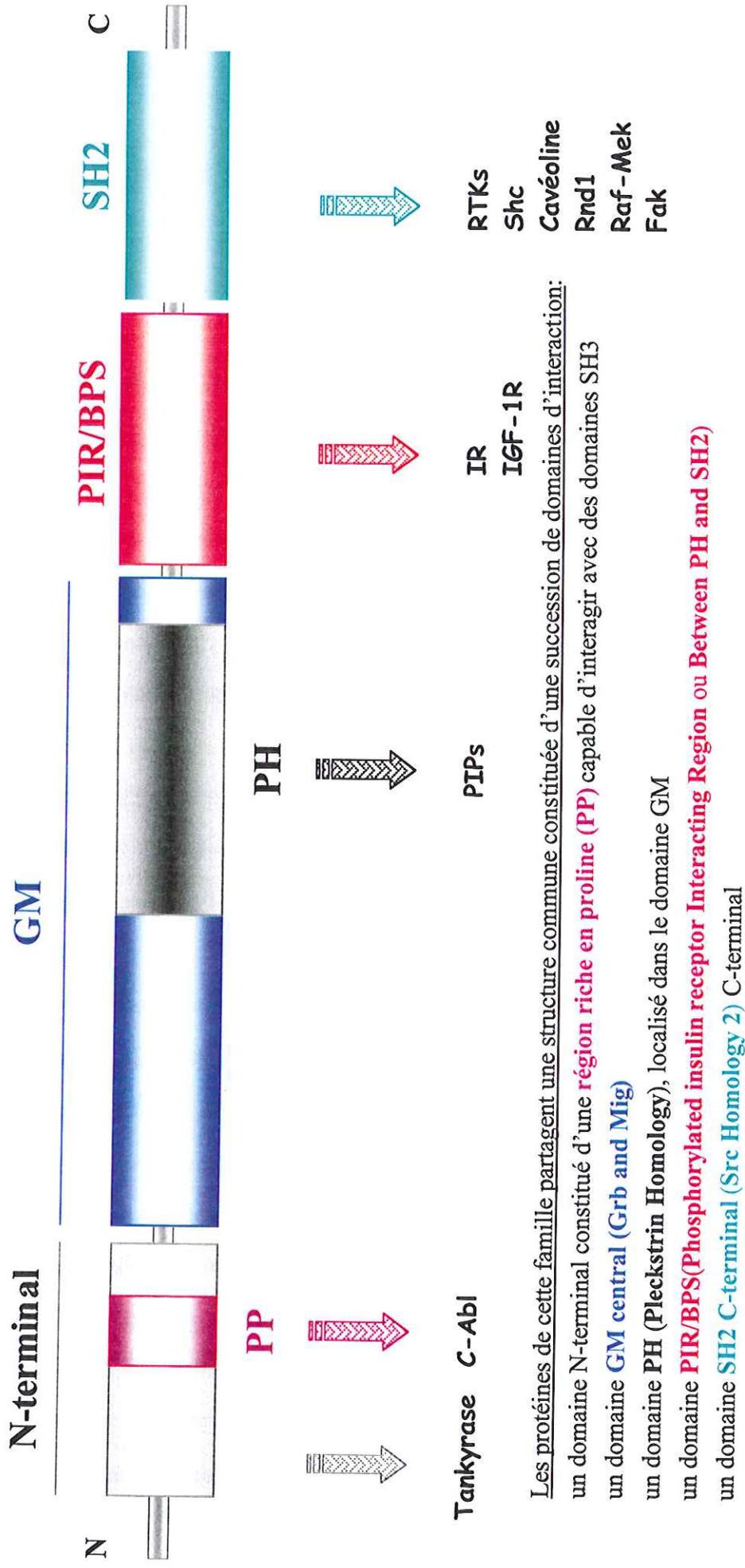


Schéma issu de Han *et al.*, 2001

pauvreté du phénotype de ces animaux pourrait être la conséquence d'une compensation par un homologue de la fétuine récemment décrit, la fétuine B (Olivier *et al* 2000). Il est intéressant de noter que chez l'homme, le gène de la fétuine est localisé au niveau d'un locus de susceptibilité (3q27) pour le diabète de type 2 dans une cohorte française (Vionnet *et al* 2000).

4 : Grb14 : un nouveau partenaire du récepteur de l'insuline

4-a : Les adaptateurs de la famille de Grb7

Les protéines de la famille de Grb7 sont des adaptateurs moléculaires qui ont été clonés en interaction avec de nombreux RTKs (pour revue Daly 1998, Han *et al* 2001). On dénombre actuellement trois membres : Grb7, Grb10 et Grb14.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à leur rôle dans la signalisation du récepteur de l'insuline.

4-a-1 : Structure

Les protéines Grb7, Grb10, Grb14, ainsi que le produit du gène homologue de *C. Elegans*, Mig-10, ont une structure conservée. Comme beaucoup d'adaptateurs moléculaires les protéines de la famille de Grb7 sont constituées de plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine et protéine-lipides et sont dépourvues d'activité catalytique (**Schéma 7**). Ainsi, elles possèdent un domaine SH2 C-terminal extrêmement conservé, une région centrale appelée GM (Grb/Mig), qui comprend un domaine potentiel d'association à la protéine Ras (RA), un domaine PH et un domaine spécifique dénommé PIR (Phosphorylated insulin receptor Interacting Region) ou BPS (Between the PH and SH2)(Kasus-Jacobi *et al* 1998, He *et al* 1998). La région N-terminale de ces protéines est moins conservée, mais elle contient une région riche en prolines (PS/AIPNPFPEL) qui est un domaine potentiel de liaison pour des protéines à domaine SH3.

Les protéines Grb7, Grb10 et Grb14 sont codées par trois gènes différents et on dénombre plusieurs variants d'épissage de Grb10 et Grb7. La nomenclature actuellement utilisée pour ces différents isoformes est celle proposée sur le site web www.bri.nrc.ca/thomasweb/grb7.html. Elle prend en compte à la fois les variants d'épissage et les différents orthologues. On dénombre ainsi 5 variants d'épissage de Grb10 pour 6 isoformes au total : mGrb10 α , hGrb10 β , hGrb10 γ /mGrb10 δ , hGrb10 ϵ et hGrb10 ζ . Grb7 possède deux variants d'épissage : hGrb7 et hGrb7V. Concernant Grb14, un seul variant d'épissage a été décrit et les différentes isoformes sont définies par leur espèce d'origine : l'homme pour hGrb14 (Daly *et al* 1996), le rat pour rGrb14 (Kasus-Jacobi *et al* 1998) et la souris pour mGrb14 (Reilly *et al* 2000). Les comparaisons de séquences de Grb14 retrouvent une forte homologie entre les différentes espèces, avec 83% d'identité de séquence entre l'homme et le rat ou la souris, et 93% entre le rat et la souris. La région la plus conservée est la partie C-terminale de la protéine comprenant les domaines PH, PIR et SH2.

4-a-2 : Expression

Les différents membres de la famille de Grb7 ont des profils d'expression différents. Les protéines Grb7 humaine et murine sont essentiellement exprimées au niveau du foie et du rein (Margolis *et al* 1992, Frantz *et al* 1997). De plus, Grb7 est fortement exprimée dans le pancréas chez l'homme (Han *et al* 2001). Grb10 et ses différentes isoformes ont une distribution plus ubiquitaire. La protéine est notamment abondamment exprimée au niveau du muscle, du coeur, du pancréas et du cerveau. En revanche, Grb10 est très faiblement exprimée au niveau du foie (Ooi *et al* 1995, Liu *et al* 1995, O'Neill *et al* 1996). Concernant le tissu adipeux, une étude chez le singe *Rhésus* a retrouvé une expression de Grb10 à ce niveau (O'Neill *et al* 1996). L'expression de Grb14 semble limitée aux tissus cibles de l'insuline tels que le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux, mais aussi le pancréas et le cerveau qui sont de nouvelles cibles importantes de l'hormone (Daly *et al* 1996, Kasus-Jacobi *et al* 1998). De plus, Grb14 s'exprime progressivement au cours de la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1, de façon concomitante avec le récepteur de l'insuline et IRS-1. Inversement, l'expression de Grb7 n'est pas modifiée dans ces mêmes cellules

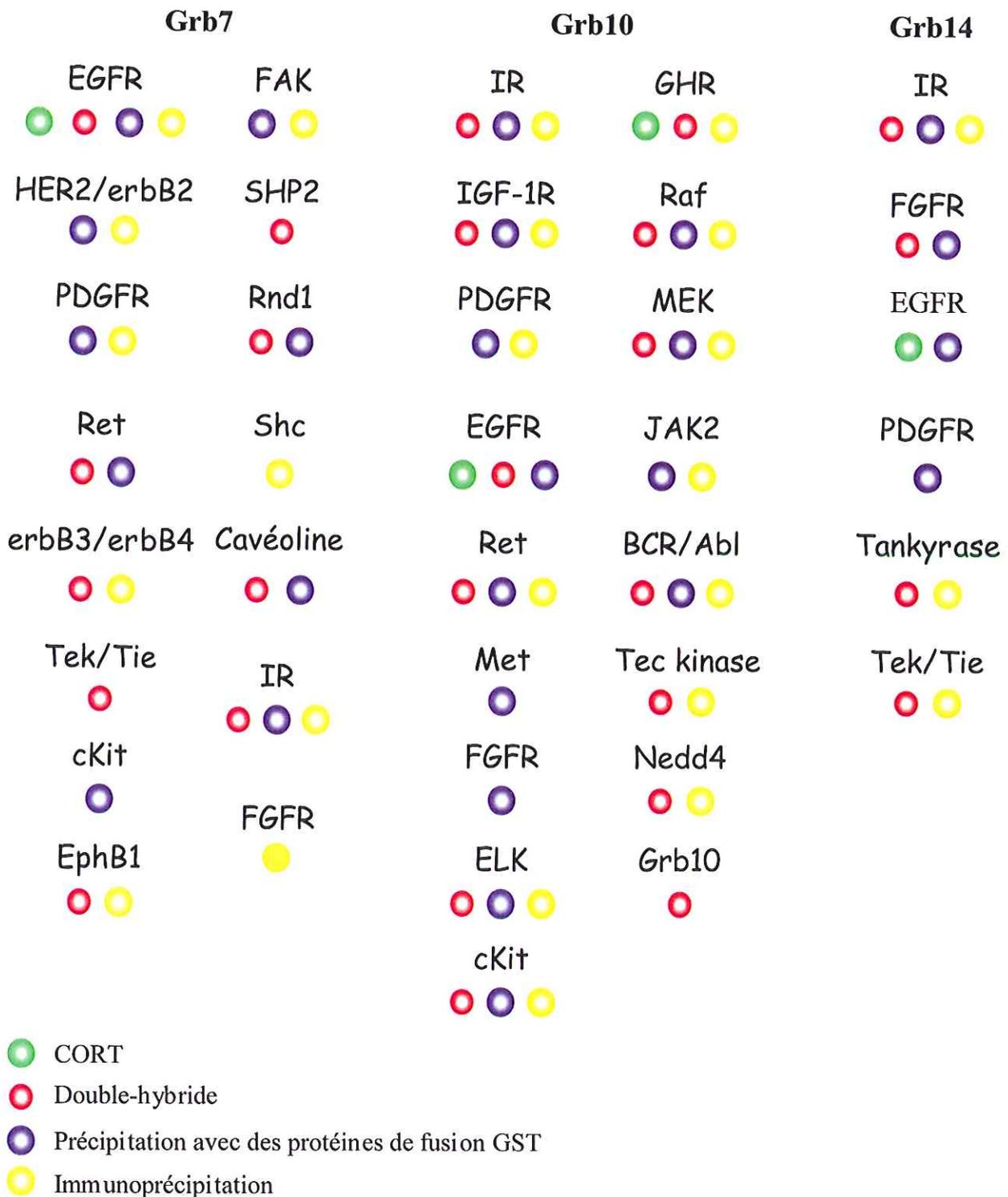
(Kasus-Jacobi *et al* 1998). En comparaison avec les deux autres membres de la famille, Grb14 semble donc plus spécifiquement exprimée dans les tissus cibles de l'insuline, ce qui est un argument indirect en faveur de son rôle potentiel dans la signalisation de l'hormone.

En interagissant avec les RTKs, les Grbs pourraient réguler leur activité et ainsi être impliquées dans des processus de prolifération cellulaire. De façon intéressante, les gènes codant pour les Grbs sont situés sur des loci chromosomiques proches de ceux des gènes codant pour les récepteurs de l'EGF et sont co-exprimés dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines (Daly 1998). Il a été démontré par exemple que Grb7 était co-amplifiée avec le récepteur HER2/ErbB-2 (un membre de la famille des récepteurs de l'EGF) dans des lignées de cellules mammaires et qu'elle était directement associée par son domaine SH2 aux résidus phosphotyrosines du récepteur (Stein *et al* 1994). Par ailleurs, la co-expression de Grb7 avec HER2 est significativement corrélée avec des formes invasives de cancer de l'œsophage chez l'homme, alors qu'une telle corrélation n'est pas retrouvée en cas de surexpression isolée de Grb7 ou d'HER2 (Tanaka *et al* 1997). De même, Grb14 est surexprimée dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires et prostatiques (Daly *et al* 1996). Ces résultats indiquent que les protéines de la famille de Grb7 pourraient jouer un rôle dans l'oncogénèse en régulant la signalisation des RTKs.

4-a-3 : Localisation subcellulaire

Grb7 est présente à la fois dans le cytoplasme et dans des zones de contact de la membrane plasmique impliquées dans la migration cellulaire (Han *et al* 2000). La délétion du domaine SH2 de Grb7 abolit cette localisation spécifique. De même, le domaine PH pourrait être aussi responsable de la localisation cellulaire de Grb7. En effet, il a été démontré récemment qu'il interagissait avec les phospholipides membranaires et qu'il jouait un rôle dans la migration cellulaire (Shen *et al* 2002). Grb10 qui est majoritairement présente dans le cytoplasme, se localise à la membrane en réponse à l'insuline (Frantz *et al* 1997, Dong *et al* 1997). Dans une autre étude, Grb10 apparaît localisée dans des pools situés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, en association avec la kinase anti-apoptotique Raf-1.

Schéma 8 : Les partenaires des adaptateurs de la famille Grb7



Les interactions avec les différentes protéines indiquées ont été montrées avec plusieurs techniques d'interaction schématisées par des pastilles de couleurs différentes. Les sigles sont définis dans la table des abréviations.

D'après la figure présentée sur le site web "<http://www.bri.nrc.ca/thomasweb/grb7.html>".

La stimulation par l'insuline ou l'IGF1 entraîne la translocation d'une partie de ces pools au niveau de la membrane plasmique et au niveau de plis (« ruffles») membranaires riches en actine. De par sa localisation et son interaction avec Raf-1, Grb10 pourrait servir de relai entre les récepteurs membranaires et la mitochondrie pour réguler l'apoptose (Nantel *et al* 1999). Cette hypothèse reste à être vérifiée. Actuellement, on ne dispose pas de données concernant la localisation subcellulaire de Grb14.

4-a-4 : Partenaires de liaison

Les membres de la famille de Grb7 ont été initialement clonés en interaction avec le récepteur de l'EGF grâce à l'emploi de la technique CORT (Cloning Of Receptor Target) (Margolis *et al* 1992, Ooi *et al* 1995, Daly *et al* 1996). Par la suite, il a été largement démontré que les Grbs pouvaient se lier à de nombreux autres RTKs, qui sont répertoriés sur le **schéma 8**. Ces interactions ont été initialement détectées grâce au système double hybride dans la levure et confirmées par des expériences de co-immunoprécipitation dans des lignées cellulaires surexprimant au moins un des deux partenaires. Ces associations ont été plus rarement mises en évidence *in vivo* avec des protéines endogènes. Il est intéressant de noter que les adaptateurs de la famille de Grb7 se lient aux RTKs une fois que ceux-ci sont activés par la liaison de leur ligand. Dans la majorité des cas, les Grbs interagissent avec les différents RTKs par l'intermédiaire de leur domaine SH2 (Daly 1998).

