

# Grb14 - Physio 2006

Anne-Françoise BURNOL (Institut Cochin, INSERM U1016), Tarik ISSAD (Institut Cochin, INSERM U1016), Bruno VILLOUTREIX (INSERM U973)



**Contrôle de la sensibilité à l'insuline par la protéine Grb14 : conséquences physiologiques d'une modulation de l'expression de Grb14, et développement d'agents insulino-sensibilisateurs inhibant l'interaction Grb14/récepteur**

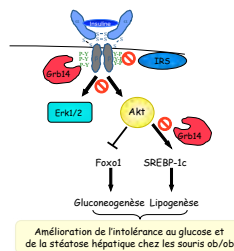
## Contexte

Les pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2, qui sont en pleine expansion actuellement dans les sociétés occidentalisées, sont associées à une insulino-résistance. L'identification de nouvelles cibles permettant d'améliorer l'action de l'insuline constitue donc une approche thérapeutique prometteuse pour le traitement de ces maladies. La protéine Grb14 est exprimée spécifiquement dans les tissus insulino-sensibles et se lie sur le récepteur de l'insuline (RI) activé en réponse à la stimulation hormonale. Grb14 inhibe l'action de l'insuline en bloquant l'activité tyrosine kinase du RI. On observe une augmentation de l'expression de Grb14 dans le tissu adipeux de patients diabétiques de type 2, ainsi qu'une corrélation entre le niveau d'expression de Grb14 et la diminution de sensibilité à l'insuline dans des modèles animaux d'insulinorésistance, suggérant ainsi que Grb14 pourrait être impliquée dans la diminution de la signalisation de l'insuline.

## Résultats

**Conséquences d'une diminution de l'expression de Grb14 sur le métabolisme hépatocytaire et la régulation de l'homéostasie énergétique**

L'inactivation de Grb14 par ARN interférence dans les hépatocytes en culture primaire et *in vivo* dans le foie montre que Grb14 agit à plusieurs niveaux des voies de signalisation insuline: i) comme inhibiteur de l'activité catalytique du RI; ii) au niveau de la maturation du facteur de transcription SREBP-1c. La diminution de l'expression de Grb14 dans le foie de souris *ob/ob* induit ainsi une amélioration du profil métabolique et une diminution de la glycémie.



**Analyse par mutagenèse dirigée des déterminants moléculaires impliqués dans la spécificité d'interaction entre Grb14 et le récepteur de l'insuline**

L'analyse de mutants ponctuels de Grb14 et du RI pour leur capacité à former un complexe en réponse à une stimulation par l'insuline ainsi que pour leur activité biologique (test de complémentation fonctionnelle sur la prolifération cellulaire de MEF KO pour Grb14 et capacité à inhiber la maturation de l'ovocyte de Xénope) a permis : i) d'identifier des résidus importants pour la spécificité de l'interaction Grb14-RI ; ii) de démontrer que le rôle inhibiteur de Grb14 n'est pas restreint à son action au niveau du récepteur, car Grb14 agit également à des niveaux plus en aval des voies de signalisation, dont l'interaction avec la kinase PDK1.

## Conclusions-Perspectives-Impact

La complémentarité des trois groupes impliqués, combinant des approches de bioinformatique et chimioinformatique, de biophysique (BRET), de biologie cellulaire et de physiologie, nous a permis d'obtenir des résultats marquants, tant d'un point de vue des connaissances fondamentales (rôle de Grb14 dans la physiologie métabolique, études structure-fonction) que vis-à-vis d'une recherche plus appliquée visant à développer des molécules capables d'améliorer l'action de l'insuline chez les patients diabétiques. Cette approche multidisciplinaire sera poursuivie par des collaborations impliquant les trois partenaires de cette ANR, d'une part pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'action de l'insuline par Grb14, et d'autre part dans le but de développer de nouvelles molécules potentiellement intéressantes pour le traitement du diabète.

