

ROLE DE L'INSULINE DANS LA REGULATION DU METABOLISME CHEZ LE POULET

Taouis Mohammed

Endocrinologie de la Croissance et du Métabolisme, Station de Recherches Avicoles, NOUZILLY.

Résumé

Le poulet est caractérisé par une hyperglycémie (2g/l) et une relative insulino-résistance. Notre laboratoire a dans le passé montré que le récepteur de l'insuline est exprimé dans différents tissus du poulet (foie, muscle, cerveau etc...) et que sa structure moléculaire est similaire à celle du récepteur des mammifères (Simon et al; 1986 ; Simon et Taouis, 1993). Récemment, nous avons cloné et séquencé le gène codant pour une protéine représentant le substrat majeur de la tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (IRS-1) (Taouis et al., 1996) et caractérisé la PI3-kinase, enzyme impliquée dans le transport de glucose et des acides aminés, chez le poulet (Gillet et al., 1996). Le but de notre travail était de démontrer le rôle de l'insuline dans la régulation d'IRS-1 et de la PI 3-kinase en fonction de l'état nutritionnel. En effet, le jeûne réduit la phosphorylation de IRS-1 et l'activité PI 3-kinase dans le foie mais pas dans le muscle et qui sont restaurées après réalimentation des animaux.

Introduction

L'insuline est considérée comme hormone anabolisante dont les actions métaboliques et mitogéniques favorisent le développement des tissus en augmentant leur capacité de synthèse et de stockage des lipides et des protéines ainsi qu'en augmentant l'activité mitotique. Dans les dix dernières années une progression considérable a été réalisée dans la compréhension du mode d'action de l'insuline chez les mammifères. En particulier, le clonage et le séquençage du substrat majeur du récepteur de l'insuline : IRS-1 ont permis de caractériser cette protéine clé dans le mécanisme d'action de l'insuline. En effet, après la liaison de l'insuline à son récepteur celui-ci est autophosphorylé et phosphoryle à son tour des substrats endogènes dont IRS-1. La phosphorylation d'IRS-1 est réalisée sur des résidus tyrosine localisés dans des environnements spécifiques : YXXM ou YMXM permettant à IRS-1 d'activer d'autres protéines telles que la PI-3 kinase, enzyme responsable de la translocation des transporteurs de glucose en réponse à l'insuline. IRS-1 peut aussi s'associer à d'autres protéines intervenant dans la synthèse protéique, lipidique ou activant l'expression génique et la multiplication cellulaire.

Chez le poulet les connaissances concernant le mode d'action de l'insuline jusqu'à 1992 étaient limitées aux études du récepteur et de la régulation de son activité tyrosine kinase en utilisant des substrats artificiels. Ces études ont montré que chez cette espèce hyperglycémique et relativement résistante à l'insuline exogène et possédant une insuline hyperactive, le récepteur de l'insuline est fonctionnel et présente les mêmes caractéristiques moléculaires et

enzymatiques que son homologue décrit chez les mammifères. Toutefois, pour la compréhension du rôle de l'insuline dans la régulation du métabolisme protéique, glucidique et lipidique dans les tissus cibles (muscle, foie et tissu adipeux) il était indispensable d'identifier un ou plusieurs substrats endogènes du récepteur. Nous avons dans un premier temps cloné et séquencé l'homologue d'IRS-1 chez le poulet, étudié son expression pendant le développement embryonnaire. La régulation de la phosphorylation d'IRS-1 par la prise alimentaire a été étudiée dans le muscle et le foie. Nous avons aussi caractérisé la PI3-kinase dans le foie et dans le muscle et étudié sa régulation par la prise alimentaire.