On ne dispose actuellement que de peu de données concernant les partenaires de signalisation des protéines de la famille de Grb7 autres que les RTKs. L'identification de ces effecteurs intracellulaires est pourtant une étape indispensable à la compréhension du rôle physiologique de ces adaptateurs dans le contrôle de l'action des RTKs. Plusieurs partenaires de Grb7 ont été néanmoins identifiés comme la tyrosine phosphatase SHPTP2, l'adaptateur Shc, la GTPase Rnd1, la protéine kinase NIK (NFκB-Inducing Kinase) (Han *et al* 2001, Chen *et al* 2003). Grb7 interagit également avec des protéines qui semblent impliquées dans le contrôle de la migration cellulaire comme la tyrosine kinase FAK, la cavéoline-1, mais aussi avec les phosphoinositides par l'intermédiaire de son domaine PH

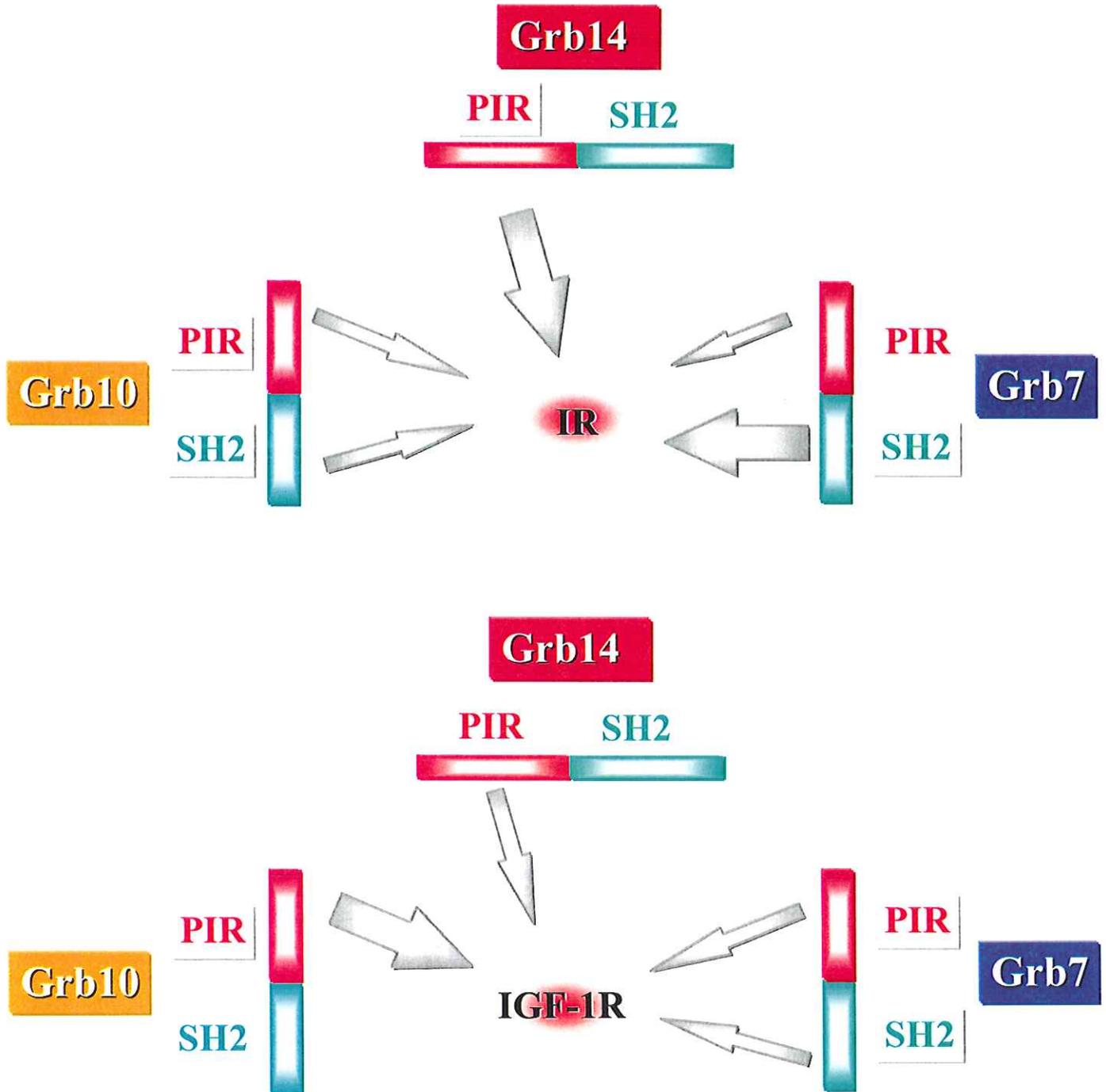
(Han *et al* 2001). De son côté, Grb10 interagit avec les protéines kinases Raf-1 et MEK1, ainsi qu'avec la protéine Nedd4 (Neuronal precursor cell-Expressed Developmentally Down-regulated 4) (Nantel *et al* 1998, Morrione *et al* 1999). Nedd4 est une ubiquitine ligase (E3) qui intervient dans le processus d'ubiquitination. Des expériences préliminaires ne retrouvent pas d'argument en faveur d'un rôle de Nedd4 dans une éventuelle dégradation de Grb14 (Morrione *et al* 1999). En revanche, une étude très récente a mis en évidence la constitution d'un complexe IGF-1R/Grb10/Nedd4 à l'origine de l'ubiquitination et la dégradation du récepteur de l'IGF-1 (IGF-1R) en réponse au ligand (Vecchione *et al* 2003). La surexpression de Grb10 (mGrb10 α) favorise cette ubiquitination en servant d'adaptateur entre l'IGF-1R et Nedd4. La participation de Grb7 et de Grb14, qui tous deux lient Nedd4, dans ce processus n'est pas encore déterminée. Par ailleurs, une interaction directe constitutive entre Grb10 (mGrb10 α) et Akt a été démontrée. En réponse à l'activation du RTK c-kit par des facteurs de croissance hématopoïétiques, Grb10 stimule Akt par une voie indépendante de la PI 3-kinase. L'hypothèse serait que Grb10 permette la translocation membranaire et l'activation d'Akt *via* son interaction avec le récepteur trans-membranaire c-kit (Jahn *et al* 2002). Enfin, la réalisation d'un crible double hybride avec la région N-terminale de Grb10 (mGrb10 δ) a conduit à l'identification de deux nouvelles protéines :GIGYF (Grb10 Interacting GYF protein) 1 et 2. Ces protéines pourraient jouer un rôle dans la signalisation du récepteur de l'IGF-1 en stimulant de manière modérée l'activation à la fois d'Akt et des MAP kinases (ERKs) en réponse au ligand (Giovannone *et al* 2003).

4-b : Rôle de Grb14 dans la transduction du signal de l'insuline

4-b-1 : Liaison de Grb14 au récepteur de l'insuline

Grb14 a été clonée en interaction double hybride dans la levure avec la sous unité β du récepteur de l'insuline activé. Cette interaction a été confirmée *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitation dans le foie de rat (Kasus-Jacobi *et al* 1998). Parallèlement, plusieurs études ont démontré que Grb10 interagissait avec le récepteur de

Schéma 9 :
Rôle des domaines PIR et SH2 dans l'interaction des protéines Grb7/10/14 avec les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1



l'insuline (Han *et al* 2001). De même, une étude a démontré que Grb7 pouvait également se lier au récepteur de l'insuline (Kasus-Jacobi *et al* 2000).

L'observation que l'interaction des Grbs avec le récepteur de l'insuline nécessite l'activation de son domaine tyrosine kinase et son autophosphorylation laissait penser que les domaines SH2 de Grb7/10/14 devaient se lier préférentiellement sur des résidus phosphotyrosines. De façon surprenante, la délétion du domaine SH2 de Grb14 n'abolit pas son interaction avec le récepteur de l'insuline, suggérant qu'une autre région de l'adaptateur doit être impliquée dans cette liaison. La construction d'autres mutants de délétion de Grb14 a permis de démontrer que le domaine PIR de la protéine était responsable de l'interaction avec le récepteur de l'insuline (Kasus-Jacobi *et al* 1998). L'importance relative de ces deux domaines PIR et SH2 dans l'interaction des Grbs avec les RTKs varie à la fois selon la nature du RTK et l'identité de la protéine de la famille de Grb7 (**Schéma 9**). Ainsi, le domaine SH2 de Grb7 est responsable de l'interaction Grb7/IR (Kasus-Jacobi *et al* 2000), alors que les deux domaines PIR et SH2 sont équitablement impliqués dans l'interaction Grb10/IR (He *et al* 1998). Concernant le récepteur de l'IGF-1, les domaines PIR de Grb10 et Grb14 sont responsables des interactions Grb10/IGF-1R et Grb14/IGF-1R respectivement, alors que les deux domaines PIR et SH2 de Grb7 participent à l'interaction Grb7/IGF-1R (He *et al* 1998, Kasus-Jacobi *et al* 2000, V. Béréziat : données non publiées). Ces différences d'affinité de liaison des domaines PIR et SH2 pourraient être importantes pour la spécificité des interactions entre les différents RTKs et chaque membre de la famille de Grb7.

D'autre part, l'emploi de mutants du récepteur de l'insuline a permis de démontrer que Grb14 interagissait avec le domaine tyrosine kinase du récepteur (Kasus-Jacobi *et al* 1998). En effet, les mutations des résidus tyrosines Y1150 et Y1151, qui ne modifient pas l'activité catalytique du récepteur, abolissent la liaison de Grb14. Grb7 semble également se lier au niveau du site actif du récepteur de l'insuline. Les données concernant Grb10 sont plus complexes. Certaines études tendent à démontrer une interaction impliquant uniquement le domaine catalytique du récepteur de l'insuline (He *et al* 1998, O'Neill *et al* 1996, Dong *et al* 1997b), alors que d'autres suggèrent que le domaine SH2 de Grb10

pourrait en plus se lier aux tyrosines des domaines juxtamembranaire (Y960) et C-terminal (Y1316, Y1322) (Frantz *et al* 1997, Hansen *et al* 1996). Toutefois, si l'on ne prend en compte que les résultats obtenus avec la protéine Grb10 entière, ceux-ci confirment que le site de liaison du récepteur de l'insuline est bien situé au niveau du domaine tyrosine kinase.

Le domaine PIR est un domaine structurellement non caractérisé d'une cinquantaine d'acides aminés, spécifique de cette famille de protéines. Actuellement, il n'est pas encore établi si le PIR se lie directement sur les résidus phosphotyrosines ou si son interaction se fait sur un site de la boucle tyrosine kinase qui ne serait accessible qu'une fois celle-ci en position ouverte après l'autophosphorylation du récepteur. En accord avec cette seconde hypothèse, des expériences de compétition avec des phosphopeptides ont démontré que Grb10 ne se liait pas directement aux résidus phosphotyrosines du site actif (Stein *et al* 2001).

4-b-2 Grb14 : un inhibiteur endogène de l'action de l'insuline

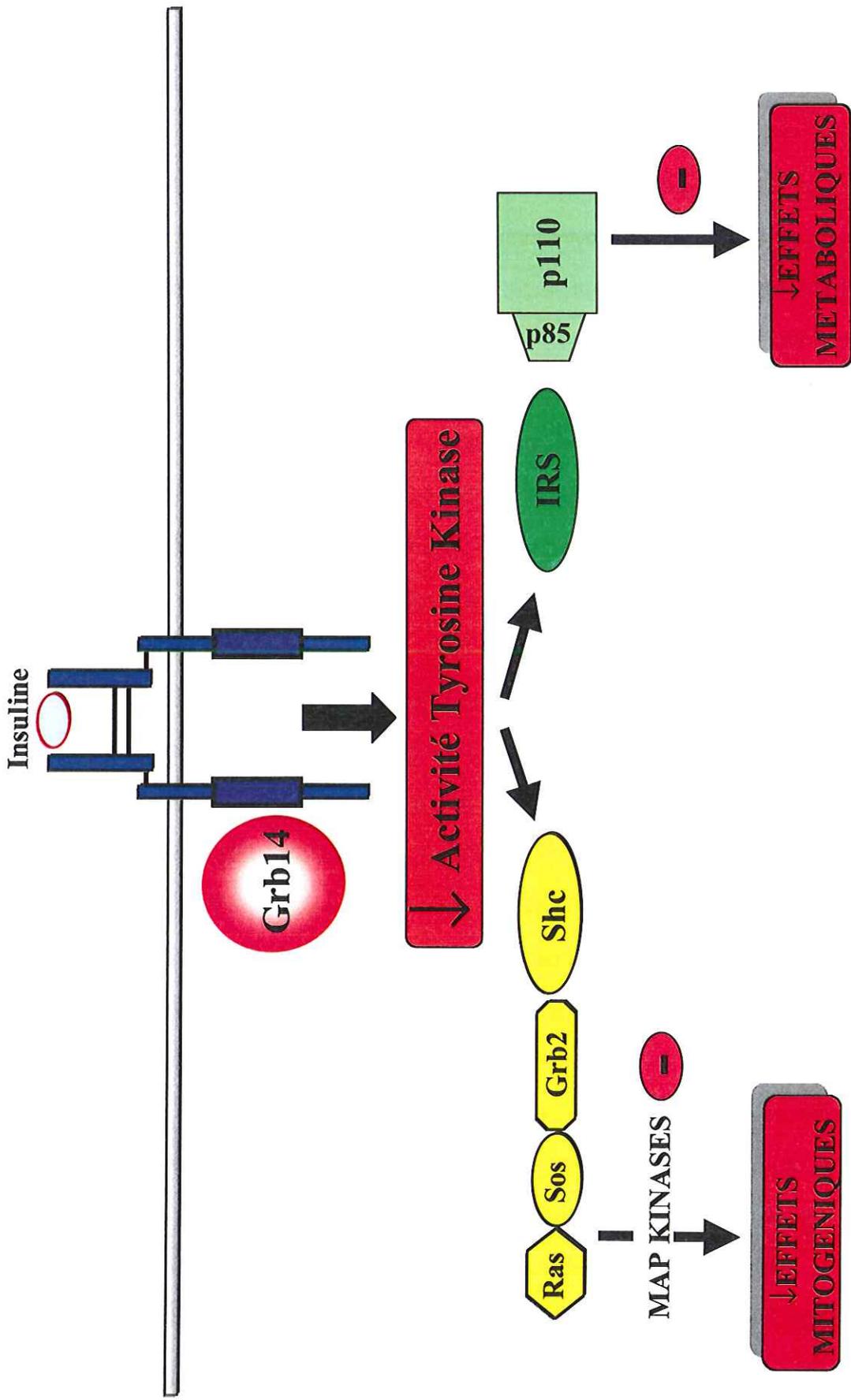
Plusieurs arguments soutiennent l'hypothèse d'une participation de Grb14 dans la signalisation de l'insuline, comme sa distribution tissulaire spécifique ou sa liaison au récepteur de l'insuline activé *in vivo* dans le foie de rat (pour revue Cariou *et al* 2003). De plus, sa fixation directe au niveau de la boucle activatrice du domaine tyrosine kinase laisse supposer que Grb14 pourrait réguler l'activité catalytique du récepteur. Des expériences de mesure de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline ont été réalisées *in vitro* pour valider cette hypothèse (Béréziat *et al* 2002). Ces résultats démontrent que Grb14 inhibe l'activité catalytique du récepteur de l'insuline dirigée contre un peptide synthétique (le poly [Glu :Tyr]), sans modifier son niveau d'autophosphorylation. Dans ces expériences, la constante d'affinité (K_m) pour l'ATP n'est pas modifiée, indiquant que Grb14 agit comme un inhibiteur non-compétitif de l'ATP. D'autre part, Grb14 n'altère pas non plus le K_m du substrat, alors que l'activité catalytique du récepteur est réduite avec une diminution de la V_{max} de 70 à 80%. Il semble donc que Grb14 ne bloque pas l'accès aux sites de liaison de l'ATP et du substrat, mais maintienne le récepteur dans un état phosphorylé conformationnellement

inactif. Cette étude a également permis de démontrer que le domaine PIR est responsable de l'activité inhibitrice de Grb14, alors que le domaine SH2 n'a pas d'effet. Ces données supportent la notion d'un lien direct entre la liaison de Grb14 et son activité fonctionnelle, toutes les deux impliquant le domaine PIR. Cette inhibition de l'activité catalytique du récepteur de l'insuline par Grb14 semble spécifique puisque les autres membres de la famille de Grb7 ont une activité inhibitrice moindre. Grb7 diminue au mieux de 40% l'activité tyrosine kinase du récepteur, alors que la sensibilité du récepteur à l'action inhibitrice de Grb10 est abaissée par rapport à Grb14 (Béréziat *et al* 2002). De manière identique, l'activité catalytique du récepteur de l'IGF-1 est moins sensible à l'action inhibitrice de Grb14 que le récepteur de l'insuline (Béréziat *et al* 2002).

La surexpression de Grb14 dans la lignée fibroblastique CHO-IR a permis d'étudier les conséquences de cette inhibition proximale sur les voies de signalisation et les effets cellulaires de l'insuline en aval. La phosphorylation sur tyrosine d'IRS-1 et de Shc est diminuée dans la lignée CHO/IR/Grb14 par rapport à la lignée CHO/IR (Kasus-Jacobi *et al* 1998, Hemming *et al* 2001). De plus, Grb14 retarde et diminue la phosphorylation des MAP kinases ERK1 et ERK2 en réponse à l'insuline. En revanche, la phosphorylation d'Akt sous stimulation insulinique est certes décalée de 5 à 10 min en présence de Grb14, mais son niveau maximal demeure inchangé (Kasus-Jacobi *et al* 1998). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'activation d'Akt ait été mesurée indirectement par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la phosphosérine 473 (Kasus-Jacobi *et al* 1998). En effet, cette méthode n'est pas toujours parfaitement corrélée à l'activité catalytique réelle de l'enzyme (Hill *et al* 2001). Cependant, la diminution de la phosphorylation et de l'activation des effecteurs intracellulaires du récepteur de l'insuline en présence de Grb14 conduit à une diminution des effets cellulaires distaux de l'insuline, comme la synthèse d'ADN et de glycogène (Kasus-Jacobi *et al* 1998).

En résumé, Grb14 apparaît comme un inhibiteur endogène de l'action de l'insuline, qui agit à un niveau très proximal des voies de signalisation en diminuant l'activité tyrosine kinase du récepteur. Cette inhibition est ensuite à l'origine d'une diminution de l'activation

Schéma 10 : Rôle de Grb14 dans la signalisation de l'insuline



des effecteurs intra-cellulaires et des effets cellulaires de l'hormone (**Schéma 10**). Néanmoins, ces résultats ont été obtenus *in vitro* et dans une lignée fibroblastique et demandent confirmation dans des modèles plus physiologiques.

Concernant le rôle des autres membres de la famille de Grb7 dans la transduction du signal de l'insuline, il n'y a que très peu de données concernant Grb7. Grb7 est capable de se lier au récepteur de l'insuline (Kasus-Jacobi *et al* 2000), mais comme nous venons de le voir, elle a un faible effet inhibiteur sur l'activité catalytique du récepteur (Béréziat *et al* 2002). Une étude très récemment publiée démontre cependant que la microinjection de Grb7 dans l'ovocyte de Xénope est capable d'inhiber la reprise de la méiose induite par l'insuline (Cailliau *et al* 2003). Cet effet inhibiteur de Grb7 sur la signalisation de l'insuline semble médié par les domaines PIR et SH2. En ce qui concerne Grb10, les études sont beaucoup plus nombreuses et ont conduit à des résultats contradictoires. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence un effet inhibiteur de Grb10 sur la signalisation de l'insuline. Ainsi, la surexpression de l'isoforme hGrb10 β dans la lignée fibroblastique CHO-IR diminue la phosphorylation sur tyrosine d'IRS-1 et inhibe de 40% l'activité de la PI 3-kinase (Liu *et al* 1995). Il est à noter que cette isoforme de Grb10 est caractérisée par une extension N-terminale de 58 acides aminés et par la délétion de 48 acides aminés au niveau du domaine PH, dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas connues. Récemment, une étude a démontré que la surexpression de hGrb10 γ , qui possède un domaine PH intact, diminue la phosphorylation d'IRS-1 et d'IRS-2 et l'activation d'Akt dans des adipocytes 3T3-L1 en réponse à l'insuline (Wick *et al* 2003). En accord avec cette observation, l'étude directe de la mesure de l'activité tyrosine kinase *in vitro* démontre que Grb10 (hGrb10 γ) inhibe l'activité catalytique du récepteur de l'insuline (Stein *et al* 2001). Comme pour Grb14, cette inhibition est médiée par le domaine PIR, suggérant l'existence d'un mécanisme d'action commun aux membres de la famille de Grb7.

