

[Front Endocrinol \(Lausanne\)](#). 2016 ; 7 : 4.

Publié en ligne le 27 janvier 2016. doi: [10.3389/fendo.2016.00004](https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00004)

PMCID : PMC4728290

PMID : [26858689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26858689/)

Effets différentiels du Lait de Chamelle sur la signalisation des récepteurs de l'insuline – Vers la compréhension des propriétés analogues à l'insuline du Lait de Chamelle

[Abdulrasheed O. Abdulrahman](#), ¹[Mohammad A. Ismael](#), ¹[Khaled Al-Hosaini](#), ²[Christelle Rame](#), ^{3,4,5}[Abdulrahman M. Al-Senaïdy](#), ¹[Joëlle Dupont](#), ^{3,4,5} et [Mohammed Akli Ayoub](#) ^{1,3,4,5,6,7,*}

[Informations sur l'auteur](#) [Notes sur l'article](#) [Informations sur les droits d'auteur et la licence](#) [Avertissement PMC](#)

Abstrait

Études antérieures sur le chameau d'Arabie (*Camelus dromedarius*) a montré les effets bénéfiques de son lait rapportés dans divers modèles de maladies humaines, y compris une activité hypoglycémique importante. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans de tels effets restent totalement inconnus. Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que le Lait de Chamelle pourrait agir au niveau du récepteur de l'insuline humaine (hIR) et de ses voies de signalisation intracellulaires associées. Par conséquent, nous avons examiné l'effet du Lait de Chamelle sur l'activation du hIR exprimé de manière transitoire dans les cellules du rein embryonnaire humain 293 (HEK293) à l'aide de la technologie de transfert d'énergie par résonance bioluminescente (BRET). BRET a été utilisé pour évaluer, dans des cellules vivantes et en temps réel, l'interaction physique entre les protéines de signalisation hIR et les récepteurs de l'insuline (IRS1) et la protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance (Grb2). Nos données ont montré que le Lait de Chamelle ne favorisait aucune augmentation du signal BRET entre hIR et IRS1 ou Grb2 en l'absence de stimulation insulinique. Cependant, cela a significativement potentialisé le signal BRET maximal promu par l'insuline entre hIR et Grb2, mais pas IRS1. Il est intéressant de noter que le Lait de Chamelle

semble avoir un impact différentiel sur la signalisation en aval, car il active de manière significative ERK1/2 et potentialise l'ERK1/2 induite par l'insuline, mais pas l'activation de l'Akt. Ces observations sont dans une certaine mesure cohérentes avec les données BRET puisque l'on sait que l'activation de ERK1/2 et d'Akt reflète l'engagement des voies Grb2 et IRS1, respectivement. Le fractionnement préliminaire du Lait de Chamelle suggère la nature peptidique/protéique du composant actif du Lait de Chamelle. Ensemble, notre étude démontre pour la première fois un effet allostérique du Lait de Chamelle sur la conformation et l'activation des récepteurs de l'insuline avec des effets différentiels sur sa signalisation intracellulaire. Ces résultats devraient permettre de mieux comprendre l'activité hypoglycémiante du Lait de Chamelle et de potentielles applications thérapeutiques.

Mots clés : lait de chamelle, insuline, récepteur de l'insuline, BRET, GRB2, IRS1, ERK1/2, Akt

[Aller à:](#)

Introduction

Depuis de nombreuses années, le chameau suscite des passions principalement en raison de sa fascinante capacité d'adaptation dans des conditions environnementales et alimentaires sévères ainsi que de la composition et des propriétés thérapeutiques de son lait ([1](#)). En effet, de nombreuses études ont rapporté des propriétés biochimiques intéressantes du Lait de Chamelle ([2](#) – [4](#)) et sa composition chimique ([5](#) – [8](#)), ainsi que la stabilité de ses composants par rapport à d'autres mammifères, comme l'homme et le bovin ([2](#)). Historiquement, le Lait de Chamelle a été proposé comme traitement alternatif pour un certain nombre de problèmes médicaux ([9](#)) et pour avoir des avantages potentiels dans de nombreuses maladies, telles que les allergies et les infections virales ([10](#)).[11](#)). Néanmoins, l'observation la plus importante reste son activité hypoglycémique observée dans le diabète de type 1 sur des modèles humains et animaux ([11](#) – [18](#)). Par exemple, le Lait de Chamelle a été proposé comme complément à la thérapie à base d'insuline permettant de réduire

les doses d'insuline requises chez les patients atteints de diabète de type 1 (12 , 14 , 19). Ceci suggère que l'activité antidiabétique du Lait de Chamelle est médiée par des effets de type insuline et/ou immunomodulateurs sur les cellules bêta du pancréas (17). La séquence d'acides aminés de certaines protéines isolées du Lait de Chamelle serait riche en demi-cystine, ce qui implique une similitude avec la famille des peptides de l'insuline (20). L'effet direct de l'insuline du lait elle-même est également possible puisqu'il a été démontré que le Lait de Chamelle contient des concentrations élevées d'insuline (2 , 21) par rapport à ce que l'on trouve dans le lait de vache (16), et cela semble dépendre du stade de lactation. Cependant, si l'insuline présente dans le Lait de Chamelle est impliquée, on ne sait toujours pas comment elle peut rester biologiquement active après son absorption par l'épithélium intestinal même si de nombreuses possibilités ont été évoquées (22). Ainsi, de nombreuses études ont rapporté les effets bénéfiques du Lait de Chamelle dans le diabète sucré mais les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces effets sont totalement inconnus.

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que le Lait de Chamelle pourrait avoir un effet « direct » sur l'activation et la fonction des récepteurs de l'insuline au niveau des principaux tissus cibles. Pour tester cette hypothèse, nous avons examiné l'effet du Lait de Chamelle sur l'activation du récepteur de l'insuline humaine (hIR) en étudiant son association physique avec deux protéines de signalisation clés, les protéines de signalisation du récepteur de l'insuline (IRS1) et la protéine 2 liée au récepteur du facteur de croissance (Grb2).), connu pour se lier directement ou indirectement au récepteur lors de son activation/phosphorylation par liaison à l'insuline. Pour cela, nous avons utilisé la technologie de transfert d'énergie par résonance bioluminescente (BRET), comme indiqué précédemment pour le récepteur de l'insuline (23 , 24), le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (25) et divers récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (26-28). Cette approche nous a permis d'évaluer l'activation de hIR grâce à la surveillance de la liaison d'IRS1 et Grb2 au complexe protéique impliquant le récepteur, en temps réel et sur des cellules vivantes, avant et lors de l'activation avec

l'insuline. De plus, nous avons tenté de relier nos données BRET aux voies de signalisation en aval de hIR en évaluant la phosphorylation induite par l'insuline de la protéine kinase B (ou Akt) et des kinases extracellulaires régulées par le signal (ou ERK1/2) connues pour traduire l'activation par hIR de IRS1. et Grb2, respectivement ([29](#) , [30](#)).