## Objectifs

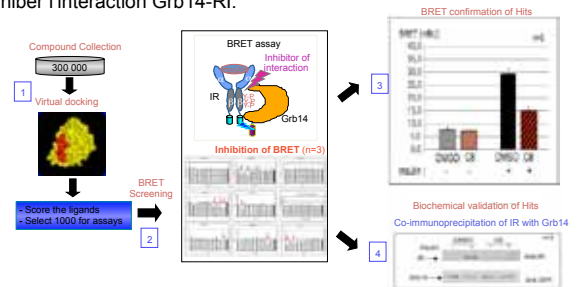
Nos objectifs étaient de déterminer si des variations de l'expression de Grb14 induisent des modifications de la signalisation et/ou de l'action de l'insuline. Parallèlement nous avons recherché des molécules diminuant l'interaction de Grb14 avec le RI. De telles molécules pourraient constituer des agents insulino-sensibilisateurs permettant d'améliorer la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie énergétique de patients obèses ou diabétiques de type 2.

Le projet comporte 3 volets majeurs : 1) Une étude biochimique et physiologique des conséquences de modifications de l'expression de Grb14 dans les adipocytes et les hépatocytes; 2) Une analyse moléculaire de la spécificité de l'interaction entre Grb14 et le récepteur de l'insuline; 3) Un criblage visant à identifier des molécules capables de bloquer le recrutement de Grb14 sur le RI.

**Identification d'agents capables d'inhiber l'interaction Grb14-**

**RI**

Un crible virtuel *in silico* a permis de sélectionner dans une banque de 300 000 molécules celles susceptibles de se lier dans une poche identifiée sur le RI. 1000 d'entre elles ont été criblées par un système de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) *in vitro* pour leur capacité à inhiber l'interaction Grb14-RI.



Trois molécules ainsi isolées sont également capables de diminuer l'interaction Grb14-RI dans un test de co-immunoprécipitation.

Ces molécules, et plus particulièrement le composé C8 qui est le plus actif, sont actuellement testées pour leur activité en systèmes cellulaires, pour leurs effets sur la formation du complexe Grb14-RI et sur la signalisation du récepteur de l'insuline. Parallèlement nous cherchons à optimiser ces molécules (par docking virtuel et par approche chimio-informatique).

## Publications-Valorisations

- > Carré N, Caüzac M, Girard J, Burnol AF. (2008) Dual effect of the adapter Grb14 on insulin action in primary hepatocytes. *Endocrinology* 149 : 3109-17.
- > Goenaga D, Hampe H, Carré N, Cailliau K, Browaeys-Poly E, Perdereau D, Holt LJ, Daly RJ, Girard J, Broutin B, Issad T, Burnol AF. (2009) Molecular determinants of Grb14-mediated inhibition of insulin signaling. *Mol. Endocrinol.* 23 : 1043-51.
- > Villoutreix BO, Eudes R, Miteva MA. (2009) Structure-based virtual ligand screening. *Comb Chem High Throughput Screen.* 12 : 1000-16. (Review).
- > Carré N, Goenaga D, Burnol AF. (2011) Modulation de la sensibilité à l'insuline par les adaptateurs moléculaires de la famille de Grb7. *Obésité*, sous presse.
- > Formation: 2 thèses et 2 M2 soutenus sur ce projet. Une thèse en cours co-dirigée par deux des partenaires (TI et AFB) sur l'optimisation et l'étude des molécules identifiées dans le criblage.
- > Déclaration d'invention sur les molécules inhibitrices de l'interaction Grb14-RI en cours de dépôt.

### CONTACT :

[anne-francoise.burnol@inserm.fr](mailto:anne-francoise.burnol@inserm.fr)  
[tarik.issad@inserm.fr](mailto:tarik.issad@inserm.fr)  
[bruno.villoutreix@paris7.jussieu.fr](mailto:bruno.villoutreix@paris7.jussieu.fr)