Inversement, d'autres travaux ont retrouvé un effet positif de Grb10 sur la signalisation et les effets cellulaires de l'insuline. Ainsi, la surexpression de la protéine

entière dans des lignées de fibroblastes stimule la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire en réponse à l'insuline (Wang *et al* 1999). La même équipe a très récemment publié les résultats de la surexpression de la forme entière de mGrb10 α dans des cellules cibles de l'insuline telles que les adipocytes 3T3-L1 et les cellules musculaires L6 (Deng *et al* 2003). Ceux-ci sont clairement en faveur d'un effet positif de Grb10, avec une stimulation de la synthèse de glycogène, du transport de glucose, de la synthèse d'acides aminés et d'acides gras en réponse à l'insuline. A ce titre, il est intéressant de noter que les auteurs proposent un nouveau mécanisme d'action de Grb10, qui passerait par une liaison directe et une activation de la sous-unité p85 de la PI 3-kinase. En effet, dans cette étude, la surexpression de Grb10 stimule l'activité de la PI 3-kinase sans altérer son recrutement par les IRSs (Deng *et al* 2003). Ces discordances sont surprenantes et difficiles à expliquer. Une des hypothèses serait que l'action de Grb10 sur la signalisation de l'insuline varie selon les isoformes en cause. La présence d'un domaine PH, intact ou non, pourrait ainsi avoir des conséquences fonctionnelles. De plus, l'action de Grb10 pourrait être différente selon le type cellulaire ou le type de RTK. Par exemple, la surexpression de mGrb10 α dans des fibroblastes diminue la prolifération cellulaire en réponse à l'IGF-1, alors qu'elle ne modifie pas celle en réponse à l'insuline (Morrione *et al* 1997). Cette action préférentielle inhibitrice de Grb10 sur les effets mitogéniques majoritairement médiés par l'IGF-1, semble confirmée par l'observation chez l'homme d'une duplication d'origine maternelle du gène de Grb10 serait responsable de certains cas de syndrome de Silver-Russel, qui se caractérise par un retard de croissance (Monk *et al* 2000). Enfin, l'inactivation du gène de Grb10 chez la souris entraîne une augmentation de 30% de la taille des souris Grb10 $-/-$ à la naissance, soulignant le rôle crucial de Grb10 dans la croissance cellulaire (Charalambous *et al* 2003). Comme pour Grb14, des études supplémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir préciser l'action de Grb10 sur les effets métaboliques de l'insuline *in vivo*.

4-b-3 Identification d'un nouveau partenaire de Grb14 : la protéine ZIP

La protéine Grb14 ayant été clonée récemment, peu de ses partenaires, hormis les RTKs, ont été identifiés jusqu'à présent. Certes, des protéines comme la tankyrase 2 ou

l'ubiquitine ligase Nedd4 s'associent à Grb14, mais leur rôle fonctionnel n'est pas élucidé (Lyons *et al* 2002, Vecchione *et al* 2003). De par sa nature d'adaptateur moléculaire, Grb14 possède plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine ou protéine-lipides qui le prédisposent à recruter des partenaires de signalisation. Ces partenaires pourraient réguler l'action de Grb14 en modifiant sa localisation sub-cellulaire, en étant à l'origine de modifications post-traductionnelles (comme des phosphorylations-déphosphorylations) ou encore en favorisant sa dégradation.

Dans cette optique, la réalisation d'un crible double hybride d'une banque d'ADNc de foie de rat en utilisant la région C-terminale de Grb14 comme appât nous a permis de cloner la protéine ZIP (PKC Zeta Interacting Protein). Cette interaction entre Grb14 et ZIP a également été détectée entre les protéines endogènes *in vivo* dans le foie de rat (Cariou *et al* 2002). ZIP (ou p62) est un adaptateur moléculaire ubiquitaire qui intervient dans plusieurs voies de signalisation (pour revue Geetha et Wooten 2002). L'analyse de la structure primaire de ZIP met en évidence plusieurs domaines protéiques conservés, à savoir : (i) un domaine PB1 (Phox and Bemp1) N-terminal, un domaine ZZ zinc finger, deux domaines PEST et un domaine particulier d'association à l'ubiquitine UBA (ubiquitin-associated domain) (**Schéma 11**). La protéine ZIP interagit de façon constitutive avec les PKC atypiques ζ (zeta) et λ (lambda) (Puls *et al* 1997, Sanchez *et al* 1998). Le rôle fonctionnel de ZIP le mieux décrit est celui de lien physique entre la PKC ζ et ses substrats (Sanz *et al* 1999, Gong *et al* 1999). Les différentes isoformes de PKCs ne possédant pas de motifs consensus spécifique, la présence de tels adaptateurs moléculaires spécifiques est indispensable pour placer sélectivement chaque isoforme au sein d'une voie de signalisation donnée, et lui conférer ainsi une spécificité d'action par rapport aux autres PKCs (Moscat & Diaz-Meco 2000).

Contrairement aux autres partenaires de Grb14 précédemment décrits, nous avons pu détecter une interaction entre les protéines Grb14 et ZIP endogènes dans le foie de rat. Des expériences d'interaction *in vitro* démontrent que ZIP interagit avec le PIR de Grb14 via son domaine ZZ zinc finger, son domaine PB1 restant libre de lier conjointement la

PKC ζ . Nous avons pu également mettre en évidence l'existence d'un hétérotrimère Grb14-ZIP-PKC ζ dans le foie de rat (Cariou *et al* 2002). L'interaction de ces trois protéines *in vivo* dans un tissu cible de l'insuline est un argument fort en faveur du rôle physiologique de ce complexe multiprotéique dans la signalisation de l'hormone. Cependant, et contrairement à ce qui a été précédemment observé dans les voies de signalisation du TNF α et de l'IL-1 (Sanz *et al* 1999, 2000), la formation de cet hétérotrimère n'est pas stimulée par un traitement par l'insuline (B. Cariou, résultats non publiés).

C'est par analogie avec les modèles précédemment décrits que nous avons émis l'hypothèse que Grb14 était un substrat de la PKC ζ , et que la constitution de l'hétérotrimère Grb14-ZIP-PKC ζ avait pour fonction de favoriser cette phosphorylation. Ceci a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* dans la lignée cellulaire fibroblastique CHO-IR. Le fait que la PKC ζ soit activée en réponse à l'insuline par une voie PI 3-kinase dépendante renforce cette hypothèse (Standaert *et al* 1997). En utilisant des mutants de délétion de Grb14, nous avons également démontré *in vitro* que le domaine PIR était majoritairement phosphorylé par la PKC ζ . Comme nous venons de le voir, le domaine PIR est impliqué dans l'interaction de Grb14 au récepteur de l'insuline, et est responsable de l'inhibition de son activité catalytique (Kasus-Jacobi *et al* 1998, Béréziat *et al* 2002). De façon intéressante, la phosphorylation préalable du domaine PIR par la PKC ζ augmente son activité inhibitrice sur l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline mesurée *in vitro* (Cariou *et al* 2002). Le mécanisme moléculaire n'est pas connu à l'heure actuelle. Cependant, cet effet pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'affinité de liaison de la protéine Grb14 phosphorylée pour le récepteur de l'insuline, ou du maintien de la boucle kinase dans une conformation inactive.

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'une nouvelle boucle de rétrocontrôle négatif du signal de l'insuline, dans laquelle l'adaptateur moléculaire ZIP met en contact la PKC ζ avec Grb14. L'insuline ne stimule pas cette association qui semble constitutive, mais est à l'origine d'une régulation post-traductionnelle de Grb14 en activant sa phosphorylation par la PKC ζ , augmentant ainsi son action inhibitrice. Cet effet a été confirmé

in vivo dans l'ovocyte de Xénope. Ce modèle cellulaire a été largement employé pour étudier les voies de signalisation de plusieurs hormones, dont l'insuline. L'incubation des ovocytes de Xénope, physiologiquement bloqués en prophase de la première division de la méiose, en présence d'insuline permet l'achèvement de la division cellulaire (Grigorescu *et al* 1994). L'injection de Grb14 dans l'ovocyte inhibe la reprise de la méiose induite par l'insuline, confirmant son action inhibitrice sur la signalisation de l'hormone. Tandis que l'injection de ZIP seul n'a aucun effet, il est intéressant de constater que la co-injection de ZIP potentialise l'action inhibitrice de Grb14 sur la reprise de la méiose. Cet effet n'est pas obtenu avec des mutants de ZIP délété de leurs domaines PB1 et/ou ZZ zinc finger, suggérant que la constitution de l'hétérotrimère Grb14-ZIP-PKC ζ est indispensable à l'action de ZIP. Enfin, la phosphorylation *in vitro* de Grb14 par la PKC ζ avant son injection dans l'ovocyte augmente son activité inhibitrice sur la reprise de la méiose en réponse à l'insuline. Ces données obtenues dans un système cellulaire intégré démontrent clairement que ZIP potentialise l'action inhibitrice de Grb14 en favorisant sa phosphorylation par la PKC ζ (Cariou *et al* 2002). L'ensemble de ces données nous a conduit à proposer un nouveau modèle de rétro-contrôle négatif du signal de l'insuline, incluant Grb14, ZIP et la PKC ζ (**Schéma 12**).

Cependant, toutes ces approches expérimentales ont été développées *in vitro* ou dans des modèles cellulaires qui ne sont pas des cibles de l'insuline sur le plan métabolique, ce qui limite l'interprétation physiologique des résultats. L'objectif de ce travail est d'étudier l'expression de Grb14 et de ZIP dans les tissus insulinosensibles (foie, tissu adipeux blanc et muscle squelettique) de modèles animaux d'insulinorésistance et de patients diabétiques de type 2, afin de valider l'importance de ces adaptateurs dans la physiopathologie de l'insulinorésistance.

III - MATERIEL ET METHODES

1 : Animaux

Comme modèles animaux d'insulinorésistance, nous avons choisi d'utiliser des souris *ob/ob* et des rats Goto-Kakizaki (GK). Les souris *ob/ob*, qui ont une mutation du gène de la leptine, se caractérisent par une obésité d'origine centrale, une insulinorésistance périphérique et un diabète d'apparition plus ou moins rapide selon le fond génétique employé (Shafir 1992). Dans cette étude, nous avons utilisé des souris *ob/ob* obtenues à partir du fond génétique C57BL6/J (Janvier, France), qui les prédispose au développement précoce d'un diabète de type 2. Les rats GK, issus de croisements répétés sur un même fond génétique, représentent un deuxième modèle animal de diabète de type 2 (Goto *et al* 1976). Ces rats ne sont pas obèses et sont caractérisés sur le plan métabolique par l'association d'un défaut primaire d'insulinosécrétion et d'une insulinorésistance périphérique secondaire d'apparition progressive (O'Rourke *et al* 1997). Les rats GK nous ont été aimablement fournis par Merck-Lipha-Santé.

Les animaux ont été utilisés pour les expériences à un âge variant de 12 à 14 semaines. A cet âge, les rats GK sont insulinorésistants (O'Rourke *et al* 1997). Les animaux sont maintenus dans une animalerie à température constante, avec un cycle de lumière de 12h (7h-19h). Ils ont un accès libre à l'eau et à une alimentation standard pour rongeurs (79,5% glucide, 3% lipide, 16,5% protéine). Certaines souris *ob/ob* ont été traitées par gavage oral avec de la rosiglitazone (5mg/kg/jour) pendant 10 jours. Les animaux sont mis à jeun 6h avant le début des expériences. Ils sont alors euthanasiés et le foie, le muscle squelettique (quadriceps) et le tissu adipeux péri-épididymaire sont rapidement prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide, avant d'être stockés à -80°C pour les expériences suivantes.

2. Patients diabétiques de type 2 et sujets témoins

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe d'Hubert Vidal (INSERM U449) à Lyon pour les échantillons humains. Tous les patients ont donné leur consentement écrit après avoir été informés de la nature du protocole, de l'objectif de l'étude, ainsi que des possibles risques secondaires. Le protocole expérimental a été approuvé par le comité d'éthique des Hospices Civils de Lyon, en accord avec la loi Huriet. Les caractéristiques cliniques des 42 patients sont représentées dans le **tableau 1**. Les sujets témoins sont de poids normal (BMI entre 18 et 25). Ils n'ont pas d'antécédents familiaux de diabète et ont une tolérance au glucose normale. Les sujets diabétiques de type 2 n'étaient pas sous insuline et ont interrompu, sous surveillance médicale, leur traitement anti-diabétique oral au moins 1 semaine avant les prélèvements. Les biopsies de tissu adipeux d'une part, et celle de muscle d'autre part, sont issues de deux populations différentes de sujets diabétiques et témoins. Il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les caractéristiques cliniques de ces deux groupes de sujets. Le protocole débute après une nuit de jeûne. Tous les sujets ont eu un clamp euglycémique-hyperinsulinémique de 3h dont les données sont représentées dans le **tableau 1**. Les prélèvements utilisés dans cette étude ont été réalisés à l'état basal, avant le début de l'épreuve de clamp. Les biopsies de tissus ont été obtenues sous anesthésie locale (Lidocaïne 2%). Les échantillons de muscle squelettique ont été obtenus à partir de biopsie percutanée du quadriceps (vaste externe) en utilisant un trocard de Weil-Blaskeley. Le poids moyen des biopsies est identique entre les sujets témoins et diabétiques (\approx 60 mg). Le tissu adipeux sous-cutané abdominal a été aspiré en région périombilicale avec une aiguille de 15 gauges. Les échantillons sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour analyses. Environ 250 mg de tissu adipeux ont été utilisés pour l'extraction des ARNm.

Tableau 1
Caractéristiques cliniques des patients

	Biopsies TAB		Biopsies Muscle	
	Témoins	DT2	Témoins	DT2
N (F/M)	9 (7/2)	9(3/6)	12(8/4)	12(9/3)
Age (années)	36 ± 5	57 ± 2 **	40 ± 4	52 ± 2 *
Poids (kg)	60 ± 2	79 ± 4 **	64 ± 2	79 ± 3 **
IMC (kg/m ²)	21.8 ± 0.5	30.5 ± 1.5 **	22.9 ± 0.5	30.6 ± 1.1 **
Glycémie à jeun (mmol/l)	4.8 ± 0.1	12.1 ± 1 **	4.6 ± 0.1	12.3 ± 0.9 **
Insulinémie à jeun (pmol/l)	32.3 ± 1.9	59.6 ± 9 *	30.4 ± 1.7	66.4 ± 8 **
Triglycérides (mmol/l)	687 ± 82	1290 ± 152 **	615 ± 45	1960 ± 491 *
Epreuve de Clamp				
Glucose (mmol/l)	5.3 ± 0.3	5 ± 0.1	4.3 ± 0.2	5.2 ± 0.1
Insuline (pmol/l)	1008 ± 81	1040 ± 51	938 ± 94	1 047 ± 70
Glucose disposal rate (mg/kg/min)	10.3 ± 0.1	4.1 ± 0.7 **	11.9 ± 0.5	2.8 ± 0.1 **
Glucose oxidation rate (mg/kg/min)	4.1 ± 0.3	2.25 ± 0.2 *	3.6 ± 0.3	2.1 ± 0.1 **
Nonoxidative glucose disposal rate (mg/kg/min)	7 ± 0.4	1.8 ± 0.6 **	7.8 ± 0.5	1.3 ± 0.3 **

* P<0.05, ** P<0.01 diabétiques de type 2 (DT2) vs témoins

3. Analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel par la méthode SYBR Green en LightCycler

Principe : Le SYBR Green est un fluorophore, spécifique de l'ADN double brin, qui n'émet de la fluorescence que lorsqu'il est lié à sa cible. L'intensité de la fluorescence sera donc proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présent dans la solution. Durant chaque phase d'élongation, le SYBR Green se fixe aux produits de PCR amplifiés et à la fin de chaque cycle, il est détecté grâce à sa fluorescence par un microspectrofluorimètre intégré dans le thermo-cycleur.

Extraction des ARN : Les ARN totaux sont extraits à partir de la poudre des tissus broyés grâce à un kit RNeasy (Quiagen). La poudre est solubilisée dans un tampon hautement dénaturant contenant de l'isothiocyanate de guanidine (RLT) qui permet l'inactivation immédiate des Rnases. De l'éthanol (35%) est ajouté aux lysats et après homogénéisation, les échantillons sont déposés sur la mini-colonne. Par la suite, les ARN (d'une longueur supérieure à 200 bases) sont sélectivement retenus sur la mini-colonne à l'intérieur de laquelle se trouve une membrane en gel de silice. Après lavages, les ARN sont élués avec 30 µl d'eau autoclavée. La concentration des ARN obtenus est déterminée au spectrophotomètre par mesure de densité optique (DO) à 260 nm correspondant au pic d'absorbance des acides nucléiques (1 unité de DO correspond environ à 40 µg d'ARN/ml). L'absence de contamination par des protéines est vérifiée en mesurant la DO à 280 nm, le rapport DO 260/ DO 280 devant être compris entre 1,8 et 2.

Reverse transcription : Après leur extraction, les ARN totaux (1 µg) sont rétro-transcrits. Une première étape de 5 minutes à 65°C permet aux ARN d'être dénaturés (solution de 11µl). La synthèse d'ADNc se fait ensuite pendant 1 heure à 42°C dans un volume de 20 µl composé de la solution d'ARN supplémentée de 250 ng de random hexamer (Promega), de 250 ng d'oligo dT (Promega), de 0,5 mM de chaque dNTP, de 10 mM de dithiothréitol, de Buffer Script II 1x (50 nM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), et de

100 unités de l'enzyme Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

PCR en temps réel : La PCR en temps réel est réalisée grâce à un thermo-cycleur LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) selon les instructions du fabricant. Les réactions de PCR sont effectuées dans un volume final de 20µl avec 5 µl d'une dilution au 1/60 des ADNc obtenus précédemment, 0.5 µM de chaque oligonucléotide spécifiquement choisi, 0.5 µM MgCl₂ et le mix LightCycler DNA Master SYBR Green I 1X, comprenant la Taq ADN polymérase et la molécule fluorescente SYBR (Roche Molecular Biochemicals). La réaction complète de PCR dure environ 45min. Le protocole comporte une activation de la Taq Hot Start (10 min à 95°C) suivi de 40 cycles avec : une étape de dénaturation (15 sec à 95°C), une étape d'hybridation (7 sec à 58°C), et une étape d'élongation (15 sec à 72°C). La détection de la fluorescence s'effectue à la fin de la phase d'élongation, à chaque cycle. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN, puis elle est abaissée à la température de couplage (65°C) ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée ce qui permet de tracer la courbe de température de fusion (dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température). Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion spécifique, définie comme étant la température pour laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Ceci permet de montrer la spécificité des produits d'amplification. La quantification des produits de PCR ne peut se faire qu'après normalisation par un gène de référence. Ce gène de référence est un gène dont l'expression n'est pas soumise à régulation. Le gène utilisé ici est celui de la cyclophiline. Les ADNc sont donc traités une première fois avec les oligonucléotides de la cyclophiline puis la même expérience est faite dans les mêmes conditions mais avec les oligonucléotides du gène d'intérêt: Grb14 ou ZIP. Pour chaque échantillon, les valeurs obtenues pour le gène d'intérêt sont exprimées par rapport aux valeurs obtenues pour la cyclophiline.