[Aller à:](#)

Matériels et méthodes

Plasmides d'expression de mammifères

Les plasmides d'expression de mammifères codant pour les différentes protéines utilisées dans cette étude étaient les suivants : hIR fusionné avec *Renilla* luciférase 8 (Rluc8) était un cadeau du Dr Rasmus Jorgensen (Hagedorn Research Institute, Novo Nordisk, Gentofte, Danemark), l'IRS1 (1–262)-YFP a été aimablement obtenu auprès du Dr Tarik Issad (Institut Cochin, Paris, France), et Grb2 – Venus a été fourni par le Dr Kevin Pflieger (Institut de recherche médicale Harry Perkins et Centre de recherche médicale, Nedlands, Australie). Tous les plasmides ont été séquencés et leur expression correcte a été vérifiée par luminescence et fluorescence parallèlement aux mesures BRET comme décrit ci-dessous.

Culture cellulaire et transfection transitoire

Les cellules HEK293 ont été cultivées dans du milieu de Eagle modifié par Gibco® Dulbecco (DMEM) additionné de 10 % de sérum bovin foetal (FBS), 100 unités/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, et maintenues à 37°C dans 5 % de CO₂ . Pour les transfections transitoires, Lipofectamine® Le réactif 2000 a été utilisé conformément aux instructions du fabricant (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Par puits de microplaques à 96 puits, un total de 200 ng de plasmides (100 ng de hIR – Rluc8 + 100 ng de protéines marquées Venus/YFP) et 0,5 µl de lipofectamine ont été pré-incubés séparément dans 25 µl de milieu DMEM sans sérum. pendant 5 min à température ambiante. Ensuite, les deux solutions ont été mélangées et incubées pendant 20 minutes à température ambiante avant d'ajouter le mélange aux

cellules. Les cellules ont été récoltées avec 0,05 % de trypsine-EDTA et, après neutralisation avec du DMEM, les cellules ont été comptées à l'aide du compteur de cellules automatisé Countess[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et une densité de 10^5 cellules par puits de plaques à 96 puits ont étéensemencées avec le mélange de transfection et incubé 48 h avant les mesures BRET.

Lait de Chamelle et son fractionnement

Du Lait de Chamelle frais a été obtenu dans des fermes locales de Riyad et différentes formes de lait ont été utilisées dans cette étude : (i) du Lait de Chamelle simplement dégraissé, (ii) des fractions de lactosérum versus caséine, (iii) des fractions de protéines du lait avec différents poids moléculaires, ou (iv) fractions protéiques par rapport aux fractions non protéiques. L'échantillon de Lait de Chamelle a été dégraissé par centrifugation à 4 000 tr/min pendant 30 min à 4°C. Pour la séparation des composants du lactosérum des caséines, une précipitation acide à pH 4,6 a été réalisée par addition de 10 % (*v/v*) d'acide acétique suivie d'une centrifugation à 4 000 tr/min pendant 30 min à 10°C. De plus, afin de séparer les différentes fractions protéiques du Lait de Chamelle selon leur poids moléculaire, le Lait de Chamelle dégraissé a été soumis à une centrifugation à $3500 \times g$ et 25°C pendant 60 min puis filtration à l'aide de différents filtres centrifuges Amicon Ultra-15 ; 10 000, 30 000 et 50 000 NMWL selon les instructions du fabricant (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Chromatographie par filtration sur gel

Pour cela, nous avons utilisé une colonne Sephadex G-25 permettant une plage de fractionnement pour les protéines globulaires de 1 000 à 5 000 de poids moléculaire. La résine Sephadex G-25 (15 g) a été trempée dans de l'eau déminéralisée pendant une nuit à 4 ° C, puis décantée pour éliminer les fines particules qui ne se sont pas déposées. La résine hydratée a été transférée dans un tampon PBS, pH 7,4, pour équilibrage et conditionnée sur une colonne (diamètre 2,6 cm ; longueur 40 cm ; colonne de chromatographie XK 26, GE Healthcare). Le Lait de Chamelle dégraissé (10 ml) a été appliqué sur la colonne et élué

avec le tampon PBS. Le débit a été fixé à 1 ml/min et des fractions de 3 ml ont été collectées à l'aide d'un système de chromatographie liquide rapide sur protéines (purificateur AKTA GE Healthcare, Uppsala, Suède). La concentration en protéines et celle en peptides dans les fractions éluées ont été contrôlées à 280 et 215 nm.

Électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide

Les fractions de Lait de Chamelle ont été soumises à une SDS-PAGE en utilisant des gels de Polyacrylamide à 4 % de jalonnement et à 12 % de résolution (gel de 18 mA/1 mm d'épaisseur), en cours d'exécution pendant 2 h dans des tampons Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 et Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, respectivement. Les protéines ont ensuite été colorées pendant une nuit dans une solution contenant le mélange de 0,1 % (*p / v*) de bleu de Coomassie R-250, 40 % (*v / v*) de méthanol, 50 % (*v / v*) d'eau et 10 % (*v / v*) acide acétique. Les gels ont été décolorés dans une solution contenant les derniers mélanges ci-dessus mais sans le Bleu de Coomassie R-250.