Résultats

1. Clonage et séquençage d'IRS-1

Comme la région codante d'IRS-1 chez les mammifères n'est pas interrompue d'introns, nous avons tenté d'isoler l'homologue du gène codant pour IRS-1 à partir d'ADN génomique par PCR. Les amorces utilisées ont été sélectionnées par alignement des séquences des mammifères et le couple d'amorce choisi encadrait toute la région codante. Un fragment de 3,7 kb a été amplifié et correspond à la taille attendue. La séquence d'acides aminés déduite montre que IRS-1 du poulet contient 1240 acides aminés. La séquence d'acides aminés d'IRS-1 du poulet présente une identité de 91%, 83%, 84% et 64% avec respectivement IRS-1 de l'homme, de souris, de rat et du xenope. Ce résultat montre que IRS-1 est très conservé. IRS-1 du poulet contient 9 motifs YXXM (dans les positions 463, 549, 610, 630, 660, 730, 940, 987 et 1010), dont la phosphorylation

leur permet d'interagir avec des protéines possédant des domaines Src Homology 2 (SH-2) telle que la PI-3kinase. IRS-1 du poulet possède aussi un résidu tyrosine (position 895) permettant l'interaction avec Grb2 (Growth Binding Receptor), protéine activant la voie ras/raf essentielle dans l'activation de l'expression génique et la multiplication cellulaire. Enfin, IRS-1 du poulet possède plusieurs résidus sérines qui sont des potentiels substrats pour la protéine kinase A AMPc-dépendante, la protéine kinase C, la caséine kinase II, et la cdc2 kinase (Sun et al., 1991).

2. Expression d'IRS-1

L'expression d'IRS-1 a été étudiée par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) au cours du développement embryonnaire et après éclosion. L'ARNm codant pour IRS-1 a été détecté chez les embryons de 7 jours (tête et corps), de 14 et 20 jours (foie et muscle) et après 2 jours et 3 semaines de l'éclosion dans le foie, le muscle et le tissu adipeux. Ce résultat indique que IRS-1 est exprimé très tôt dans le développement embryonnaire et dans plusieurs tissus cibles de l'insuline et cette expression persiste après l'éclosion et au cours de la phase de croissance du poulet.

3. La phosphorylation d'IRS-1 chez le poulet est régulée par la prise alimentaire

Dans un premier temps nous avons caractérisé IRS-1 chez le poulet en utilisant la technique de Western-blot et des anticorps anti-IRS-1 de rat. Nous avons montré que IRS-1 est exprimé dans le foie et dans le muscle du poulet et que IRS-1 est phosphorylé *in vivo* sur résidus tyrosines (Dupont et al., 1996). Dans un deuxième temps nous avons étudié la régulation de la phosphorylation d'IRS-1 et de la sous-unité β du récepteur de l'insuline par la prise alimentaire. En effet, l'étude a été réalisée sur deux tissus cibles de l'insuline : le muscle et le foie dans trois situations nutritionnelles différentes (à jeun pendant 48 heures, à jeun pendant 48 heures et renourris pour 30 minutes et enfin nourris *ad-libitum*). Après solubilisation des tissus, immunoprécipitation avec des anticorps anti-phosphotyrosines ou anti-récepteurs, les échantillons sont soumis à une électrophorèse et électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Les membranes de nitrocellulose sont révélées en utilisant les mêmes anticorps et seront soumis à une révélation ECL (Electrochemoluminescence). Les résultats obtenus indiquent que le jeûne réduit significativement la phosphorylation du récepteur et de IRS-1 et que la réalimentation stimule cette phosphorylation dans le foie. En effet, à jeun l'insulinémie baisse alors que la réalimentation augmente le niveau d'insuline qui à son tour activera le récepteur de l'insuline qui phosphorylera IRS-1 engendrant ainsi les actions

métaboliques de l'insuline dans le foie. Toutefois, ces variations observées dans le foie ne sont pas retrouvées dans le muscle où le jeûne affecte peu le niveau de phosphorylation d'IRS-1. Ces données indiquent que le foie et le muscle se comportent différemment vis à vis de la prise alimentaire et cela aussi indiquerait une distribution différente des nutriments. Enfin, en utilisant la RT-PCR nous avons montré que le jeûne induit une surexpression du récepteur de l'insuline et d'IRS-1 (Dupont et al., en préparation).