Oligonucléotides utilisés :

- Cyclophiline	anti-sens:	TTGCCATTCTGGACCCAAA
	Sens (Rat, homme) :	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC
	Sens (souris) :	ATGGCACTGGCGGCAGGTCC
- Grb14	anti-sens :	GTTACTCTGACTATCCCGTACC
	sens :	CGGTCCCAGCCATGGTTTCAC
-ZIP	anti-sens :	CTGGTGAGCCAGCCGCCTTCAT
	sens :	GGACCCACAGGGCTGAAGGAAG

4. Analyse de l'expression des protéines par Western blot

Les tissus sont réduits en poudre dans un mortier refroidi à l'azote liquide, puis solubilisés dans un tampon de lyse (Tris HCL 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Pyrophosphate 30 mM, NaF 50mM) complétement extemporanément avec 1% Triton et 1 mM Orthovanadate, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), Pepstatine (1 µg/ml), Leupeptine (2 µg/ml), Aprotinine (2,4µl/ml) afin d'en extraire les protéines. Après une heure de lyse à 4°C, les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 13000 rpm à 4°C. Les surnageants sont stockés à - 80°C. La concentration de protéines est déterminée par la méthode de Bradford en utilisant un réactif de Bradford commercialisé par BIO-RAD. Les échantillons de lysats sont incubés avec une dilution de réactif Bio Rad (1/5^{ème}) et la densité optique du mélange est lue à une longueur d'onde de 595nm. La concentration en mg de protéine par ml est alors déterminée grâce à une gamme étalon effectuée à partir de sérum albumine bovine. Des échantillons de 25µg de protéines sont repris dans du tampon de Laemmli (Tris-HCl 150mM pH6,8 ; glycérol 25 % ; SodiumDodécylSulfate (SDS) 10%, β-mercaptoéthanol 12,5% et 2,4% de bleu de bromophénol) et chauffés à 95°C pendant 5 min. Le pourcentage en polyacrylamide des gels est de 10%. Le tampon utilisé lors de la migration est un tampon Tris 0,025M, Glycine 0,192M contenant 10% de SDS. Une fois la migration effectuée les protéines sont transférées électriquement en milieu semi-sec sur une

membrane de nitrocellulose (PROTAN, Schleicher and Schuell). Le tampon de transfert utilisé est préparé à partir du tampon de migration supplémenté de 20% d'éthanol. Une coloration de la membrane au rouge Ponceau, colorant spécifique des protéines, est réalisée pour vérifier que les quantités de protéines transférées sont identiques. Après le transfert, les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués dans du tampon TBST (20mM Tris HCl pH 7,6 ; 137mM NaCl ; 0,1% Tween 20) contenant soit 5% de lait écrémé en poudre, soit 5% de BSA (sérum albumine bovine, Roche, Facteur V), soit un mélange des deux et ce pendant une nuit à 4°C. La membrane est ensuite hybridée 4 heures avec les anticorps polyclonaux anti-Grb14 (1/3000^{ème}) (Kasus-Jacobi *et al* 1998) ou anti-ZIP (1/3000^{ème}) (Cariou *et al* 2002), puis lavée 2 fois 20 minutes et 1 fois 10 minutes dans du tampon TBST. Elle est alors incubée avec un second anticorps dirigé contre les IgG de lapin du premier anticorps et couplé à une peroxydase. La membrane est de nouveau lavée puis révélée à l'aide du kit ECL (Amersham). Le réactif de ce kit contient du luminol, qui après oxydation par la peroxydase va entraîner l'émission d'une lumière capable d'impressionner un film autoradiographique.

5 – Culture cellulaire

La cellules 3T3-F442A sont issues d'une lignée de fibroblastes immortalisés de souris qui ont la capacité de se différencier en adipocytes. Cette lignée est cultivée dans le milieu essentiel minimum de Eagle modifié par Dubelco (DMEM) + 4,5 g/l Glucose + pyridoxine HCL + d-biotine 33 mM + acide pantothénique 17 mM dans lequel on ajoute extemporanément Glutamine (2,4mM) + Pénicilline 100 UI/ml + Streptomycine 50 mg/ml + 10 % sérum de veau foetal ou nouveau-né (milieu complet). Les cellules sont entretenues dans un milieu complet contenant du sérum de nouveau-né. La différenciation des 3T3-F442A se fait après confluence des cellules et nécessite l'ajout de 30 nM d'insuline au milieu complet. Les cellules sont passées en sérum de veau foetal pendant la différenciation. Les cellules sont utilisées pour les expériences 7 jours après le début de la différenciation. A cinq

jours de différenciation, les adipocytes 3T3-F442A sont maintenues pendant 48h dans un milieu complet sans ajout d'insuline. Les cellules sont passées dans un milieu sans sérum. 16h avant la stimulation par l'insuline, le TNF α ou les TZDs.

Pour l'extraction des ARN totaux, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées deux fois avec du tampon phosphate salin PBS. Les cellules sont ensuite grattées avec une spatule stérile dans du tampon RLT (kit RNeasy, QIAGEN) supplémenté de β -mercaptoéthanol (10 μ l/ml de tampon). Les lysats peuvent être conservés à -20°C en attendant l'extraction. Pour l'obtention de protéines, tout comme pour l'extraction d'ARN, les cellules sont lavées au PBS mais elles sont ensuite grattées non stérilement dans un tampon de lyse, comme décrit ci-dessus.

Le TNF α est produit par Sigma, la pioglitazone et la troglitazone par Sankyo.

6- Statistiques

Les résultats représentent les moyennes de n expériences \pm SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées en utilisant le test *t* de student pour des échantillons non appariés. Des valeurs de $P < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

IV - RESULTATS

1 : Expression de Grb14 et ZIP dans les tissus insulino-sensibles des souris *ob/ob* et des rats Goto-Kakizaki

Dans un premier temps, nous avons utilisé des souris *ob/ob* et des rats GK, qui sont des modèles animaux de diabète de type 2 bien validés dans la littérature (Shafirir 1992). Nous avons étudié l'expression des adaptateurs Grb14 et ZIP dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux de ces animaux. Pour cela, nous avons réalisé des RT-PCR quantitative en temps réel et des analyses par Western blot pour mesurer respectivement, les concentrations d'ARNm et de protéines.

La concentration des ARNm de Grb14 est significativement augmentée dans le tissu adipeux des souris *ob/ob* et des rats GK comparée aux animaux témoins, respectivement de $106 \pm 41\%$ ($P < 0.05$) et de $112 \pm 41\%$ ($P < 0.05$). En revanche, on ne note pas de différence au niveau du foie des souris *ob/ob* et du foie et du muscle squelettique des rats GK (**Figure 1A**). L'expression de la protéine Grb14 est parallèlement augmentée dans le tissu adipeux des souris *ob/ob* et des rats GK, respectivement de $72 \pm 22\%$ ($P < 0.05$) et de $75 \pm 15\%$ ($P < 0.01$), comparée aux contrôles. (**Figure 1B**). Comme attendu, la concentration de la protéine Grb14 ne varie pas au niveau des autres tissus cibles de l'insuline chez ces animaux. Ces résultats démontrent que l'expression de Grb14 est augmentée dans le tissu adipeux de deux modèles animaux d'insulinorésistance différents.

Nous avons ensuite analysé l'expression de ZIP sur ces mêmes échantillons. La concentration des ARNm de ZIP ne varie pas de façon significative dans le foie, le muscle squelettique ou le tissu adipeux des rats GK (**Figure 2A**). Par contre, la concentration des ARNm de ZIP est augmentée de $69 \pm 8\%$ ($P < 0.01$) dans le tissu adipeux des souris *ob/ob* par rapport aux souris témoins, tandis qu'il n'y a aucune différence au niveau hépatique (**Figure 2A**). Cette augmentation de l'expression des ARNm est corrélée à une augmentation de la concentration des protéines de $65\% \pm 10\%$ ($P < 0.01$) dans le tissu

Figure 1:

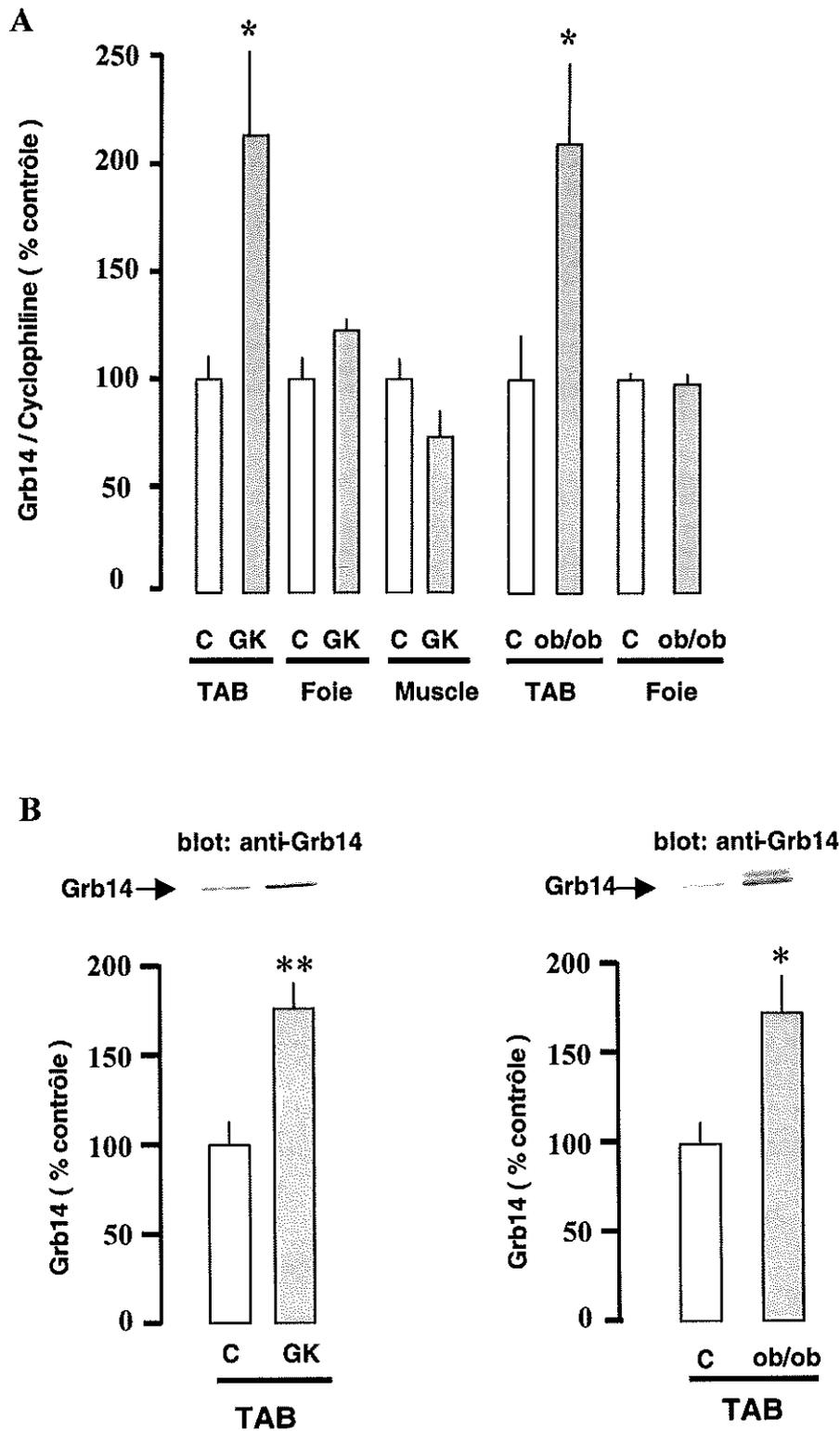


Figure 1 : Expression des ARNm (A) et des protéines (B) de Grb14 dans le tissu adipeux blanc (TAB), le foie et le muscle squelettique des souris *ob/ob* et des rats GK. (A) Des échantillons tissulaires de souris *ob/ob*, de rats GK ou d'animaux témoins sont analysés par RT-PCR quantitative en temps réel. La concentration d'ARNm de Grb14 est normalisée par rapport à celle de la cyclophiline, et est exprimée en % des contrôles. (B) Les mêmes échantillons tissulaires sont soumis à une analyse par Western blot avec des anticorps anti-Grb14. Les concentrations de la protéine Grb14 sont analysées par densitométrie (ChemiGenius2 Syngène). Les résultats sont la moyenne \pm SE de six animaux par groupe.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ par rapport à la concentration de Grb14 dans les contrôles.

adipeux des souris *ob/ob* (**Figure 2B**). Nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence en terme d'expression de la protéine ZIP, ni dans les tissus cibles de l'insuline chez le rat GK ni dans le foie des souris *ob/ob*. En résumé, l'expression de ZIP est parallèle à celle de Grb14 chez les souris *ob/ob*, mais non chez les rats GK.

2 : Expression de Grb14 et ZIP dans le tissu adipeux et le muscle des diabétiques de type 2

Afin de vérifier si l'augmentation de l'expression de Grb14 et de ZIP retrouvée dans les deux modèles animaux d'insulinorésistance étudiés est également présente chez l'homme, nous avons étudié l'expression des ARNm de Grb14 et de ZIP dans le tissu adipeux sous-cutané et le muscle squelettique de patients diabétiques de type 2. La quantité des échantillons de tissu disponibles était trop faible pour pouvoir effectuer l'analyse de l'expression des protéines. Néanmoins, nous avons pu constater qu'il existait une bonne corrélation entre les niveaux d'expression des ARNm et des protéines pour Grb14 et ZIP chez l'animal.

Les caractéristiques cliniques des sujets diabétiques de type 2 et témoins sont représentées sur le **tableau 1**. Comme attendu, les concentrations plasmatiques de glucose, d'insuline et de triglycérides, mesurées après une nuit de jeun, sont significativement plus élevées chez les diabétiques que chez les témoins. Les données du clamp euglycémique-hyperinsulinémique confirment que les patients diabétiques de type 2 sont bien insulinorésistants. On observe ainsi une diminution de plus de 60% de l'utilisation du glucose chez les diabétiques comparés aux témoins. Par ailleurs, l'indice de masse corporelle étant significativement plus élevé chez les diabétiques que chez les témoins, on ne peut faire la part de ce qui est lié au diabète de type 2 et à l'obésité dans ces expériences. On peut noter enfin, que les diabétiques de type 2 sont significativement plus âgés que les sujets contrôles.

L'expression basale des ARNm de Grb14 et de ZIP a été déterminée par RT-PCR quantitative en temps réel. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la cyclophiline

Figure 2:

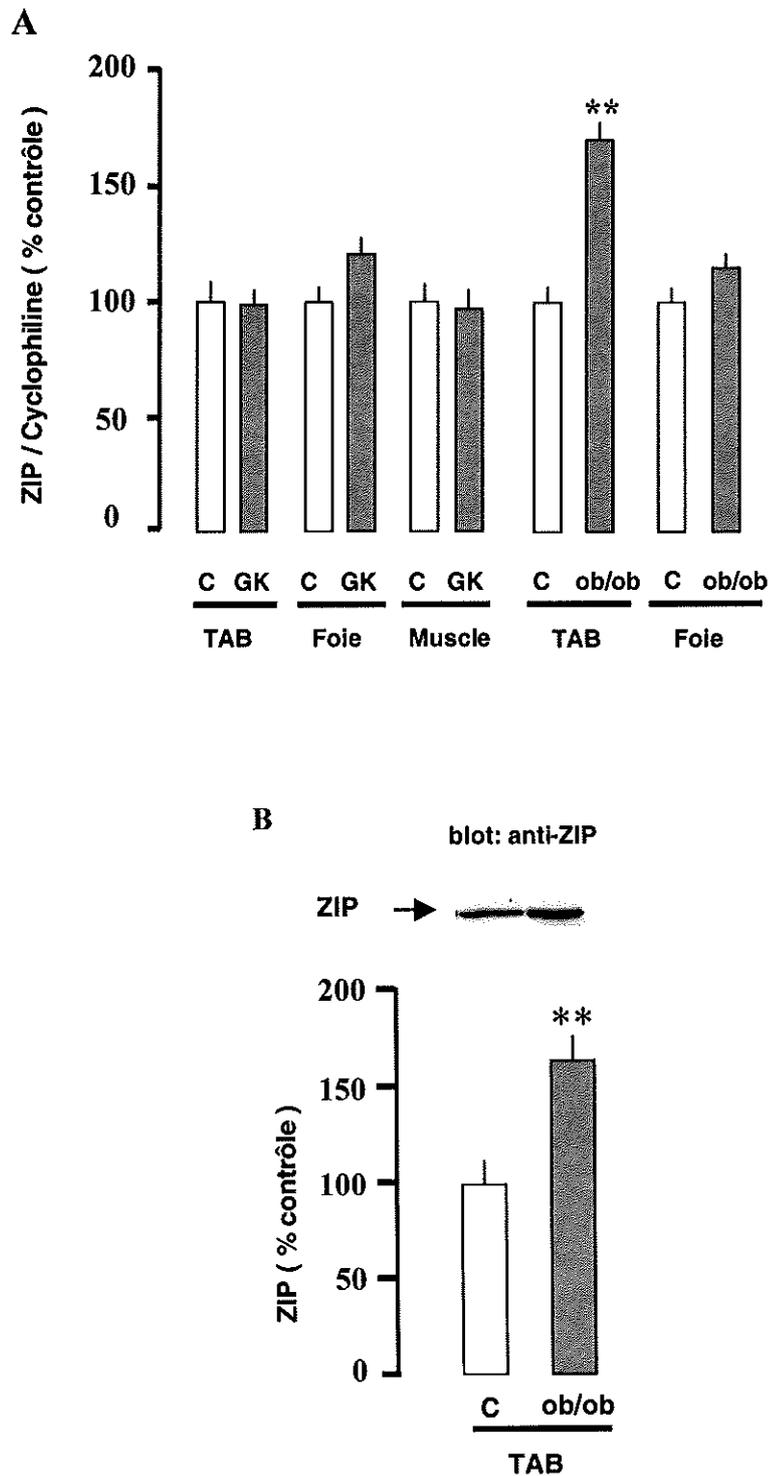


Figure 2 : Expression des ARNm (A) et des protéines (B) de ZIP dans le tissu adipeux blanc (TAB), le foie et le muscle squelettique des souris *ob/ob* et des rats GK. (A) Des échantillons tissulaires de souris *ob/ob*, de rats GK ou d'animaux témoins sont analysés par RT-PCR quantitative en temps réel. La concentration des ARNm de Grb14 est normalisée par rapport à celle de la cyclophiline, et est exprimée en % des contrôles. (B) Les mêmes échantillons tissulaires sont soumis à une analyse par Western blot avec des anticorps anti-ZIP. Les concentrations de la protéine Grb14 sont analysées par densitométrie (ChemiGenius2 Syngène). Les résultats sont la moyenne \pm SE de six animaux par groupe. ** $P < 0.01$ par rapport à la concentration de Grb14 dans les contrôles.

utilisée comme gène de référence. Il faut noter que dans le tissu adipeux et le muscle squelettique humains, la concentration de l'ARNm de Grb14 est 5 à 10 fois moindre que celle de ZIP. De manière intéressante, l'expression de Grb14 est augmentée de $43 \pm 10\%$ ($P < 0.05$) dans le tissu adipeux des diabétiques, par rapport aux témoins. Inversement, on observe une diminution non significative de la concentration des ARNm de Grb14 dans le muscle des diabétiques (**Figure 3A**). Concernant ZIP, l'expression des ARNm est fortement augmentée de $150 \pm 29\%$ ($P < 0.01$) dans le tissu adipeux des diabétiques de type 2, comparés aux témoins. De plus, la concentration des ARNm de ZIP est également augmentée de $50 \pm 14\%$ ($P < 0.01$) dans le muscle squelettique des diabétiques de type 2 (**Figure 3B**).