Mesures BRET

Quarante-huit heures après la transfection, les cellules HEK293 initialement cultivées dans des microplaques blanches de 96 puits à 10^5 cellules/puits ont d'abord été prétraitées ou non avec 100 µl/puits de Lait de Chamelle dégraissé ou ses fractions à 37°C. Après lavage avec du PBS 1 ×, les cellules adhérentes ont été remises en suspension dans 60 µl/puits de PBS et les mesures BRET ont été effectuées dans un volume final de 100 µl/puits après ajout de 20 µl d'insuline bovine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aux concentrations indiquées et 20 µl de substrat Coelenterazine-h (5 µM final) (Promega, Madison, WI, USA) comme indiqué précédemment (25 – 28). Les enregistrements BRET ont été réalisés en temps réel et sur des cellules vivantes à l'aide de Mithras²Lecteur multimode LB 943 (Berthold Biotechnologies, Bad Wildbad, Allemagne) permettant l'intégration séquentielle des signaux de luminescence détectés avec deux réglages de filtre (filtre Rluc, 480 ± 20 nm ; filtre YFP,

540 ± 25 nm). Pour déterminer le temps optimal de pré-incubation du Lait de Chamelle, les cellules ont d'abord été pré-incubées à différents moments (0, 5, 10, 15, 30 et 60 min) avec du Lait de Chamelle à 37°C et les signaux BRET ont ensuite été mesurés. après ajout de 100 nM d'insuline. Pour l'analyse dose-réponse, les cellules ont d'abord été pré-incubées 30 minutes à 37°C avec du Lait de Chamelle avant que les signaux BRET ne soient enregistrés en l'absence ou en présence de doses croissantes d'insuline (0,001, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10 000 nM).

Luminescence et fluorescence

La quantité de protéine de fusion Rluc8 et YFP/Vénus exprimée a été déterminée pour chaque condition de transfection. L'activité luciférase relative de hIR – Rluc8 a été déterminée parallèlement aux mesures BRET où 80 µl de cellules dans du PBS ont été incubées avec 20 µl de substrat Coelenterazine-h (5 µM final) et l'émission de Rluc8 a ensuite été mesurée à 480 nm. Pour la fluorescence des protéines marquées YFP/Vénus, 100 µl de cellules dans du PBS ont été étalées dans une microplaque noire à 96 puits et l'émission de fluorescence a ensuite été enregistrée à 535 nm après excitation des cellules à 480 nm à l'aide du lecteur de plaques Mithras LB 943.

ERK1/2 et phosphorylation Akt

Des cellules HEK293 co-exprimant de manière transitoire hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus ont été utilisées pour l'activation de ERK1 / 2 et d'Akt en utilisant la technique classique de SDS-PAGE et de Western blot ainsi que le test basé sur la fluorescence homogène résolue dans le temps (HTRF ®) (CisBio Bioassays, Codolet, France) comme décrit précédemment ([31](#), [32](#)), respectivement. Pour le SDS-PAGE et le Western blot, les cellules ont d'abord été cultivées dans une plaque à 6 puits et privées de nourriture pendant la nuit dans du DMEM sans sérum. Après prétraitement ou non avec 1 ml/puits de Lait de Chamelle dégraissé pendant 30 min à 37°C, les cellules ont ensuite été stimulées ou non avec 100 nM ou 1 µM d'insuline dans 500 µl/puits de PBS pendant 5 min à 37°C. L'extraction des protéines et le Western blot ont ensuite été réalisés en utilisant l'anticorps polyclonal de lapin contre le phospho-ERK1/2

(Thr202/Tyr204) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) dilué au 1/1000. Les signaux de Western blot ont été quantifiés avec le logiciel GeneTools (version 4.01.02) et exprimés en unités arbitraires après normalisation. Dans le test basé sur HTRF[®], le protocole à deux plaques a été utilisé comme décrit récemment (32) après prétraitement ou non par du Lait de Chamelle dégraissé et stimulation ou non par de l'insuline 100 nM aux instants indiqués. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 2 h à température ambiante avant de lire l'émission de fluorescence à 620 et 665 nm en utilisant les programmes HTRF appropriés sur le lecteur de plaques Mithras LB 943.

Données et analyse statistique

Les données sont présentées sous forme de ratio BRET comme décrit précédemment (33). Pour les expériences en présence de Lait de Chamelle, les effets sont indiqués comme « BRET induit par l'insuline » dans « % de contrôle » où les signaux BRET promus par l'insuline dans les cellules non traitées avec du Lait de Chamelle ont été pris comme 100 % de la réponse. Les courbes cinétiques et les courbes dose-réponse sigmoïdales ont été ajustées à l'aide du logiciel graphique Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) permettant l'analyse selon la régression non linéaire avec les équations suivantes : $BRET = BRET_0 + (BRET_{max} - BRET_0) / \{1 + 10^{[LogEC_{50} - (insuline)]}\}$ pour les courbes dose-réponse [signaux BRET en fonction de Log (insuline)], et $BRET = BRET_{max} * [1 - \exp(-K * temps)]$ pour la cinétique [signaux BRET en fonction du temps (minutes)]. Les données ERK1/2 et Akt ont été représentées sous la forme d'un rapport HTRF correspondant au rapport suivant : (l'émission à 665 nm/l'émission à 620 nm) × 10 000. Une analyse ANOVA unidirectionnelle et bidirectionnelle utilisant le test de comparaisons multiples de Turquie a été utilisée pour déterminer les différences statistiquement significatives entre les conditions non traitées (en l'absence de lait/fractions de chamelle) et traitées (en présence de lait/fractions de chamelle). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ns; non significatif.

Résultats

BRET pour surveiller l'activation de hIR en temps réel et dans les cellules vivantes

Tout d'abord, nous voulions valider l'applicabilité de l'approche BRET pour étudier l'activation du hIR comme indiqué précédemment pour ce récepteur (23, 24) ainsi que pour l'EGFR (25) et divers GPCR (26 – 28). Ceci repose principalement sur le recrutement, favorisé par les agonistes, de protéines de signalisation cytosoliques vers le récepteur membranaire, reflétant son activation. Pour cela, hIR marqué par Rluc8 et ses protéines de signalisation en interaction, IRS1 et Grb2, marquées avec la protéine fluorescente jaune (IRS1 – YFP) ou Vénus (Grb2 – Vénus), ont été utilisées respectivement comme donneur et accepteur de BRET (Figure(Figure 1A).1UN). Les protéines ont été exprimées de manière transitoire et correcte dans les cellules HEK293 (données non présentées) et les mesures BRET ont été effectuées, en temps réel et sur des cellules intactes, dans des conditions basales et lors de l'activation avec de l'insuline (Figure(Figure 1A).1UN). L'analyse en temps réel a montré que la stimulation des cellules avec 100 nM d'insuline favorisait de manière significative l'augmentation du BRET entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP (Figure(Figure 1B)1B) et Grb2–Vénus (Figure(Figure 1C).1C). Cela s'est bien produit en fonction du temps avec un plateau soutenu même après 30 minutes, démontrant la liaison directe ou indirecte des protéines au hIR activé. L'augmentation du BRET induite par l'insuline s'est produite de manière dose-dépendante avec la puissance de l'insuline pour hIR – IRS1 ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,6 \text{ nM}$, $n = 6$) (Figure(Figure 1D)1D) et hIR – Grb2 ($EC_{50} = 4,4 \pm 1,5 \text{ nM}$, $n = 6$) (Figure(Figure 1E)1E) des associations similaires à celles rapportées précédemment (23, 29, 34), indiquant l'activation du hIR favorisée par l'insuline. Ces données démontrent clairement l'applicabilité de l'approche BRET pour évaluer l'activation du hIR induite par l'insuline en temps réel et dans des cellules vivantes.