4. Caractérisation, régulation et expression de la PI 3-kinase chez le poulet:

Après sa phosphorylation IRS-1 interagit avec plusieurs protéines intervenant dans les actions métabolique et mitogénique, parmi ces protéines la PI 3-kinase est considérée actuellement comme une enzyme clé dans la translocation insulino-dépendante des transporteurs de glucose à la surface cellulaire. Par conséquent cette enzyme du point zootechnique est très importante parcequ'elle va réguler le transport des nutriments (glucose et acides aminés) vers les tissus cibles (muscle, foie et tissu adipeux) en réponse à l'insuline et favorise la croissance.

Nous avons caractérisé la sous-unité catalytique de la PI 3-kinase la p85 et montré qu'elle est exprimée dans le foie et dans le muscle et présente le même poids moléculaire que celle décrite chez les mammifères (Taouis et al., 1994; Gillet et al., 1996). L'activité PI 3-kinase a été aussi mesurée et caractérisée dans le foie et dans le muscle du poulet. Nous avons aussi montré que cette activité est régulée dans le foie par la prise alimentaire dans le même protocole expérimental défini pour IRS-1. En effet, le jeûne induit une réduction de l'activité PI 3-kinase dans le foie qui est restaurée après réalimentation des animaux. Ces variations ne sont pas observées dans le muscle et comme pour la phosphorylation d'IRS-1 l'activité PI 3-kinase semble être régulée d'une manière tissu-dépendante indiquant ainsi des incorporations différentes de nutriments en réponse à l'insuline et en fonction des tissus considérés. Ces variations d'activité enzymatique ne sont pas dues à des variations d'expression de messenger parceque nous avons montré par RT-PCR que l'expression de l'ARNm de la PI 3-kinase n'est pas modifiée par la prise alimentaire.

Conclusion

Nous avons caractérisé deux protéines clés intervenant dans l'action de l'insuline chez le poulet : IRS-1 et la PI 3-kinase. Ces deux protéines sont exprimées dans le foie et le muscle, tissus cibles de l'insuline, et leur régulation est tissu-spécifique. La mise à jeun des animaux réduit la phosphorylation d'IRS-1 et l'activité PI-3 kinase. Cette réduction

serait liée au niveau de l'insulinémie des animaux à jeun et qui est très bas. La réalimentation des animaux augmentent la phosphorylation d'IRS-1 sur tyrosine et l'activité PI 3-kinase dans le foie mais pas dans le muscle. La réalimentation est accompagnée par une augmentation de l'insulinémie. Ces données indiquent que in vivo l'insuline régule étroitement la phosphorylation d'IRS-1 et l'activité PI 3-kinase et par conséquent régule le transport des nutriments vers les tissus cibles. Cette régulation est tissu-spécifique indiquant ainsi le rôle de l'insuline dans le distribution des nutriments.

La compréhension du mode d'action de l'insuline dans les différents tissus cibles (foie, muscle et tissu adipeux) nous permettra dans le futur de mieux contrôler la distribution des nutriments et leur transport vers les différents tissus.

Références

- Dupont J., Derouet M., Simon J., Taouis M., 1996. *Annales D'Endocrinologie*, 57, 25
- Gillet A., Derouet M., Simon J., Taouis M., 1996. *Annales d'Endocrinologie*, 57, 53
- Simon J., LeRoith D., 1986. *Eur. J. Biochem.* 158, 125-132
- Simon J., Taouis M., 1993. *Avian Endocrinology*. J. Endocrinology Ltd, Bristol, 177-188
- Sun XJ., Rothenberg P., Kahn RC., Backer JM., Araki E., Wilden PA., Cahill DA., Golstein BJ., White MF., 1991. *Nature* 352, 73-77
- Taouis M., Levy-Toledano R., Roach P., Taylor SI., Gorden P., 1994. *J. Biol. Chem.*, 269, 14912-14918
- Taouis M., Taylor SI., Reitman M., 1996. *Gene*. 178, 51-55