L'ensemble de ces expériences confirme que l'expression de Grb14 et de ZIP est augmentée dans le tissu adipeux en cas de diabète de type 2, aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme.

3 : Régulation de l'expression de Grb14 et ZIP dans la lignée adipocytaire 3T3-F442A

Dans un deuxième temps, nous avons voulu identifier les facteurs hormonaux capables d'affecter la sensibilité à l'insuline qui pourraient être impliqués dans le contrôle de l'expression des adaptateurs moléculaires Grb14 et ZIP au niveau du tissu adipeux. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la lignée adipocytaire 3T3-F442A comme modèle d'étude *in vitro*. Il a été précédemment démontré que ces cellules expriment la protéine Grb14 au cours de leur différenciation (Kasus-Jacobi *et al* 1998). Par ailleurs, nous avons également vérifié par des expériences de Western blot que ces adipocytes expriment bien la protéine ZIP. Nous avons ainsi testé l'effet de l'insuline, du $\text{TNF}\alpha$ et de l'hyperglycémie sur l'expression de Grb14 et de ZIP.

L'incubation des adipocytes 3T3-F442A en présence de 100 nM d'insuline pendant 24h est responsable d'une augmentation de l'expression des ARNm de Grb14 de $130 \pm 10\%$

Figure 3

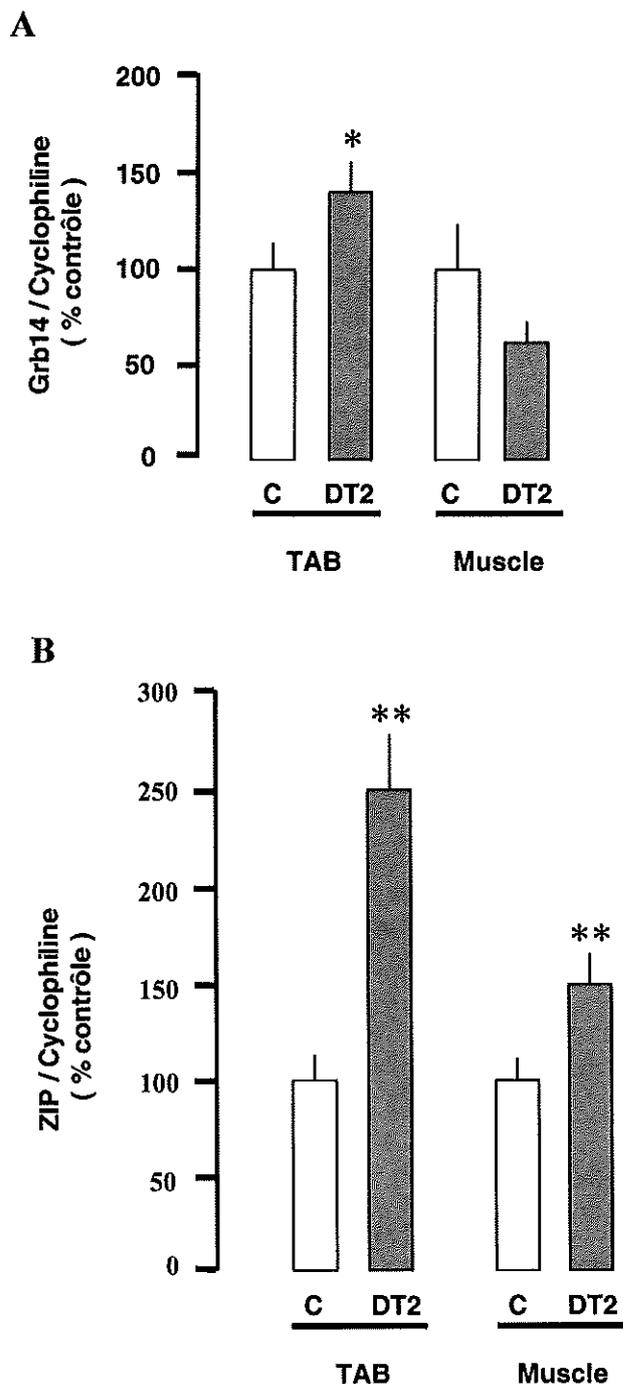


Figure 3 : Expression des ARNm de Grb14 (A) et ZIP (B) dans le tissu adipeux blanc (TAB) et le muscle de patients diabétiques de type 2 (DT2) et de sujets contrôles (C). Les ARNm des gènes cibles sont quantifiés par RT-PCR en temps réel sur des préparations d'ARN totaux issues de biopsies du vaste externe ou de la graisse sous-cutanée péri-ombilicale. Les concentrations des ARNm de Grb14 et de ZIP sont normalisées par rapport à celle de la cyclophiline et exprimées en % des contrôles. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE (n = 9-12).

* P < 0.05, ** P < 0.01 par rapport aux sujets contrôles.

par rapport aux cellules non traitées ($P < 0.01$) (**Figure 4A**). Inversement, l'expression des ARNm de ZIP est diminuée de $60 \pm 2\%$ ($P < 0.01$) dans les mêmes conditions (**Figure 4B**). L'expression maximale de Grb14 sous stimulation insulinique est observée après 24h d'incubation. De plus, cette stimulation par l'insuline est réversible, puisqu'elle disparaît 24h après la suppression de l'insuline du milieu de culture (*résultats non montrés*). De manière encore plus convaincante, les analyses par Western blot révèlent que l'expression de la protéine Grb14 est augmentée d'un facteur 3 en réponse à l'insuline (100 nM pendant 24h) ($P < 0.01$) (**Figure 4C**).

Le $TNF\alpha$ a été initialement identifié comme une cytokine pro-inflammatoire produite par les macrophages et les lymphocytes. Il a été démontré que l'adipocyte exprimait et sécrétait du $TNF\alpha$, et que la régulation de cette production pouvait jouer un rôle majeur dans l'apparition de certains états d'insulinorésistance (Moller 2000). Un traitement des adipocytes 3T3-F442A par 10 ng/ml de $TNF\alpha$ pendant 24h ne modifie pas de façon significative l'expression des ARNm de Grb14 (**Figure 4A**). En revanche, l'expression des ARNm de ZIP est augmentée de $95 \pm 25\%$ ($P < 0.01$) dans ces mêmes conditions (**Figure 4B**).

Nous avons également testé l'effet de l'hyperglycémie dans ces cellules en les cultivant pendant 24h à deux concentrations de glucose différentes: 5 mM ou 25 mM. L'expression des ARNm de Grb14 ou de ZIP n'est pas modifiée en présence d'une forte concentration de glucose (**Figure 4A/B**).

En résumé, l'insuline stimule l'expression de Grb14 *in vitro* dans les adipocytes 3T3-F442A, tandis que le $TNF\alpha$ augmente celle de ZIP.

4. Effet des thiazolidinediones sur l'expression de Grb14

Les thiazolidinediones (TZDs) sont des agents insulino-sensibilisateurs qui sont utilisés en pratique clinique courante dans le traitement du diabète de type 2. Le mécanisme d'action de ces molécules reste discuté à l'heure actuelle. Il semble néanmoins admis que les TZDs agissent principalement au niveau du tissu adipeux en améliorant

Figure 4:

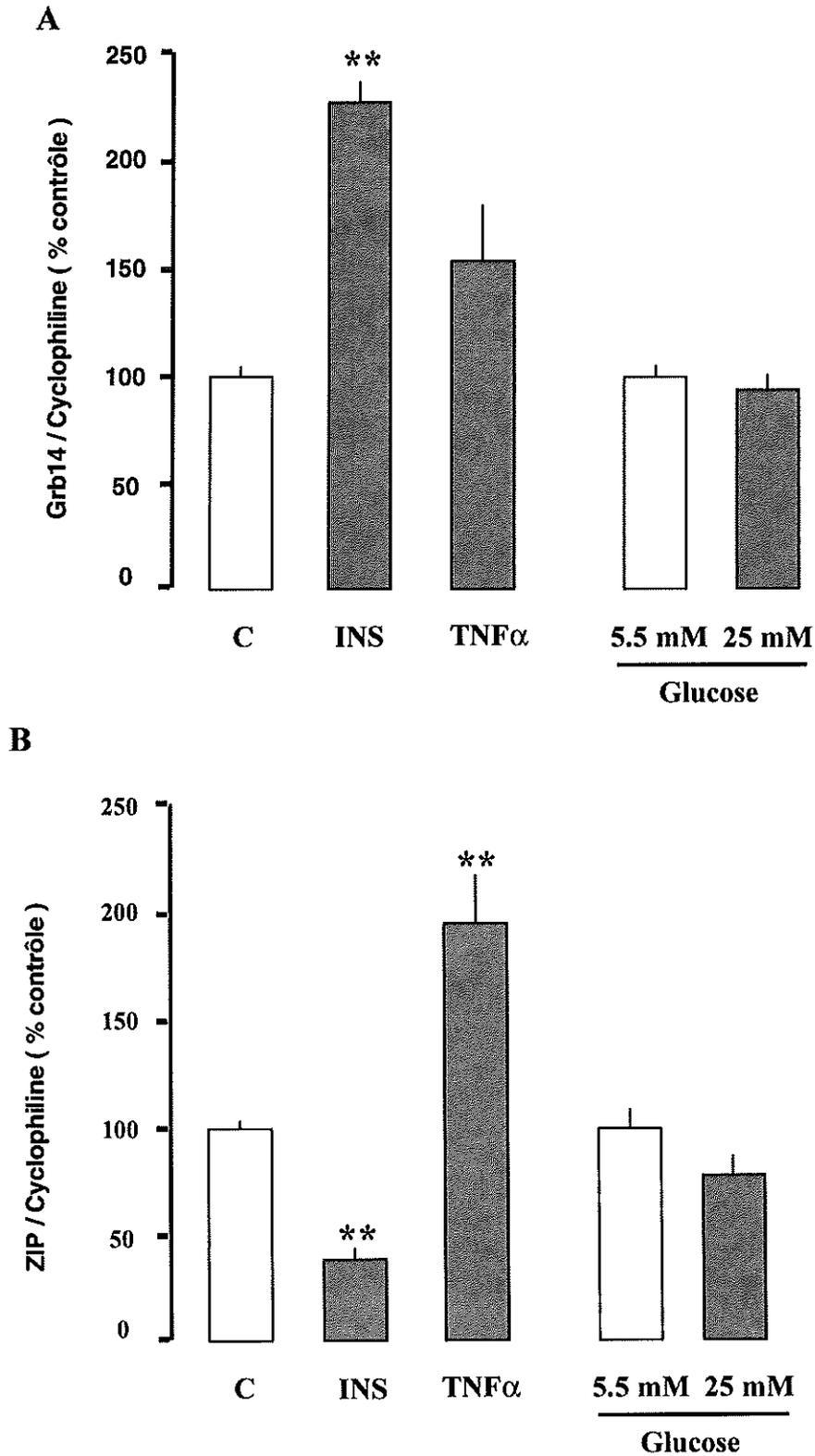


Figure 4A/4B. Régulation hormonale de l'expression de Grb14 (A) et ZIP (B) dans la lignée adipocytaire 3T3-F442A. Des adipocytes 3T3-F442A différenciés sont cultivés sans sérum pendant 16h avant l'ajout d'insuline (INS, 100nM), de TNF α (10 ng/ml) ou de glucose pour 24h. Les ARNm des gènes cibles sont quantifiés par RT-PCR en temps réel. Les concentrations des ARNm de Grb14 et de ZIP sont normalisées par rapport à celle de la cyclophiline et exprimées en % des cellules non traitées. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE (n = 3). ** P<0.01 par rapport cellules non traitées.

l'insulinorésistance et en contrôlant la production d'adipocytokines, qui régulent dans un second temps la sensibilité à l'action de l'insuline au niveau hépatique et musculaire (Girard 2002). Nous venons de voir que l'expression de Grb14, un inhibiteur du récepteur de l'insuline, est augmentée dans le tissu adipeux en cas d'insulinorésistance. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'action insulinosensibilisatrice des TZDs au niveau adipocytaire pourrait passer par un contrôle de l'expression de Grb14. Pour la vérifier, nous avons utilisé deux approches expérimentales. La première *in vitro* en incubant les adipocytes 3T3-F442A avec de la pioglitazone ou de la troglitazone. La seconde *in vivo* en traitant des souris *ob/ob* par de la rosiglitazone.

4-a : *In vitro* dans les adipocytes 3T3-F442A

Il est intéressant de noter que l'incubation des adipocytes 3T3-F442A pendant 48h avec 1 μM de pioglitazone diminue l'expression des ARNm de Grb14 de $66 \pm 2\%$ ($P < 0.01$). L'effet de la pioglitazone est dose-dépendant, avec une diminution de l'expression des ARNm de Grb14 observée dès des concentrations de 100 nM (**Figure 5A**). Encore une fois, cette diminution de l'expression des ARNm s'accompagne en parallèle d'une diminution de l'expression de la protéine Grb14. En effet, celle-ci est significativement diminuée de 64% ($P < 0.01$) après 48h de traitement par 1 μM de pioglitazone (**Figure 5B**). De plus, un traitement par une autre molécule, la troglitazone (1 μM pendant 48h) diminue également l'expression de la protéine Grb14 de 32% ($P < 0.05$). En revanche, un traitement des adipocytes par les TZDs ne modifie pas l'expression de ZIP dans les mêmes conditions expérimentales (*résultats non montrés*).

4-b : *In vivo* chez la souris *ob/ob*

Afin de confirmer ces données obtenues *in vitro*, nous avons ensuite comparé l'expression des protéines Grb14 et ZIP dans le tissu adipeux et le foie de souris traitées par

Figure 5:

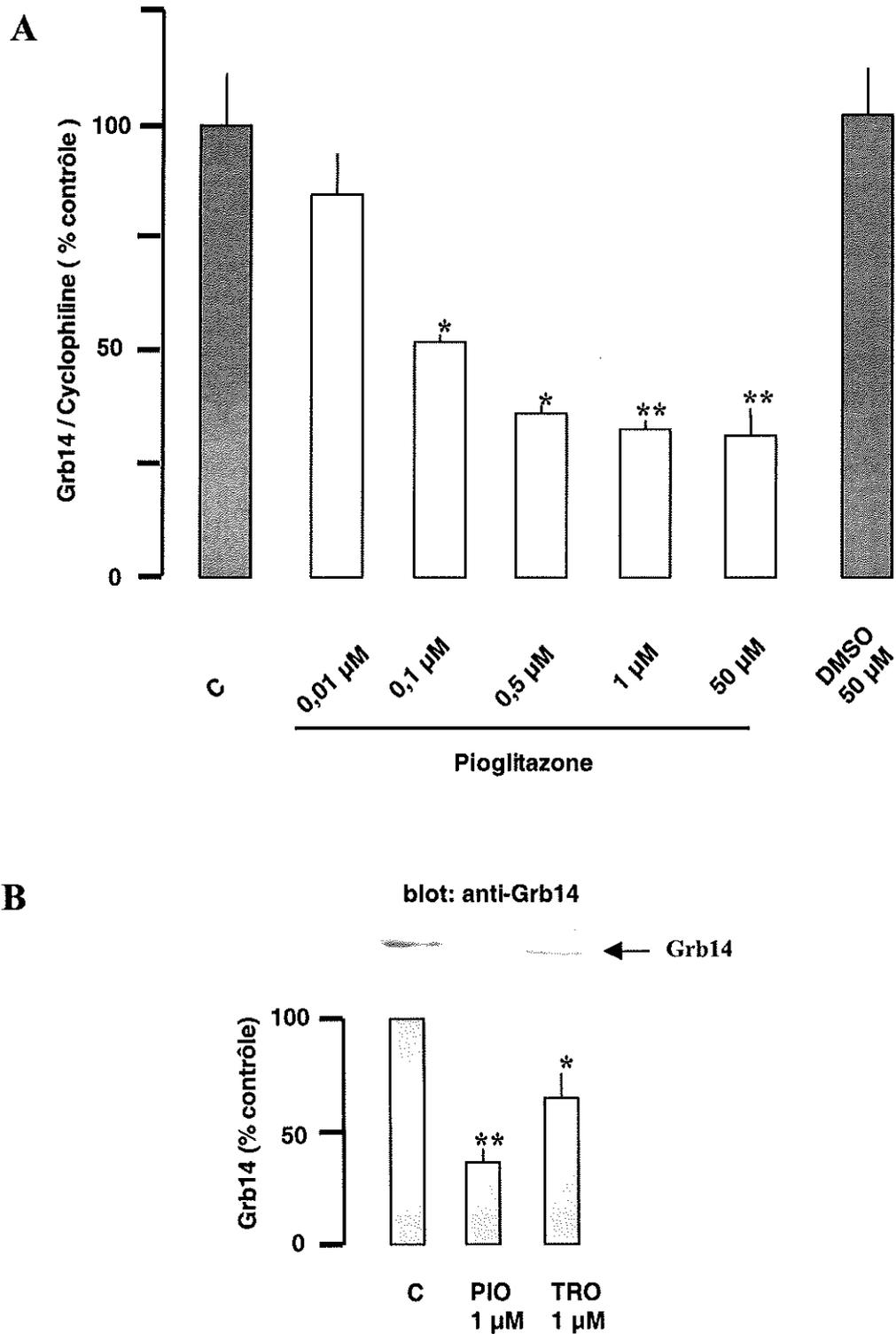


Figure 5: Effet des TZDs sur l'expression des ARNm (**A**) et de la protéine (**B**) Grb14 dans la lignée adipocytaire 3T3-F442A. Des adipocytes différenciés 3T3-F442A sont incubés pendant 48h avec les concentrations indiquées de Pioglitazone (PIO), Troglitazone (TRO) ou de DMSO (utilisé comme contrôle). Les concentrations d'ARNm et de protéine sont analysées par RT-PCR en temps réel et par Western blot, respectivement. La concentration des ARNm de Grb14 est normalisée par rapport à celle de la cyclophiline et exprimée en % des cellules non traitées. Un blot représentatif des expériences est montré dans la partie supérieure de la figure 5B. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SE ($n = 3-5$).