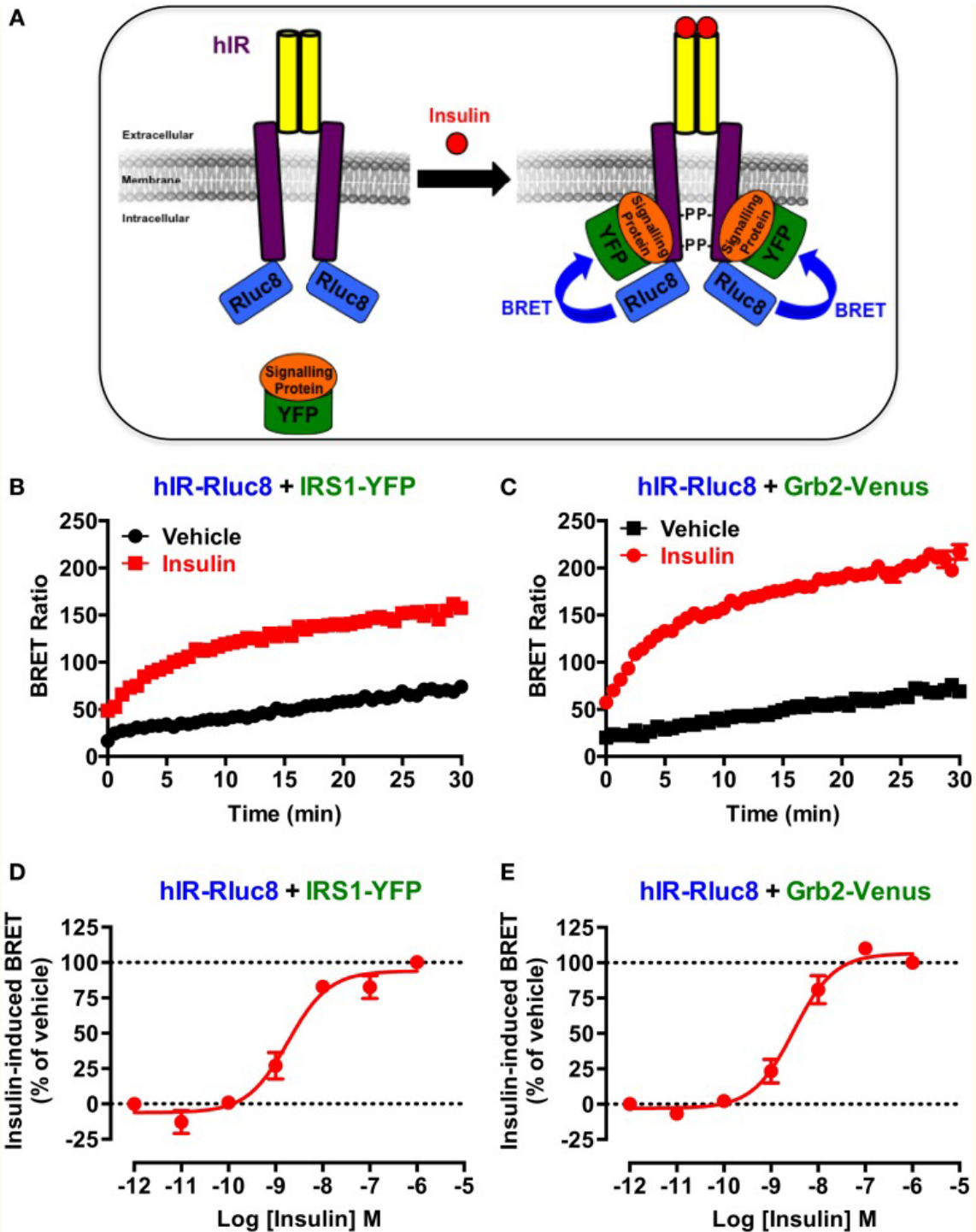


Figure 1

"**Test BRET pour surveiller l'activation de hIR**". (A) Représentation schématique du test basé sur BRET pour surveiller l'activation de hIR induite par l'insuline grâce à la détection de la proximité physique entre hIR – Rluc8 et ses protéines de signalisation marquées par YFP. Pour cela, les cellules HEK293 co-exprimant de manière transitoire hIR – Rluc8 avec IRS1 – YFP (B, D) ou Grb2 – Venus (C, E) ont été stimulées (cercle rouge) ou non (carré noir) avec 100 nM (B, C) ou des doses croissantes (D, E) d'insuline et des mesures BRET ont été effectuées en temps réel sur des cellules vivantes comme décrit dans la section « [Matériels et méthodes](#) ». Les données sont la moyenne \pm SEM de trois à six expériences indépendantes réalisées en triple.

