



# Nutrition Obésité Risque Thrombotique

UMR INSERM 1062 / INRA 1260 / AMU

Directrice : Pr Marie-Christine ALESSI [marie-christine.alessi@univ-amu.fr](mailto:marie-christine.alessi@univ-amu.fr)

Directrice Adjointe : Dr Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN [marie-jo.amiot-carlin@univ-amu.fr](mailto:marie-jo.amiot-carlin@univ-amu.fr)

Rapport sur le projet financé par le Prix Spécial du Jury SFD 2014 sur le thème: "**Régulation de la signalisation insulinique par la protéolyse de l'ectodomaine du récepteur à l'insuline**"

Fait à Marseille le 15 Janvier 2017

Auteur: Franck Peiretti - Inserm1062 / INRA1260 / AMU - Faculté de Médecine de la Timone - 27, Bd Jean Moulin, 13385 Marseille, Cedex 5

## A. Rappel

Notre objectif était d'apporter des arguments expérimentaux permettant de préciser si et comment la protéolyse du domaine extracellulaire du récepteur à l'insuline (RI) pouvait intervenir dans la régulation de la signalisation insulinique. Notre priorité était d'identifier 1) l'activité enzymatique responsable du clivage extracellulaire du RI et 2) le site de protéolyse dans la séquence du RI.

## B. Principaux résultats

### 1) BACE1 clive le RI

Nous avons développé un système rapporteur du clivage du domaine extracellulaire du RI en substituant une partie de ce domaine par la Gaussia luciférase. Ce système a été utilisé pour "screener" une banque d'inhibiteurs de protéases et a permis d'identifier la beta sécrétase BACE1 comme potentiellement responsable de la protéolyse du RI. Nous avons mis au point un dosage Elisa du fragment extracellulaire du RI et nous avons validé l'intervention de BACE1 dans le clivage du RI sauvage: le clivage du RI avec libération d'un fragment extracellulaire soluble est augmenté par la surexpression de BACE1 et est réduit par l'inhibition ou l'extinction de BACE1. Nous avons montré que le clivage du RI par BACE1 se déroule dans l'appareil de Golgi et qu'une interaction transitoire entre les deux protéines précède ce clivage.

### 2) BACE1 régule la quantité de RI à la surface cellulaire

La réduction du clivage de RI par l'inhibition de BACE1 conduit à une augmentation de la quantité de RI à la surface cellulaire et à une augmentation de sa quantité phosphorylée en réponse à une stimulation par l'insuline.

### 3) Régulation du clivage du RI par BACE1

L'interaction entre BACE1 et le RI et le clivage du RI par BACE1 sont augmentés par les concentrations élevées en glucose des milieux de culture. De plus, l'isoforme A du RI interagit plus avec BACE1 et est plus efficacement clivé que l'isoforme B.

#### **4) Le clivage du RI par BACE1 in vivo**

La mesure du fragment soluble du RI dans le plasma des souris déficientes en BACE1 (obtenues grâce à une collaboration avec le groupe de M. Ashford - Dundee, Ecosse) nous montre que BACE1 intervient dans le clivage du RI in vivo. Les souris déficientes en RI uniquement dans le foie (obtenues grâce à une collaboration avec le groupe de S. Biddinger - Boston, USA) nous apprennent que le clivage du RI est très efficace dans le foie. Le foie est donc l'organe dans lequel se réalise le clivage du RI par BACE1. En accord avec cela, nous détectons plus de RI, ainsi qu'une activation de la signalisation insulinique, dans le foie des souris déficientes en BACE1.

Les niveaux plasmatiques du fragment soluble du RI sont augmentés chez les souris diabétiques db/db, ce qui est en accord avec la stimulation du clivage du RI par le glucose. Dans le foie des souris db/db, l'expression de BACE1 (ARN et protéine) est augmentée, les niveaux d'ARN de RI sont également augmentés mais la quantité de RI mature (protéine) est réduite. Ces résultats suggèrent une augmentation du clivage du RI par BACE1 dans le foie des souris db/db.

#### **5) Le clivage de RI dans les tumeurs**

Nos résultats cellulaires montrent que l'isoforme A du RI est plus clivé par BACE1 que l'isoforme B. Par ailleurs, il est connu que les cellules cancéreuses et les tumeurs surexpriment l'isoforme A du RI. Nous montrons, grâce à un modèle de xénogreffe (collaboration avec C. Desbois-Mouthon - Paris) que les niveaux plasmatiques du fragment de RI sont positivement corrélés à l'expression en ARN de l'isoforme A du RI de la tumeur. La mesure du RI dans le plasma est donc un marqueur de l'expression de l'isoforme A du RI dans les tumeurs.

#### **6) Séquence du RI clivée par BACE1**

Nous avons identifié par une approche biochimique que le clivage du RI par BACE1 se réalise dans une zone extracellulaire juxtamembranaire de 23 aa de la chaîne beta du RI. Une approche bioinformatique a ensuite permis de réduire cette séquence à 11 aa. La majorité des mutations réalisées dans cette séquence entraînent une rétention intracellulaire du RI et pour l'instant nous n'avons pas identifié avec précision le site de clivage. Nous poursuivons nos efforts pour générer une forme du RI non clivable par BACE1 qui nous permettra de conclure sans ambiguïté sur l'importance du clivage du RI dans la signalisation insulinique.

#### **C. Faits marquants**

- La doctorante supposée intervenir dans la réalisation de ce projet a abandonné sa thèse peu après l'obtention du financement SFD.
- L'ensemble de ces résultats ont été soumis au Journal of Clinical Investigation.
- Une partie de ces résultats sera présentée au congrès de la SFD (Lille 2017 - CO-57).