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ par rapport aux cellules non traitées.

de la rosiglitazone (5 mg/kg pendant 10 jours) à celle de souris témoins non traitées. Comme indiqué sur le **tableau 2**, le traitement par la rosiglitazone a été efficace avec une réduction d'environ 60% des valeurs de glycémie et d'insulinémie chez les souris traitées. Cependant, l'expression de Grb14 n'est pas diminuée de façon significative dans le tissu adipeux des souris *ob/ob* par rapport aux souris contrôles (**Figure 6**). De manière surprenante, le traitement par la rosiglitazone diminue l'expression de Grb14 au niveau hépatique de $27 \pm 5\%$ ($P < 0.001$). Concernant la protéine ZIP, la rosiglitazone ne modifie pas son expression *in vivo* (*résultats non montrés*).

Tableau 2

Effets de la rosiglitazone (5 mg/kg pendant 10 jours) sur les paramètres métaboliques des souris *ob/ob*

	Souris <i>ob/ob</i> non traitées (n=6)	Souris <i>ob/ob</i> traitées (n=6)
Poids (g)	4 9.3 ± 1.1	4 8 ± 1.4
Glucose (mmol/l)	19.8 ± 2	8.4 ± 1**
Insuline (pmol/l)	2533 ± 427	1 091 ± 280*
Acides gras libres (mmol/l)	0.86 ± 0.08	0.58 ± 0.05*
Triglycerides (mg/dl)	53 ± 4	34 ± 2**

*** P<0.05, ** P<0.01 souris traitées vs non traitées**

Figure 6

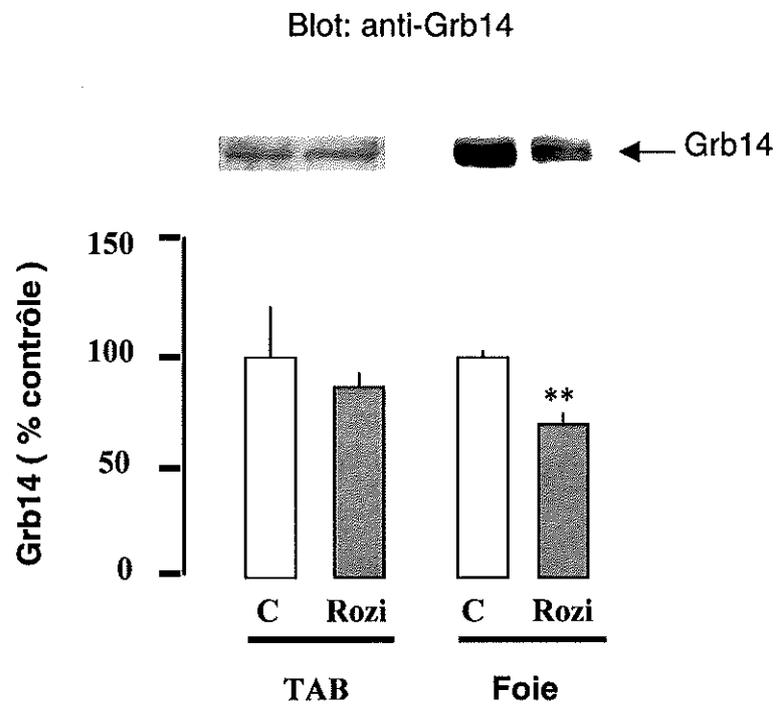


Figure 6: Effet de la rosiglitazone sur l'expression de Grb14 chez les souris *ob/ob*. Un traitement par de la Rosiglitazone (5 mg/kg/j) ou par un placebo est administrée par voie orale pendant 10 jours aux souris traitées (Rozi) ou contrôles (C). Les échantillons de tissus sont analysés en Western blot avec des anticorps anti-Grb14. La quantité de protéines est mesurée par densitométrie (*Syngene Chemigenius 2*). Les résultats sont la moyenne \pm SE de six animaux par groupe.
** P<0.01 par rapport à la concentration de Grb14 dans les contrôles.

V - DISCUSSION

Des défauts de régulation de l'expression des effecteurs intracellulaires du récepteur de l'insuline peuvent participer à la physiopathologie de l'insulinorésistance. A titre d'exemple, une diminution de l'expression hépatique et musculaire d'IRS-1 et d'IRS-2 est retrouvée chez les souris *ob/ob* et les rats *fa/fa*, conduisant à une réduction de l'activation de la PI 3-kinase et ainsi à la diminution de la sensibilité à l'insuline observée chez ces animaux (Kerouz *et al* 1997, Anai *et al* 1998). Inversement, la plupart des effecteurs négatifs de la signalisation de l'insuline sont surexprimés dans des situations d'insulinorésistance. Nous avons vu précédemment que l'expression des tyrosines phosphatases PTP-1B et LAR, de la lipide phosphatase SHIP-2 ou de l'adaptateur SOCS-3 était augmentée dans des modèles animaux d'insulinorésistance et chez des patients obèses et/ou diabétiques de type 2 (Ahmad *et al* 1997, Hori *et al* 2002, Emmanuelli *et al* 2001). Afin d'établir l'importance physiologique de la protéine Grb14, nous avons étudié son expression dans plusieurs situations d'insulinorésistance chez l'animal et chez l'homme.

Jusqu'à présent, une surexpression des protéines de la famille de Grb7 n'avait été retrouvée que dans des lignées de cellules cancéreuses humaines, témoignant du rôle fonctionnel de ces adaptateurs dans le contrôle de la prolifération et de la migration cellulaires (Han *et al* 2001). L'observation d'une augmentation de l'expression de Grb14 dans le tissu adipeux en cas d'insulinorésistance apparaît donc comme un argument important en faveur de son rôle physiologique dans la signalisation de l'insuline. Il est important de noter que cette surexpression est retrouvée dans le tissu adipeux de deux modèles animaux d'insulinorésistance différents, les souris *ob/ob* et les rats GK, ainsi que chez des patients diabétiques de type 2. Le rôle fonctionnel de Grb14 semble donc commun à plusieurs espèces. En accord avec cette observation, la région C-terminale de Grb14, incluant le domaine fonctionnel PIR, est particulièrement conservée avec une homologie de séquence entre les différentes espèces supérieure à 85%. Contrairement à Grb14, la fonction de l'adaptateur Grb10 dans la signalisation de l'insuline demeure controversée et

l'analyse de l'expression de ses différentes isoformes dans de telles situations d'insulinorésistance pourrait apporter des éléments de réponse utiles à la compréhension de son action.

Une constatation particulièrement surprenante est que Grb14 est spécifiquement surexprimée au niveau du tissu adipeux en cas d'insulinorésistance, et non pas au niveau du foie ou du muscle squelettique. Une telle spécificité tissulaire a déjà été rapportée dans le cas d'autres effecteurs de la signalisation insulinique. Ainsi, la lipide phosphatase SHIP-2 est surexprimée dans le tissu adipeux et le muscle squelettique des souris *db/db*, alors que son expression demeure inchangée dans le foie de ces animaux (Hori *et al* 2002). De même, l'expression d'IRS-1 et de GLUT4 est diminuée dans les adipocytes de patients diabétiques de type 2, alors qu'elle n'est pas modifiée dans le muscle squelettique (Smith 2002). Il peut ainsi paraître surprenant de constater qu'il n'y ait que très peu d'anomalies décrites au niveau des voies de signalisation de l'insuline du principal tissu impliqué dans l'homéostasie glucidique. En effet, la réalisation de clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques révèle que le transport musculaire de glucose représente à lui seul 70% de l'utilisation totale du glucose en réponse à l'insuline chez l'homme (De Fronzo 1992). Ces dernières années, l'invalidation du transporteur de glucose GLUT4 chez la souris a apporté des informations extrêmement intéressantes et novatrices concernant la physiopathologie de l'insulinorésistance, en mettant en lumière l'importance de la communication entre le tissu adipeux et les autres tissus cibles de l'insuline (Minokoshi *et al* 2003). Une constatation particulièrement surprenante fut celle de l'apparition d'une insulinorésistance et d'une intolérance au glucose parfois sévères chez les souris ayant une invalidation de GLUT4 uniquement dans le tissu adipeux, alors que ce dernier n'est responsable que d'environ 10% du captage total de glucose. Les analyses des clamps euglycémiques-hyperinsulinémiques retrouvent une diminution de 50% du captage global de glucose, avec notamment une diminution au niveau du muscle squelettique (Abel *et al* 2001). Le transport de glucose étant normal dans les muscles de ces souris cultivés *in vitro*, cette anomalie semble donc liée à la présence d'un facteur circulant vraisemblablement sécrété par l'adipocyte lui-même, et non encore identifié. De même, la suppression de la PHG en réponse

à l'insuline est diminuée. A l'inverse, la restauration de l'expression de GLUT4 au niveau du tissu adipeux chez ces souris améliore la sensibilité à l'insuline *in vivo* (Carvahlo *et al* 2002). L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle central de l'adipocyte dans la physiopathologie de l'insulinorésistance. Si l'on suppose que l'insulinorésistance est initiée au niveau de l'adipocyte, il reste à identifier les événements qui conduisent à une diminution de la sensibilité à l'insuline au niveau du muscle et du foie. A l'heure actuelle, il existe deux axes de recherche centrés autour de l'action systémique des acides gras libres et des adipocytokines (essentiellement le TNF α et l'adiponectine) produits par le tissu adipeux. Ainsi, la surexpression de Grb14, même si elle est limitée au tissu adipeux, pourrait être à l'origine d'une diminution secondaire de la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire et hépatique. Cette hypothèse mérite d'être vérifiée en étudiant les conséquences d'une surexpression de Grb14 au niveau de l'adipocyte à la fois sur les voies de signalisation de l'insuline et sur la sécrétion d'adipocytokines.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'activité de Grb14 soit régulée au niveau du foie et/ou du muscle par d'autres mécanismes que le simple contrôle de son niveau d'expression. En effet, il est parfaitement envisageable qu'une augmentation du niveau de phosphorylation de Grb14 (par la PKC ζ ou une autre kinase) soit associée à une insulinorésistance dans les tissus cibles de l'insuline. Le(s) résidu(s) sérine et/ou thréonine de Grb14 phosphorylés n'étant pas encore identifiés, cette hypothèse n'a pu être testée. La localisation sub-cellulaire de Grb14 pourrait également réguler son activité. En effet, des études préliminaires réalisées sur des foies de rats *fa/fa* insulinorésistants retrouvent une augmentation de la fraction de Grb14 localisée à la membrane à l'état basal par rapport à des rats témoins (B. Desbuquois, données personnelles). Ceci suggère qu'une augmentation du pool membranaire de Grb14 pourrait contribuer à l'apparition de l'insulinorésistance en favorisant l'interaction entre le récepteur de l'insuline et Grb14. Ces hypothèses demandent à être vérifiées.

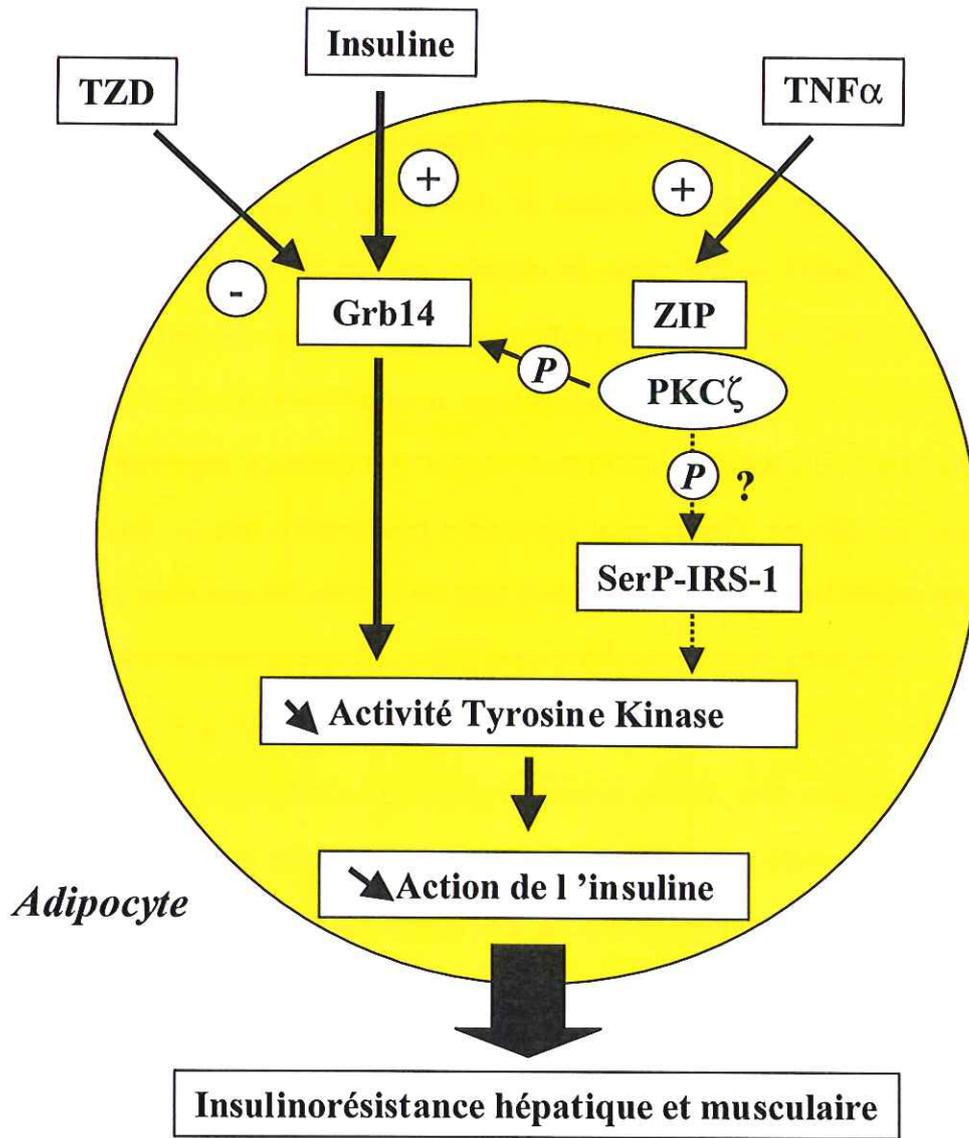
L'analyse de la régulation de l'expression de Grb14 *in vitro* dans la lignée adipocytaire 3T3-F442A apporte des arguments supplémentaires en faveur de son rôle dans

le contrôle de l'action de l'insuline. En effet, l'insuline stimule l'expression de Grb14 dans les adipocytes. Des expériences préliminaires retrouvent également un effet positif de l'insuline sur l'expression de Grb14 dans des hépatocytes de rat en culture primaire (B. Cariou, résultats non publiés). Cette régulation de l'expression de Grb14 pourrait s'intégrer dans le cadre d'un mécanisme d'atténuation physiologique du signal de l'insuline. Lors de la phase dynamique de l'insulinorésistance, ce rétrocontrôle deviendrait potentiellement délétère. En effet, l'hyperinsulinémie prolongée pourrait contribuer à l'augmentation de l'expression de Grb14 observée au niveau du tissu adipeux. La surexpression de Grb14 aggraverait alors la résistance à l'action de l'insuline et l'hyperinsulinémie compensatrice, définissant ainsi un cercle vicieux. Cette hypothèse suggère qu'à un stade plus avancé du diabète de type 2, lorsque la carence insulinosécrétoire est installée, d'autres mécanismes participent au maintien de l'insulinorésistance. Nous démontrons également ici que l'incubation des adipocytes avec des TZDs (pioglitazone ou rosiglitazone) diminue l'expression de Grb14. Cet effet n'est pas secondaire à des variations de concentration de l'insuline, puisqu'il est obtenu dans des conditions de culture *in vitro*. Grb14 apparaît donc comme une cible potentielle de l'action insulinosensibilisatrice des TZDs, ce qui témoigne une nouvelle fois de son importance physiologique. Il reste dorénavant à éclaircir les mécanismes moléculaires de cette régulation transcriptionnelle de Grb14 en réponse à l'insuline et aux TZDs, sachant que le promoteur de Grb14 n'a pas été étudié jusqu'à maintenant. De façon décevante, les résultats obtenus avec les TZDs *in vitro* dans les adipocytes n'ont pas été confirmés *in vivo* chez les souris *ob/ob*. En effet, un traitement de 10 jours avec de la rosiglitazone ne diminue pas de façon significative l'expression de Grb14 dans le tissu adipeux de ces animaux. Ces résultats corroborent une précédente étude qui avait retrouvé des discordances entre l'expression de certains gènes régulés par la rosiglitazone *in vitro* dans des adipocytes 3T3-L1 ou *in vivo* chez des souris *ob/ob* (591). Ceci démontre l'importance des mécanismes de régulation endocrine et/ou paracrine *in vivo*. Ainsi, on ne peut pas exclure que d'autres facteurs hormonaux régulés par les TZDs, comme l'adiponectine ou la leptine, puissent modifier l'expression de Grb14. D'autre part, les TZDs ayant la capacité d'induire la différenciation des préadipocytes en adipocytes,

elles pourraient favoriser l'expression de Grb14 qui est un marqueur de différenciation adipocytaire (Kasus-Jacobi *et al* 1998). Cette action pourrait contre-balancer leur effet inhibiteur sur l'expression de Grb14 au niveau des adipocytes matures, comme observé *in vitro*. En revanche, il faut souligner que les TZDs diminuent l'expression de Grb14 au niveau du foie par un mécanisme inconnu. Cet effet pourrait contribuer à la diminution de l'insulinorésistance hépatique en réponse aux TZDs.