Le Lait de Chamelle potentialise l'action de l'insuline sur son récepteur

Afin d'étudier notre hypothèse concernant les effets putatifs du Lait de Chamelle sur l'insuline et la signalisation de ses récepteurs, nous avons examiné l'effet du Lait de Chamelle sur l'association de IRS1 et Grb2 avec hIR à l'aide du test BRET. Traitement des cellules co-exprimant hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP (Figure(Figure 2A)2A) ou Grb2–Vénus (Figure(Figure 2B)2B) avec du Lait de Chamelle n'a favorisé aucune augmentation significative du BRET par rapport aux cellules non traitées (véhicule). En revanche, 100 nM d'insuline ont bien augmenté les signaux BRET dans les deux cas, comme prévu (Figures(Figures 2A, B).2UN B). Cette observation ne suggère aucun effet « de type insuline » du Lait de Chamelle sur les associations hIR-IRS1 ou hIR-Grb2 dans les cellules HEK293. Par conséquent, nous avons examiné l'effet du Lait de Chamelle sur l'action de l'insuline en traitant les cellules 30 minutes avec du Lait de Chamelle avant leur stimulation avec 100 nM d'insuline. Il est intéressant de noter que même si le prétraitement au Lait de Chamelle n'a pas modifié l'augmentation du BRET induit par l'insuline entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP (Figure(Figure 2C),2C), cela a significativement potentialisé l'effet de l'insuline pour favoriser l'augmentation du BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Vénus ($146 \pm 9 \%$, $n = 10$, *au plateau de 15 à 20 min de stimulation insulinique*) (Figure (Figure 2D).2D). Un tel effet n'était pas dû à d'éventuels effets artificiels du Lait de Chamelle sur la luminescence de hIR – Rluc8 (Figure(Figure 2E)2E) et fluorescence de Grb2 – Vénus (Figure(Figure 2F)2F) qui pourrait entraîner des modifications BRET non spécifiques. Bien entendu, l'augmentation du BRET induite par l'insuline reflète probablement le recrutement du Grb2 cytosolique dans le hIR activé. Cependant, le Lait de Chamelle peut induire ou stabiliser une conformation spécifique de hIR – Rluc8, conduisant à une plus forte proximité avec Grb2 – Vénus et/ou à une orientation favorable des fluorophores Rluc8 et Vénus après une stimulation par l'insuline sans nécessairement augmenter la liaison de Grb2. Dans tous les cas, la potentialisation médiée par le Lait de Chamelle suggère une

interaction allostérique entre les composants du Lait de Chamelle et l'insuline au niveau du récepteur.

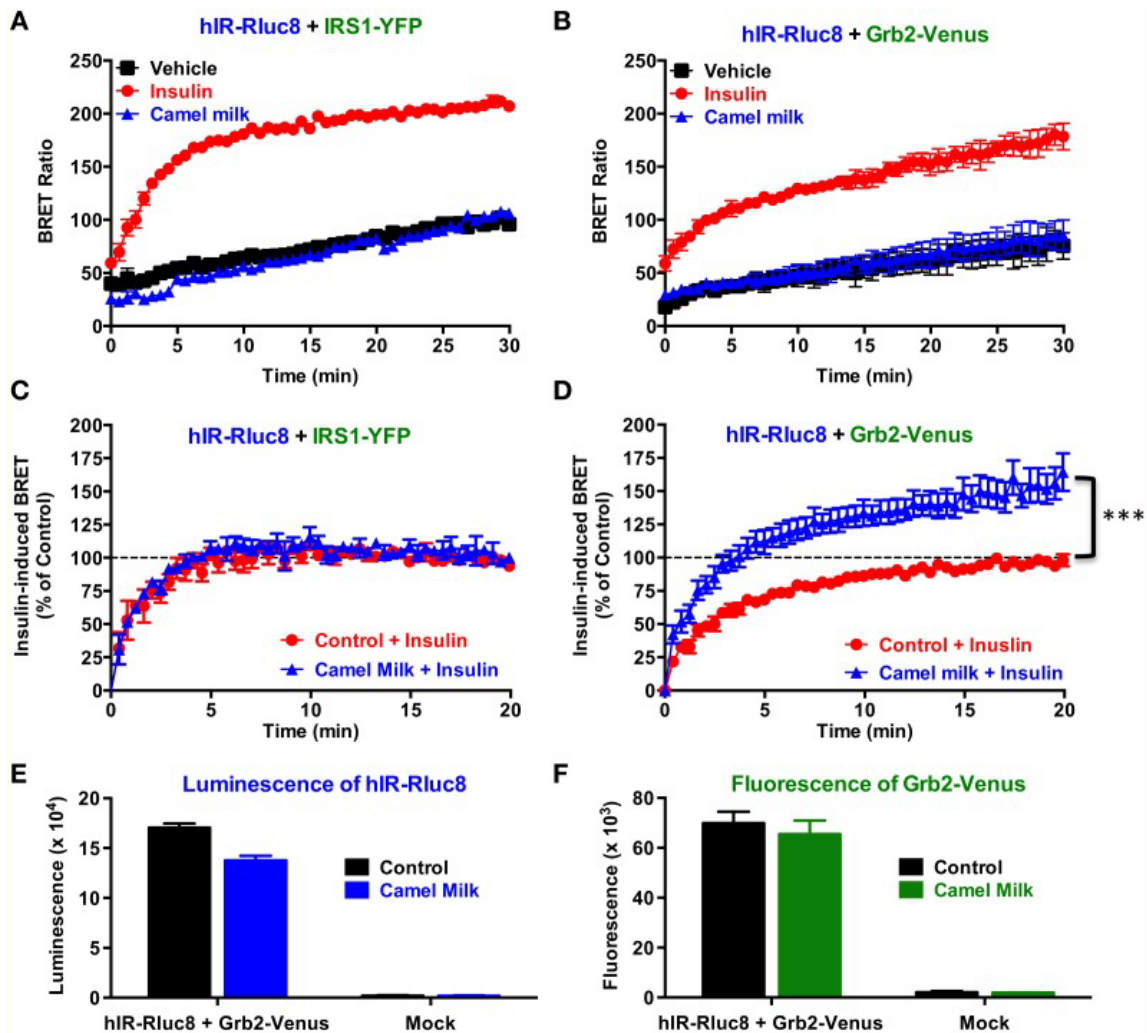


Figure 2

"Effet du Lait de Chamelle sur BRET entre hIR-Rluc8 et ses protéines de signalisation". Les cellules HEK293 co-exprimant de manière transitoire hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP (A, C) ou Grb2 – Venus (B, D – F) ont d'abord été prétraitées (triangle bleu) ou non (carré noir et cercle rouge) 30 min avec du Lait de Chamelle avant que les mesures BRET ne soient effectuées en l'absence ou en présence de stimulation avec 100 nM d'insuline comme indiqué. En parallèle, des analyses de luminescence (E) et de fluorescence (F) ont été réalisées pour quantifier l'expression relative de hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus, respectivement. Dans (C,D), les signaux BRET induits par l'insuline dans les cellules non prétraitées avec du Lait de Chamelle (cercle rouge) ont été normalisés à 100 %. Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 à 10 expériences indépendantes réalisées en triple.