Par ailleurs, nous avons conjointement étudié l'expression de l'adaptateur moléculaire ZIP dans les tissus insulinosensibles au cours de ces situations d'insulinorésistance. Le profil d'expression de ZIP est comparable à celui de Grb14 avec une surexpression au niveau du tissu adipeux des souris ob/ob et des diabétiques de type 2. Cette co-expression des deux partenaires *in vivo* est en faveur du rôle physiologique de l'interaction entre Grb14 et ZIP dans le contrôle de l'action de l'insuline. En l'absence d'anticorps anti-phosphosérines (ou thréonines) spécifiques, on ne peut pas déterminer si cette surexpression de ZIP est associée à une augmentation de la phosphorylation de Grb14, ce qui serait pourtant nécessaire pour valider le modèle de régulation négative décrit dans l'ovocyte de Xénope. On ne peut cependant pas exclure que la protéine ZIP puisse modifier la sensibilité à l'insuline indépendamment de Grb14. Un des rôles potentiels de ZIP pourrait être de diriger l'activité de la PKC ζ vers IRS-1. Le résidu sérine d'IRS-1 phosphorylé par la PKC ζ ayant été très récemment identifié au niveau de la sérine 318 (Beck *et al* 2003), cette hypothèse pourra être vérifiée grâce à l'emploi d'un anticorps phosphospécifique. La protéine ZIP se différencie également de Grb14 par la régulation de son expression dans les adipocytes 3T3-L1. Un traitement par le TNF α stimule l'expression de ZIP, alors que contrairement à Grb14 elle n'est pas modifiée par l'insuline ni par les TZDs. La surexpression de ZIP en réponse au TNF α pourrait contribuer au développement de l'insulinorésistance induite par cette cytokine, notamment au cours de l'obésité. Dans cette optique, il serait intéressant de déterminer si le pool de ZIP activé par le TNF α est en mesure de diriger l'activité de la PKC ζ vers les effecteurs de la voie de signalisation de l'insuline comme Grb14 et/ou IRS-1. D'autre part, de nombreuses études ont démontré que ZIP joue

Schéma 13 :
Rôle supposé de Grb14 dans la physiopathologie
de l'insulinorésistance



un rôle clef dans la voie de signalisation du $\text{TNF}\alpha$ conduisant à l'activation de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Sanz *et al* 1999). En recrutant la $\text{PKC}\zeta$, ZIP participe à l'activation de la kinase $\text{IKK}\beta$ qui est impliquée dans la phosphorylation sur sérine d'IRS-1 en réponse au $\text{TNF}\alpha$ (Sanz *et al* 1999, Yuan *et al* 2001). ZIP pourrait ainsi contrôler la signalisation du récepteur de l'insuline, indépendamment d'une action directe de la $\text{PKC}\zeta$ sur Grb14 et ou IRS-1. Même si toutes ces hypothèses doivent être vérifiées, les rôles potentiels de Grb14 et de ZIP dans la physiopathologie de l'insulinorésistance sont schématisés sur le **schéma 13**.

En résumé, cette étude démontre que dans plusieurs modèles animaux et chez l'homme, l'insulinorésistance *in vivo* est associée à la surexpression des adaptateurs moléculaires Grb14 et ZIP au niveau du tissu adipeux. Si une inhibition directe de la signalisation de l'insuline dans l'adipocyte par la surexpression de Grb14 reste à démontrer, la régulation de son expression par l'insuline et les TZDs est cependant un argument fort en faveur de son importance physiologique.

VI – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons pu apporter des éléments nouveaux quant au mécanisme d'action de l'adaptateur moléculaire Grb14 dans la transduction du signal de l'insuline. Jusqu'à présent, les effets de la surexpression de Grb14 sur la signalisation de l'insuline n'ont été étudiés que dans des cellules qui ne sont pas des cibles des effets métaboliques de l'insuline (lignée fibroblastique CHO, ovocyte de Xénope). Les études réalisées *in vivo* dans les tissus cibles de l'hormone indiquent qu'une augmentation de l'expression de Grb14 et de son partenaire ZIP dans le tissu adipeux pourrait favoriser le développement de l'insulinorésistance. De plus, la régulation de l'expression de Grb14 par l'insuline et les TZDs est un argument supplémentaire en faveur de son importance physiologique dans le contrôle de l'action de l'insuline.

Néanmoins, l'augmentation de l'expression de Grb14 et de ZIP dans le tissu adipeux en cas d'insulinorésistance n'est qu'un argument indirect en faveur de leur rôle inhibiteur de l'action de l'insuline. Il est donc indispensable d'évaluer les conséquences métaboliques d'une surexpression de Grb14 au niveau du tissu adipeux. Pour cela, un modèle de souris transgéniques surexprimant le gène de Grb14 sous contrôle d'un promoteur spécifiquement adipocytaire (aP2) est en cours de développement au laboratoire. Alternativement, on peut envisager de supprimer l'expression de Grb14 dans les cellules cibles de l'insuline. Pour cela, il est possible d'utiliser la technique d'ARN interférence pour diminuer l'expression endogène d'une protéine. Cette technique, qui a été décrite récemment, est fondée sur la capacité qu'ont de petits ARN double-brins spécifiques d'induire la dégradation des ARNm d'un gène donné (Dykxhoorn *et al* 2003). Par rapport à une approche « classique » d'inactivation globale ou tissu-spécifique, cette technique limite le risque d'une compensation fonctionnelle par d'autres gènes. Or, les membres de la famille de Grb7 étant structurellement très proches, il se pourrait que l'inactivation de Grb14 soit compensée par la surexpression de Grb10 et/ou Grb7. Il faut noter cependant, que ce phénomène ne semble

pas avoir été observé lors de l'inactivation globale de Grb10, récemment publiée (Charalambous *et al* 2003).

Même si l'hypothèse monogénique du diabète de type 2 semble être une utopie désuète, il pourrait tout de même être intéressant de rechercher des mutations de Grb14 dans le diabète de type 2 ou dans certaines situations d'insulinorésistance sévère. En effet, on peut imaginer qu'en association à d'autres mutations de certains effecteurs des voies de signalisation de l'insuline, elles puissent favoriser le développement d'un diabète de type 2. L'existence de tels génotypes « à risque » a été précédemment démontrée, notamment pour les mutations d'IRS-1 (Sesti *et al* 2001).

En contrôlant l'activité tyrosine kinase du récepteur, Grb14 agit à un niveau très proximal des voies de signalisation de l'insuline. Récemment plusieurs molécules visant à stimuler directement l'activité catalytique du récepteur ont été développées pour le traitement de l'insulinorésistance et du diabète de type 2 (Laborde & Manchem 2002). C'est le cas notamment de petites molécules non-peptidiques d'origine fongique qui augmentent *in vitro* l'activité tyrosine kinase de récepteurs de l'insuline purifiés. De plus, leur administration *in vivo* à des modèles des souris diabétiques diminue l'insulinorésistance et corrige l'hyperglycémie (Zhang *et al* 1999, Qureshi *et al* 2000). Par analogie, on peut imaginer que le développement de molécules pouvant inhiber la liaison du domaine PIR de Grb14 au domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline aient la même action insulinosensibilisatrice. Même si des études complémentaires s'avèrent indispensables, Grb14 apparaît toutefois comme une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le diabète de type 2.

BIBLIOGRAPHIE

Abel E.D., Peroni O., Kim Y.B. et al. (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729-733.

Aguirre V., Werner E.D., Giraud J. et al. (2002) Phosphorylation of Ser³⁰⁷ in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J. Biol. Chem.* **277**, 1531-1537.

Ahmad F. & Goldstein B.J. (1997) Functional association between the insulin receptor and the transmembrane protein-tyrosine phosphatase LAR in intact cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 448-457.

Ahmad F., Azevedo J.L., Cortright R. et al. (1997) Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* **100**, 449-458.

Alessi D.R., James S.R., Downes C.P. et al. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B. *Curr. Biol.* **8**, 69-81.

Anai M., Funaki M., Ogihara T. et al. (1998) Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats. *Diabetes* **47**, 13-23.

Ando A., Momomura K., Tobe K., et al. (1992) Enhanced insulin-induced mitogenesis and mitogen-activated protein kinase activities in mutant insulin receptors with substitution of two COOH-terminal tyrosine autophosphorylation sites by phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **273**, 215-221.

Astrup A. & Finer N. (2000) Redefining type 2 diabetes: "diabesity" or "obesity dependent diabetes mellitus" ? *Obesity Rev.* **1**, 57-59.

Auberger P., Falquerho L., Contreres J.O. et al. (1989) Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* **58**, 631-640.

Backer J.M., Myers M.G. Jr, Shoelson S.E. et al. (1992) Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* **11**, 3469-3479.

Baumann C.A., Ribon V., Kanzaki M. et al. (2000) CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202-207.

Bécard D., Hainault I., Azzout-Marniche D. et al. (2001) Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* **50**, 2425-2430.

- Beck A., Moeschel K., Lehmann R. et al. (2003) Functional characterization of a PKC-dependent IRS-1 phosphorylation site using mass spectrometry. *Diabetologia* **46** (Suppl 2) A215 (Poster 621).
- Beeson M., Sajan M.P., Dizon M. et al. (2003) Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol 3,4,5-(PO₄)₃ is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes* **52**, 1926-1934.
- Béréziat V., Kasus-Jacobi A., Perdereau D. et al. (2002) Inhibition of insulin receptor catalytic activity by the molecular adapter Grb14. *J. Biol. Chem.* **277**, 4845-4852.
- Bergman R.N. (1997) New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**, 359-385.
- Boulton T.G., Gregory J.S. & Cobb M.H. (1991) Purification and properties of extracellular signal-regulated kinase 1, an insulin-stimulated microtubule-associated protein 2 kinase. *Biochemistry* **30**, 278-286.
- Bouzakri K., Roques M., Gual P. et al. (2003) Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 1319-1325.
- Brady M.J., Nairn A.C. & Saltiel A.R. (1997) The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARP-32 in insulin action. *J. Biol. Chem* **272**, 29698-29703.
- Braiman L., Alt A., Kuroki T. et al. (2001) Activation of protein kinase C ζ induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol* **22**, 7852-7861.
- Brunet A., Roux D., Lenormand P. et al. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO. J* **18**, 664-674.
- Butler M., McKay R.A., Popoff I.J. et al. (2002) Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Diabetes* **51**, 1028-1034.
- Cadefau J., Bollen M. & Stalmans W. (1997) Glucose-induced glycogenesis in the liver involves the glucose-6-phosphate-dependent dephosphorylation of glycogen synthase. *Biochem. J.* **322**, 745-750.
- Cailliau K., Le Marcis V., Béréziat V. et al. (2003). Inhibition of FGF receptor signalling in *Xenopus* oocytes: differential effect of Grb7, Grb10 and Grb14. *FEBS Lett.* **548**, 43-48.
- Cantley L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657.
- Cariou B., Perdereau D., Cailliau K. et al. (2002) The adapter protein ZIP binds Grb14 and regulates its inhibitory action on insulin signaling by recruiting protein kinase C ζ . *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6959-6970.

- Cariou B., Béréziat V., Moncoq K. et al. (2003) Regulation and functional roles of Grb14. *Front. Biosci.* **8**,(sous presse)
- Carvalho E. et al. (2002) *Diabetes* (Abstract) **51** (Suppl 2), A326.
- Chan T.O., Rittenhouse S.E., Tschlis P.N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem* **68**, 965-1014.
- Charalambous M., Smith F.M., Bennet W.R. et al. (2003) Disruption of the imprinted Grb10 gene leads to disproportionate overgrowth by an Igf2-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 8292-8297.
- Chardin P., Camonis J.H., Gale N.W. et al. (1993) Human Sos1 : a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. *Science* **260**, 1338-1343.
- Chen H., Srinivas P.R., Cong L.N. et al. (1998) α 2-Heremans Schmid glycoprotein inhibits insulin-stimulated Elk-1 phosphorylation, but not glucose, in rat adipose cells. *Endocrinology* **139**, 4147-4154.
- Chen D., Xu L.G., Chen L. et al. (2003) NIK is a component of the EGF/heregulin receptor signaling complexes. *Oncogene* **22**, 4348-4355.
- Cheng A., Dube N., Gu F. et al. (2002) Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1050-1059.
- Chiang S.H., Baumann C.A., Kanzaki M. et al. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**, 944-948.
- Cho H., Mu J., Kim J.K. et al. (2001) Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**, 1728-1731.
- Ciechanover A. (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* **17**, 7151-7160.
- Clement S., Krause U., Desmedt F. et al. (2001) The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* **409**, 92-97.
- Cong L.N., Chen H., Li Y. et al. (1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1881-1890.
- Crews C.M., Alessandrini A. & Erikson R.L. (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-480.
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P. et al. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789.
- Crosson S.M., Kahn A., Printen J. et al. (2003) PTG gene deletion causes impaired glycogen synthesis and developmental insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **111**, 1423-1432.

Czech M.P. & Buxton J.M. (1993) Insulin action on the internalisation of the GLUT4 glucose transporter in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 9187-9190.

Daly R.J., Sanderson G.M., Janes P.W. et al. (1996) Cloning and characterization of Grb14, a novel member of the Grb7 family of protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 12502-12510.

Daly R.J. (1998) The Grb7 family of signalling proteins. *Cell. Signal.* **10**, 613-618.

De Fronzo R.A, Bonadonna R.C. & Ferrannini E. (1992) Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* **15**, 318-368.

De Meyts P & Whittaker J. (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Reviews* **1**, 769-783.

Deng Y., Bhattacharya S., Swamy O.R. et al. (2003) Grb10 as a partner of PI 3-Kinase in metabolic insulin action. *J. Biol. Chem.* **278**, 39311-39322.

Dent P., Haser W., Haystead T.A. et al. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* **257**, 1404-1407.

Denton R.M. & Tavaré J.M. (1995) Does mitogen-activated protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur. J. Biochem.* **227**, 597-611.

Dong L.Q., Du H., Porter S.G. et al. (1997a) Cloning, chromosome localization, expression, and characterization of an Src homology 2 and pleckstrin homology domain-containing insulin receptor binding protein hGrb10 γ . *J. Biol. Chem.* **272**, 29104-29112.

Dong L.Q., Farris S., Christal J. et al. (1997b) Site-directed mutagenesis and yeast two-hybrid studies of the insulin and insulin-like growth factor-1 receptors: the Src homology-2 domain-containing protein hGrb10 binds to the autophosphorylated tyrosine residues in the kinase domain of the insulin receptor. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1757-1765.

Duong D.T., Waltner-Law M.E., Sears R. et al. (2002) Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J. Biol. Chem* **277**, 32234-32242.

Dykxhoorn D.M., Novina C.D. and Sharp P.A. (2003) Killing the messenger: short rnas that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 457-467.

Elchebly M., Payette P., Michaliszyn E. et al. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-1548.

Ellis L., Clauser E., Morgan D.O. et al. (1986) Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose. *Cell* **45**, 721-732.

Emanuelli B., Peraldi P., Filloux C. et al. (2000) SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 15985-15991.

Emanuelli B., Peraldi P., Filloux C. et al. (2001) SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 47944-47949.

Etgen G.J., Valasek K.M., Broderick C.L. et al. (1999) *In vivo* adenoviral recombinant delivery of recombinant human protein kinase C ζ stimulates glucose transport activity in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **274**, 22139-22142.

Frantz J.D., Giorgetti-Peraldi S., Ottinger E.A. et al. (1997) Human GRB-IR β /GRB10. Splice variants of an insulin and growth factor receptor binding protein with PH and SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **272**, 2659-2667.

Frevert E.U. & Kahn B.B. (1997) Differential effects of constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase on glucose transport, glycogen synthase activity, and DNA synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 190-198.

Frittitta L., Youngren J., Vigneri R. et al. (1996) PC-1 content in skeletal muscle of non-obese, non-diabetic subjects: relationship to insulin receptor tyrosine kinase and whole body insulin sensitivity. *Diabetologia* **39**, 1190-1195.

Gabbay R.A., Sutherland C., Gnudi L. et al. (1996) Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the RAS/Mitogen-Activated Protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 1890-1897.

Gao Z., Hwang D., bataille F. et al. (2002) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 48115-48121.

Geetha T. & Wooten M.W. (2002) Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett.* **512**, 19-24.

Gibson T.J., Hyvonen M, Musacchio A. et al. (1994) PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* **19**, 349-353.

Giovannone B., Lee E., Laviola L. et al. (2003) Two novel proteins that are linked to IGF-1 receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 31564-31573.

Girard J. (2002) PPAR γ and insulin resistance. *Ann. Endocrinol.* **63** (2 Pt 2): 1S19-22.

Goldstein B.J. (2002) Protein-tyrosine phosphatases: emerging targets for therapeutic intervention in type 2 diabetes and related states of insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**, 2474-2480.

Gong J., Xu J., Bezanilla M. et al. (1999) Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science* **285**, 1565-1569.

Goto Y., Kakizaki M. and Masaki N. (1976) Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. Exp. Med.* **119**, 85-90.

Grigorescu F., Baccara M.T., Rouard M. et al. (1994) Insulin and IGF-1 signaling in oocyte maturation. *Horm. Res.* **42**, 55-61.

Gustafson T.A., He W., Craparo A. et al. (1995) Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2500-2508.

Gustavsson J., Parpal S., Karlsson M. et al. (1999) Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocytes plasma membrane. *FASEB J.* **13**, 1961-1971.

Hajdich E., Alessi D.R., Hemmings B.A. et al. (1998) Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* **47**, 1006-1013.