Ensuite, nous avons effectué une analyse temporelle ainsi qu'une analyse dose-réponse sur l'effet du Lait de Chamelle sur les signaux BRET. L'analyse cinétique du BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus a montré un effet dépendant du temps du Lait de Chamelle avec un effet maximal à partir de 30 min de prétraitement ($145 \pm 6 \%$, $n = 3$, à 30 min) (Figure(Figure 3A).3UN). Ensuite, une analyse dose-réponse a été réalisée en l'absence et en présence d'un traitement de 30 minutes avec du Lait de Chamelle qui a clairement montré que le Lait de Chamelle n'avait aucun effet sur la dose-réponse à l'insuline dans les cellules co-exprimant hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP (Figure(Figure 3B).3B). En revanche, le Lait de Chamelle potentialise de manière significative la réponse maximale (efficacité) de l'insuline dans les cellules co-exprimant hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus ($E_{max} = 142,6 \pm 10,4 \%$, $n = 6$, à 10 μM d'insuline) (Figure(Figure 3C).3C). Notez qu'aucun effet sur la puissance de l'insuline n'a été observé, ce qui suggère qu'il n'y a aucun effet sur les propriétés de liaison du récepteur de l'insuline (Figure(Figure 3C).3C). Cependant, le fait que le Lait de Chamelle potentialise les signaux BRET à des concentrations saturantes d'insuline suggère en outre une action allostérique, qui semble avoir un impact spécifique sur hIR – Grb2 mais pas sur l'association, la conformation et / ou l'activation de hIR – IRS1.

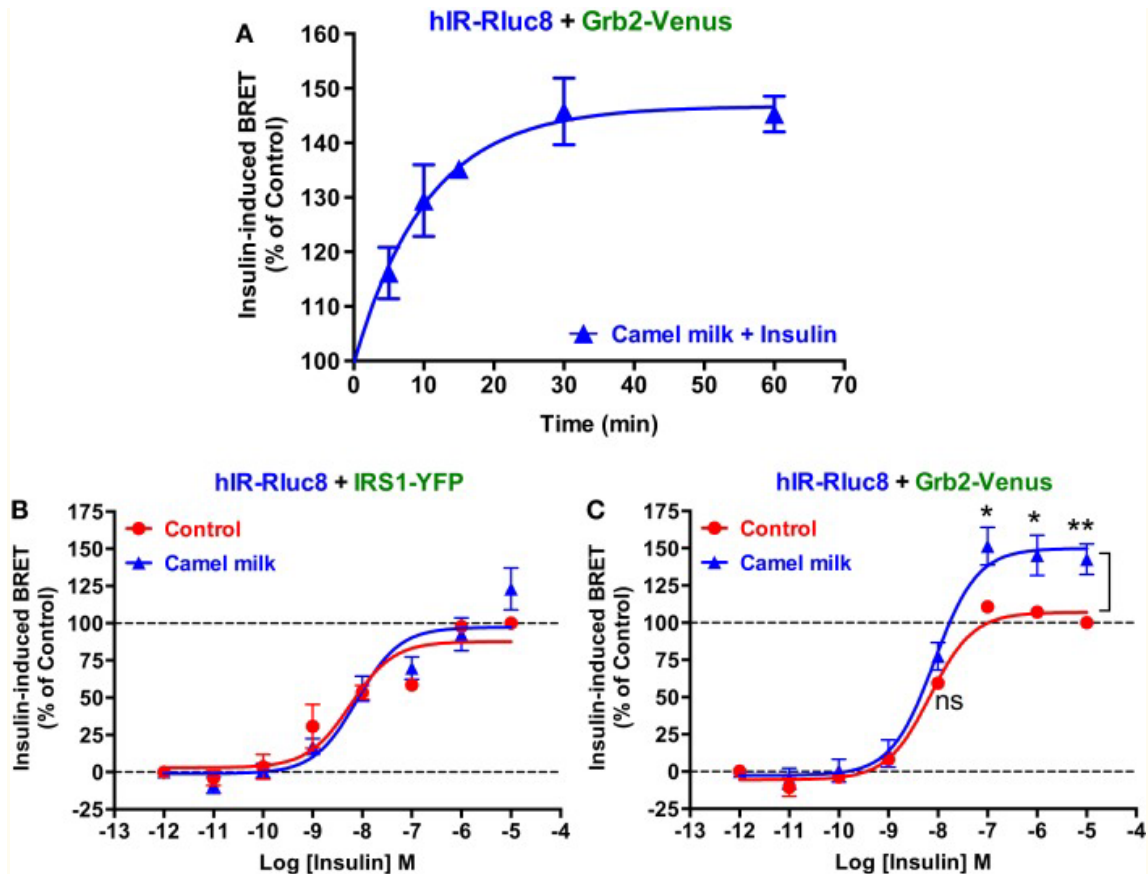


figure 3

"Analyse temporelle et dose-réponse de l'effet du Lait de Chamelle sur les signaux BRET". Les cellules HEK293 co-exprimant de manière transitoire hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus (**A**, **C**) ou IRS1 – YFP (**B**) ont d'abord été prétraitées (triangle bleu) ou non (cercle rouge) à différents moments (**A**) ou 30 min (**B**, **C**) avec du Lait de Chamelle avant que les mesures BRET ne soient effectuées en l'absence ou en présence de stimulation avec 100 nM (**A**) ou des doses croissantes (**B**, **C**) d'insuline comme indiqué. Les données sont la moyenne \pm SEM de trois (**A**, **B**) ou six (**C**) expériences indépendantes réalisées en triple.

La nature peptidique/protéique de l'agent potentialisateur du Lait de Chamelle

Pour caractériser davantage l'effet potentialisateur du Lait de Chamelle sur l'insuline et son récepteur, nous avons effectué divers fractionnements du Lait de Chamelle et testé leurs effets putatifs sur les signaux BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus (Figure(Figure4).4). Tout d'abord, nous avons simplement séparé le lait entier en deux fractions principales, les caséines qui représentent les principales protéines (~ 80 %) du lait de mammifère et le lactosérum contenant le reste des protéines du lait, comme illustré par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (Figure(Figure 4A).4UN). Comme le montre la

Figure 5A, alors que le Lait de Chamelle entier dégraissé a bien potentialisé l'augmentation du BRET induit par l'insuline, ni les fractions de caséine ni de lactosérum (1 mg/ml) n'ont affecté les signaux du BRET induits par l'insuline. La fraction de lactosérum a même eu un effet négatif sur les signaux BRET (Figure 5A) probablement en raison du faible pH (~5) de la fraction (données non présentées). Ces données indiquent que les caséines ne peuvent pas être impliquées et/ou que ce mode de fractionnement n'a pas permis de préserver l'activité biologique du Lait de Chamelle.

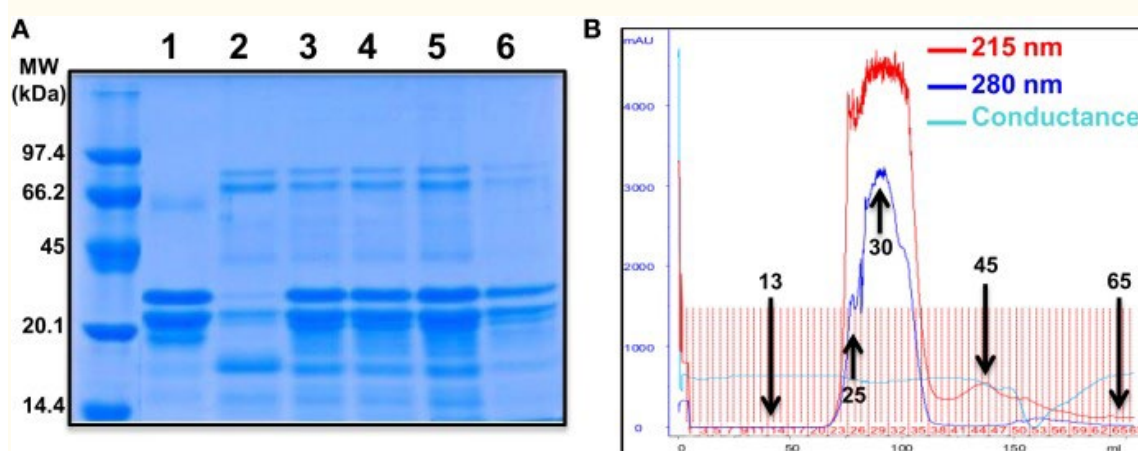
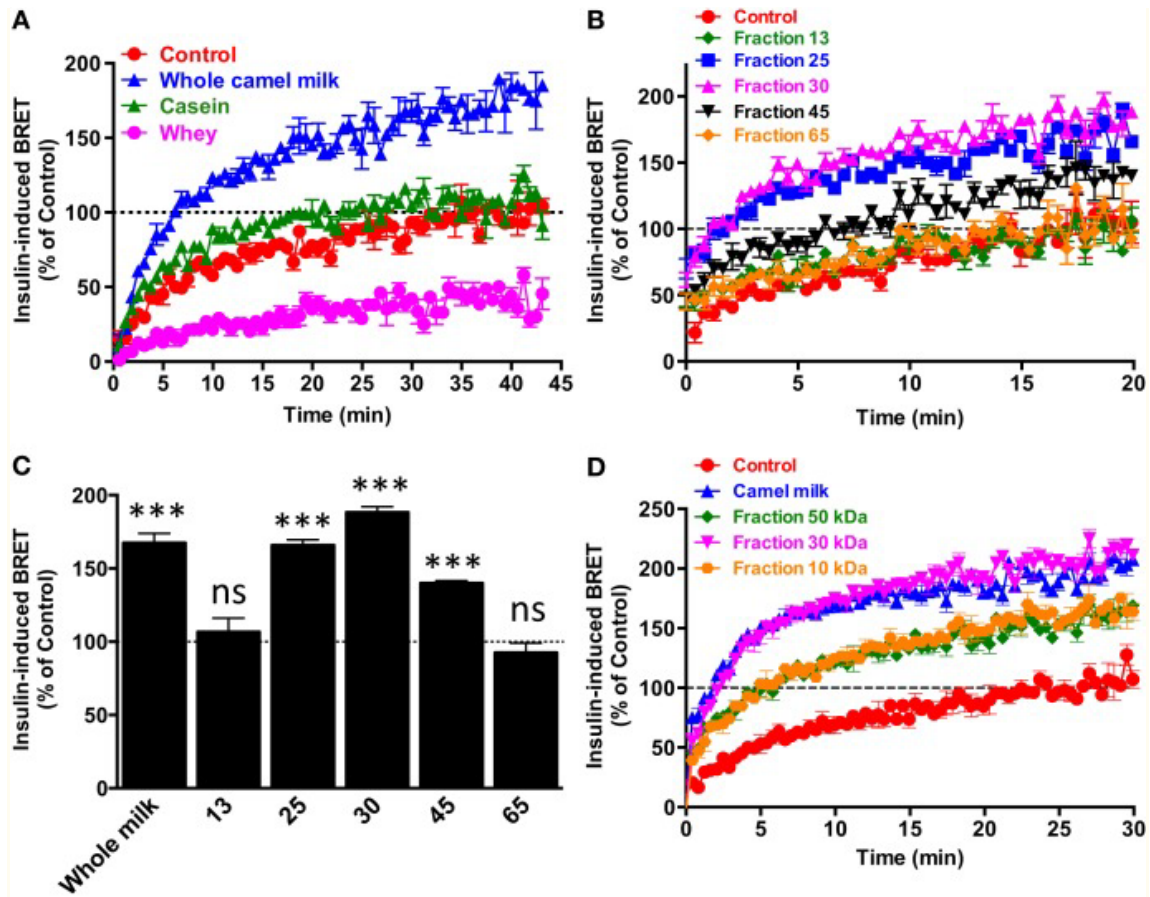


Figure 4

Fractionnements du Lait de Chamelle . (A) Le Lait de Chamelle dégraissé a été fractionné et les fractions résultantes ont été soumises à SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie comme indiqué dans la section « [Matériels et méthodes](#) ». Les différentes pistes représentent les caséines (1) et le lactosérum (2) ainsi que les fractions 25 (3), 30 (4 et 5), et 45 (6) obtenues par chromatographie par filtration sur gel (B). Pour la chromatographie par filtration sur gel, le lait frais de chamelle a d'abord été dégraissé et passé sur une colonne Sephadex G-25 et différentes protéines et fractions non protéiques ont été éluées en fonction de leur absorbance à 215 nm (graphique rouge) et 280 nm (graphique bleu) et de leur conductance pour fractions non protéiques (bleu clair).