Haffner S.M., Stern M.P., Hazuda H.P. et al. (1990) Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes? *J. Am. Med. Assoc.* **263**, 2893-2898.

Han D.C., Shen T.L. & Guan J.L. (2000) Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. *J. Biol. Chem.* **274**, 30896-30905.

Han D.C., Shen T.L. & Guan J.L. (2001) The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene* **20**, 6315-6321.

Hansen H., Svensonn U., Zhu J. et al. (1996) Interaction between the Grb10 SH2 domain and the insulin receptor carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **271**, 8882-8886.

He W., Rose D.W., Olefsky J.M. et al. (1998) Grb10 interacts differentially with the insulin receptor, insulin like growth factor I receptor, and epidermal growth factor receptor via the Grb10 Src homology 2 (SH2) domain and a second domain located between the pleckstrin homology and SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 6860-6867.

Hemming R., Agatep R., Badiani K. et al. (2001) Human growth factor receptor bound 14 binds the activated insulin receptor and alters the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation levels of multiple proteins. *Biochem. Cell. Biol.* **79**, 21-32.

Hill M.M., Andjelkovic M., Brazil D.P. et al. (2001) Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 25643-25646.

Hori H., Sasaoka T., Ishihara H. et al. (2002) Association of SH2-containing inositol phosphatase 2 with the insulin resistance of diabetic *db/db* mice. *Diabetes* **51**, 2387-2394.

- Hotamisligil G.S., Peraldi P., Budavari A. et al. (1996) IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF α and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668.
- Hubbard S.R, Wei L, Ellis L. et al. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* **372**, 746-754.
- Hubbard S.R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J* **16**, 5572-5581.
- Iida S., Ono S., Sayama K. et al. (2000) Accelerated decline of blood glucose after intravenous glucose injection in a patient with Cowden disease having a heterozygous germline mutation of the PTEN/MMAC1 gene. *Anticancer Res.* **20**, 1901-1904.
- Ishihara H., Sasaoka T., Ishiki M. et al. (1997a) Functional importance of Shc tyrosine 317 on insulin signaling in Rat1 fibroblasts expressing insulin receptors. *J. Biol. Chem.* **272**, 9581-9586.
- Ishihara H, Sasaoka T., Hori H. et al. (1997b) Molecular cloning of rat SH2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP-2) and its role in the regulation of insulin signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 265-272.
- Jahn T., Seipel P., Urschel S. et al. (2002) Role of the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 979-991.
- James D.E., Brown R., Navarro J. et al. (1988) Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* **333**, 183-185.
- Johnston A.M., Pirola L. & Van Obberghen E. (2003) Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett* **546**, 32-36.
- Kahn A.H. and Pessin J.F. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* **45**, 1475-1483.
- Kasus-Jacobi A., Perdereau D., Auzan C. et al. (1998) Identification of the rat adapter Grb14 as an inhibitor of insulin actions. *J. Biol. Chem.* **273**, 26026-26035.
- Kasus-Jacobi A., Béréziat V., Perdereau D. et al. (2000) Evidence for an interaction between the insulin receptor and Grb7. A role for two of its binding domains, PIR and SH2. *Oncogene* **19**, 2052-2059.
- Kawazoe Y., Naka T., Fujimoto M. et al. (2001) Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J. Exp. Med.* **193**, 263-269.
- Kerouz N.J., Horsch D., Pons S. et al. (1997) Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (*ob/ob*) mouse. *J. Clin. Invest.* **100**, 3164-3172.

Kido Y., Burks D.J., Whithers D.J. et al. (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J. Clin. Invest.* **105**, 199-205.

Kim Y.B., Kotani K., Ciaraldi T.P. et al. (2003) Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes : reversal with weight reduction. *Diabetes* **52**, 1935-1942.

Kitamura T., Ogawa W., Sakaue H. et al. (1998) Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport. *Mol. Cell. Biol* **18**, 3708-3717.

Klaman L.D., Boss O., Peroni O. et al. (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein tyrosine-phosphatase 1-B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5479-5489.

Kohn A.D., Summers S.A., Birnbaum M.J. et al. (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* **271**, 31372-31378.

Kotani K., Ogawa W., kitamura T. et al. (1998) Requirement of atypical protein kinase Clamda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol* **18**, 6971-6982.

Laborde E. and Manchem V.P. (2002) Small molecule activators of the insulin receptor: potential new therapeutic agents for the treatment of diabetes mellitus. *Curr. Med. Chem.* **9**, 2231-2242.

Lawrence J.C. Jr & Roach P.J.(1997) New insights into the role and mechanisms of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes* **46**, 541-547.

Lazar D.F., Wiese R.J., Brady M.J. et al. (1995) Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J. Biol. Chem.* **270**, 20801-20807.

Le Cam A., Magnaldo I., Le Cam G. et al. (1985) Secretion of a major phosphorylated glycoprotein by hepatocytes. Characterization of specific antibodies and investigations of the processing, excretion kinetics, and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **260**, 15965-15971.

Lembertas A.V., Perusse L., Chagnon Y.C. et al. (1997) Identification of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *J. Clin. Invest* **100**, 1240-1247.

Levkowitz G., Waterman H., Ettenberg SZ.A. et al. (1999) Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell.* **4**, 1029-1040.

Lietzke S.E., Bose S., Cronin T. et al. (2000) Stuctural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell.* **6**, 385-394.

- Lin X., Braymer H.D., Bray G.A. et al. (1998) Differential expression of insulin receptor tyrosine kinase inhibitor (fetuin) gene in a model of diet-induced obesity. *Life Sci.* **63**, 145-153.
- Liu F. & Roth R.A. (1995) Grb-IR: a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 10287-10291.
- Liu Y.F., Paz K., Herschkovitz A. et al. (2001) Insulin stimulates PKC ζ -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 14459-14465.
- Luzi L., Confalonieri S., DiFiorre P.P. et al. (2000) Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr opin Genet Dev* **10**: 668-674.
- Lyons R.J., Deane R., Lynch D.K. et al. (2001) Identification of a novel human tankyrase through its interaction with the adaptor protein Grb14. *J. Biol. Chem.* **276**, 17172-17180.
- Maddux B.A., Sbraccia P., Kumakura S. et al. (1995) Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* **373**, 448-451.
- Margolis B., Silvennoinen O., Comoglio F. et al. (1992) High-efficiency expression / cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 8894-8898.
- Marion E., Kaisaki P.J., Pouillon V. et al. (2002) The gene INPPL1, encoding the lipid phosphatase SHIP2, is a candidate for type 2 diabetes in rat and man. *Diabetes* **51**, 2012-2017.
- Mathews S.T., Chellam N., Srinivas P.R. et al. (2000) α 2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **164**, 87-98.
- Mathews S.T., Singh G.P., Ranalletta M. et al. (2002) Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes* **51**, 2450-2458.
- Minokoshi Y., Kahn C.R. & Kahn B.B. (2003) Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**, 33609-33612.
- Moller D.E. (2000) Potential role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**, 212-217.
- Monk D., Wakeling E.L., Proud V. et al. (2000) Duplication of 7p11.2-p13, including GRB10, in Silver-Russel syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 36-46.
- Moodie S.A., Willumsen B.M., Weber M.J. et al. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**, 1658-1661.
- Mooney R.A., Senn J., Cameron S. et al. (2001) Suppressor of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 25889-25893.

- Morrione A., Valentinis B., Resnicoff M. et al. (1997) The role of mGrb10 α in insulin-like growth factor I-mediated growth. *J. Biol. Chem.* **272**, 26382-26387.
- Morrione A., Plant P., Valentinis B. et al. (1999) mGrb10 interacts with Nedd4. *J. Biol. Chem.* **274**, 24094-24099.
- Moscat J. & Diaz-Meco M.T. (2000) The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* **1**, 399-403.
- Mothe I. & Van Obberghen E. (1996) Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol. Chem.* **271**, 11122-11127.
- Myers M.G. Jr, Backer J.M., Sun X.J. et al. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10350-10354.
- Nakae J., Park B.C. & Accili D. (1999) Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 15982-15985.
- Nakae J., Barr V. and Accili D. (2000) Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single aminoacid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *EMBO J.* **19**, 989-996.
- Nakanishi H., Brewer K.A. & Exton J.H. (1993) Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* **268**, 13-16.
- Nantel A., Mohammad-Ali K., Sherk J. et al. (1998) Interaction of the Grb10 adapter protein with the Raf1 and MEK1 kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 10475-10484.
- Nantel A., Huber M. & Thomas D.Y. (1999) Localization of endogenous Grb10 to the mitochondria and its interaction with the mitochondrial-associated Raf-1 pool. *J. Biol. Chem.* **274**, 35719-35724.
- Newgard C.B., Brady M.J., O'Doherty R.M. et al. (2000) Organizing glucose disposal : emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes* **49**, 1967-1977.
- Olivier E., Soury E., Ruminy P. et al. (2000) Fetuin-B, a second member of the fetuin family in mammals. *Biochem. J.* **350**, 589-597.
- O'Neill T.J., Rose D.W., Pillay T.S. et al. (1996) Interaction of Grb-IR splice variant (a human GRB10 homolog) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 22506-22513.
- Ooi J., Yajnik V., Immanuel D. et al. (1995) The cloning of Grb10 reveals a new family of SH2 domain proteins. *Oncogene* **10**, 1621-1630.
- O'Rourke C.M., Davis J.A., Saltiel A.R. et al. (1997) Metabolic effects of troglitazone in the Goto-Kakizaki rat, a non-obese and normolipidemic rodent model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **46**, 192-198.

- Pawson T., Gish G.D., and Nash P. (2001) SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol* **11**, 504-511.
- Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F. et al. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**, 93-104.
- Pilkis S.J. & Granner D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885-909.
- Pizzuti A., Frittitta L., Argiolas A. et al. (1999) A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes* **48**, 1881-1884.
- Pronk G.J., McGlade J., Pelicci G. et al. (1993) Insulin-induced phosphorylation of the 46- and 52-kDa Shc proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 5748-5753.
- Puigserver P. & Spiegelman B.M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endoc. Rev.* **24**, 78-90.
- Puls A., Schmidt S., Grawe F. et al. (1997) Interaction of protein kinase C ζ with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 6191-6196.
- Qiao L.Y., Zhande R., Jetton T.L. et al. (2002) *In vivo* phosphorylation of insulin receptor substrate 1 at serine 789 by a novel serine kinase in insulin-resistant rodents. *J. Biol. Chem.* **277**, 26530-26539.
- Qureshi S.A., Ding V., Li Z. et al. (2000) Activation of insulin signal transduction pathway and anti-diabetic activity of small molecule insulin receptors activators. *J. Biol. Chem.* **275**, 36590-36595.
- Rasmussen S.K., Urhammer S.A., Pizzuti A. et al. (2000) The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians. *Diabetes* **49**, 1608-1611.
- Reilly J.F., Mickey G. & Maher P.A. (2000) Association of fibroblast growth factor receptor 1 with the adaptor protein Grb14. Characterization of a new receptor binding partner. *J. Biol. Chem.* **275**, 7771-7778.
- Ribon V., Printen J.A., Hoffman N.G. et al. (1998) A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 872-879.
- Ricort J.M., Tanti J.F., Van Obberghen E. et al. (1996) Different effects of insulin and platelet-derived growth factor on phosphatidylinositol 3-kinase at the subcellular level in 3T3-L1 adipocytes. A possible explanation for their specific effects on glucose transport. *Eur. J. Biochem.* **239**, 17-22.
- Rui L., Yuan M., Frantz D. et al. (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS-1 and IRS-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 42394-42398.
- Sakoda H., Ogihara T., Anai M. et al. (1999) No correlation of plasma cell 1 overexpression with insulin resistance in diabetic rats and 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **48**, 1365-1371.

Saltiel A.R & Kahn C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.T

Sanchez P., DeCarcer G., Sandoval I.V. et al. (1998) Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3069-3080.

Sanz L., Sanchez P., Lallena M.J. et al. (1999) The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- κ B activation. *EMBO J.* **18**, 3044-3053.

Sanz L., Diaz-Meco M.T., Nakano H. et al. (2000) The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF- κ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* **19**, 1576-1586.

Sesti G., Federici M. et al. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* **15**, 2099-2111.

Shafirir E. (1992) Animal models for non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes/Metab. Rev.* **8**, 179-208.

Shao J., Catalano P.M., Yamashita H. et al. (2000) Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM). *Diabetes* **49**, 603-610.

Shen T.L, Han D.C. & Guan J.L. (2002) Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J. Biol. Chem.* **277**, 29069-29077.

Shepherd P.R., Withers D.J. & Siddle K. (1998) Phosphoinositide 3-kinase : the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333**, 471-490.

Shulman G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**, 171-176.

Simon M.A., Dodson G.S. & Rubin G.M. (1993) An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos protein in vitro. *Cell* **73**, 169-177.

Slot J.W., Geuze H.J., Gigengack S. et al. (1991) Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7815-7819.

Smart E.J., Graf G.A., McNiven M.A. et al. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol* **19**, 7289-7304.

Smith U. (2002) Impaired ("diabetic") insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance-is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **26**, 897-904.

Songyang Z. & Cantley L.C. (1995) Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biol Sci* **20**, 470-475.

Srinivas P.R., Wagner A.S., Reddy L.V. et al. (1993) Serum α 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1445-1455.

- Standaert M.L., Galloway L., Karnam P. et al. (1997) Protein kinase C ζ as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 30075-30082.
- Stein D., Wu J., Fuqua S.A. et al. (1994) The SH2 domain protein Grb7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *EMBO J.* **13**, 1331-1340.
- Stein E.G., Gustafson T.A. & Hubbard S.R. (2001) The BPS domain of Grb10 inhibits the catalytic activity of the insulin and IGF-1 receptors. *FEBS Lett* **493**, 106-111.
- Sun X.J., Crimmins D.L., Myers M.G. Jr et al. (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol* **13**, 7418-7428.
- Sun X.J., Goldberg J.L., Qiao L.Y. et al. (1999) Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. *Diabetes* **48**, 1359-1364.
- Sykiotis G. & Papavassiliou A.G. (2001) Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 : a novel target for the reversal of insulin resistance. *Mol. Endocrinol.* **15**, 1864-1869.
- Takahashi T. et al. (1970) Surface alloantigens of plasma cells. *J. Exp. Med.* **131** 1325-1341.
- Takata Y., Webster N.J. & Olefsky J.M. (1991) Mutation of the two carboxyl-terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling but enhanced mitogenic signaling properties. *J. Biol. Chem* **266**, 9135-9139.
- Tanaka S., Mori M., Akiyoshi T. et al. (1997) Coexpression of Grb7 with epidermal growth factor or Her2/erb2 in human advanced oesophageal carcinoma. *Cancer Res.* **57**, 28-31.
- Tennagels N., Bergschneider E., Al-Hasani H. et al. (2000) Autophosphorylation of the two C-terminal residues Tyr1316 and Tyr1322 modulates the activity of the insulin receptor kinase in vitro. *FEBS Lett* **479**, 67-71.
- Vecchione A., Marchese A., Henry P. et al. (2003) The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3363-3372.
- Vionnet N., Hani El-H., Dupont S. et al. (2000) Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-24. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 1470-1480.
- Virkamäki A., Ueki K. & Kahn C.R. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **103**, 931-943.
- Vivanco I. & Sawyers C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Rev. Cancer.* **2**, 489-500.

- Walker K.S., Deak M., Paterson A. et al. (1998) Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem. J.* **331**, 299-308/141.
- Wang J., Dai H., Yousaf N. et al. (1999) Grb10, a positive, stimulatory signaling adapter in platelet-derived growth factor BB-, insulin-like growth factor-I-, and insulin-mediated mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6217-6228.
- Watson R.T., Shigematsu S., Chiang S.H. et al. (2001) Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J. Cell. Biol.* **154**, 829-840.
- Wei L., Hubbard S.R., Hendrickson W.A. et al. (1995) Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 8122-8130.
- White M.F. (1997) The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* **40**, S2-S17.
- White M.F., Livingston J.N., Backer J.M. et al. (1998) Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* **54**, 641-649.
- Whiteman E.L., Cho H. and Birnbaum M.J. (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **13**, 444-451.
- Wick K.R., Werner E.D., Langlais P. et al. (2003) Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 8460-8467.
- Wiley H.S. & Burke P.M. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* **2**, 12-18.
- Worm D., Handberg A., Hoppe E. et al. (1996) Altered basal and insulin-stimulated phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity in skeletal muscle fractions from NIDDM patients compared with control subjects. *Diabetologia* **39**, 1208-1214.
- Yonezawa K., Ando A., Kaburagi Y. et al. (1994) Signal transduction pathways from insulin receptors to Ras. Analysis by mutant insulin receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 4634-4660.
- Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J. et al. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293**, 1673-1677.
- Zhang B., Salituro G., Szalkowski D. et al. (1999) Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* **284**, 974-977.
- Zhou M.M., Rachivadrán K.S., Olejniczak E.F. et al. (1995) Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc. *Nature* **378**, 584-592.

Zimmet P. (2000) Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic : can the doomsday scenario be averted? *J. Intern. Med.* **247**, 301-310.

Zimmet P., Alberti K.G.M.M. & Shaw J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787.

BU Santé
Nantes

Titre de la thèse : Etude de l'expression des adaptateurs moléculaires Grb14 et ZIP dans le diabète de type 2.

RESUME

Grb14 est un nouvel adaptateur moléculaire qui se lie au récepteur de l'insuline et inhibe son activité catalytique. Son partenaire de liaison, la protéine ZIP (PKC zeta interacting protein) potentialise son action inhibitrice en favorisant sa phosphorylation par la protéine kinase C zeta (PKC ζ). Ce travail a étudié l'expression des adaptateurs moléculaires Grb14 et ZIP *in vivo* dans les tissus cibles de l'insuline dans des modèles animaux d'insulinorésistance et chez des diabétiques de type 2. L'expression de Grb14 et de ZIP est spécifiquement augmentée dans le tissu adipeux des souris *ob/ob*, ces rats Goto-Kakizaki et des patients diabétiques de type 2. Des études *in vitro* dans des adipocytes ont permis de démontrer que l'insuline stimule l'expression de Grb14, tandis que les thiazolidinediones la diminue. Cette étude confirme l'importance physiologique de Grb14 dans la signalisation de l'insuline.

MOTS-CLES

Diabète de type 2 -- Insulinorésistance -- Signalisation -- Adaptateur moléculaire -- Grb14