[Figure 5](#)

Effet des fractions de Lait de Chamelle sur les signaux BRET. Les cellules HEK293 co-exprimant de manière transitoire hIR-Rluc8 et Grb2-Venus ont d'abord été prétraitées ou non (témoin, cercle rouge) 30 min avec soit du Lait de Chamelle entier (triangle bleu) soit ses différentes fractions obtenues soit par centrifugation (A), gel chromatographie de filtration (B,C) ou seuil de poids moléculaire à l'aide de filtres appropriés (D). Des mesures BRET en temps réel ont ensuite été effectuées en l'absence ou en présence de stimulation avec 100 nM d'insuline, comme indiqué. (C) La comparaison des valeurs maximales de BRET induit par l'insuline en moyenne à partir du plateau des courbes indiquées en (B). Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes (A, D) ou moyenne \pm SEM de trois expériences (B, C) toutes réalisées en triple.

Ensuite, nous avons séparé les fractions protéiques et non protéiques du Lait de Chamelle par chromatographie par filtration sur gel sur colonne Sephadex G-25 (Figure(Figure 4B).4B). La quantification des protéines dans les fractions que nous avons prélevées au hasard a révélé que des protéines significatives ont été collectées dans les fractions 25 (5 mg/ml), 30 (11,4 mg/ml) et, dans une moindre mesure, 45 (0,73 mg/ml). La présence de protéines dans ces fractions a également été confirmée par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de

Coomassie (Figure(Figure 4A).4UN). Ces fractions fraîchement obtenues ont ensuite été testées pour leurs effets sur les signaux BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus en prenant les fractions 13 et 65 comme non protéiques. Pour cela, les cellules ont d'abord été pré-incubées pendant 30 minutes avec les différentes fractions et les signaux BRET ont été mesurés lors d'une stimulation cellulaire avec 100 nM d'insuline. Comme le montrent les figuresFigures5B,C,5B, C, la potentialisation des signaux BRET induits par l'insuline a été observée avec les fractions 25, 30 et, dans une moindre mesure, 45, mais pas avec les fractions non protéiques, 13 et 65. Ces observations suggèrent fortement l'implication de peptides/protéines. du Lait de Chamelle dans la potentialisation de l'activation du hIR induite par l'insuline.

Pour consolider davantage cette conclusion, nous avons effectué la séparation des protéines du Lait de Chamelle en fonction de leur poids moléculaire à l'aide de filtres centrifuges Amicon Ultra-15 en coupant à 10, 30 et 50 kDa, puis avons testé les fractions filtrées pour leurs effets dans le test BRET comme décrit ci-dessus. Comme le montre la figureFigure 5D,5D, de la même manière que pour le Lait de Chamelle entier dégraissé, toutes les fractions séparées ont augmenté de manière significative les signaux BRET induits par l'insuline. La différence dans les effets peut être due aux protéines finales collectées dans chaque fraction après filtration (Figure(Figure5D).5D). Ainsi, ces données confortent davantage la nature peptidique/protéique de l'agent potentialisateur contenu dans le Lait de Chamelle. De plus, le fait que la potentialisation de la réponse insulinique ait été observée même avec la préparation résultant d'un seuil de 10 kDa suggère que l'agent potentialisateur a un poids moléculaire inférieur à 10 kDa. Il est à noter que tous les effets ont été observés uniquement avec le lait fraîchement collecté et les fractions séparées, car une telle analyse utilisant du Lait de Chamelle stocké pendant plus d'une semaine n'a montré aucun effet sur le lait entier ou ses fractions (données non présentées). Ensemble, ces données confirment la nature peptidique/protéique de l'agent à l'origine de l'activité biologique du Lait de Chamelle caractérisée par la potentialisation de l'activation du hIR favorisée par l'insuline.

L'effet du Lait de Chamelle sur les voies de signalisation hIR en aval

Pour étudier plus en détail les effets du Lait de Chamelle sur l'activation de hIR, nous avons tenté de relier nos données BRET aux voies de signalisation en aval médiées par l'insuline et son récepteur. Pour cela, nous avons étudié la phosphorylation de ERK1/2 et Akt dans HEK293 exprimant de manière transitoire hIR-Rluc8 et Grb2-Venus en utilisant deux approches, un test basé sur HTRF® au format de plaque à 384 puits, comme indiqué précédemment (32) et le classique SDS-PAGE. suivi d'un western blot. Tout d'abord, nous avons effectué une analyse temporelle à l'aide d'un test basé sur HTRF® pour déterminer le temps d'incubation conduisant à l'activation maximale de ERK1/2 et d'Akt en utilisant les mêmes échantillons de cellules. En conséquence, l'insuline a bien induit la phosphorylation de ERK1/2 avec une cinétique transitoire et un maximum après 5 minutes de stimulation (Figure(Figure 6A).6UN). De plus, la phosphorylation de l'Akt s'est produite après 5 minutes de stimulation par l'insuline, mais avec une réponse soutenue même après 30 minutes (Figure (Figure6B).6B). Par conséquent, nous avons effectué les expériences HTRF suivantes après 5 minutes de stimulation avec de l'insuline, qui ont montré une forte augmentation des signaux HTRF reflétant ERK1/2 (Figure(Figure 6C)6C) et Akt (figure (Figure6D)6D) phosphorylation médiée par hIR comme indiqué précédemment pour d'autres récepteurs en utilisant un test similaire basé sur HTRF® (32). Bien entendu, ces résultats concordent avec les données BRET montrant une forte augmentation du BRET induite par l'insuline entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP et Grb2 – Venus (Figures(Figures11et2)2) puisqu'il est bien connu que l'activation de ERK1/2 et Akt via hIR engage spécifiquement les voies Grb2/Ras et IRS1/PI3-kinase, respectivement (29, 30).

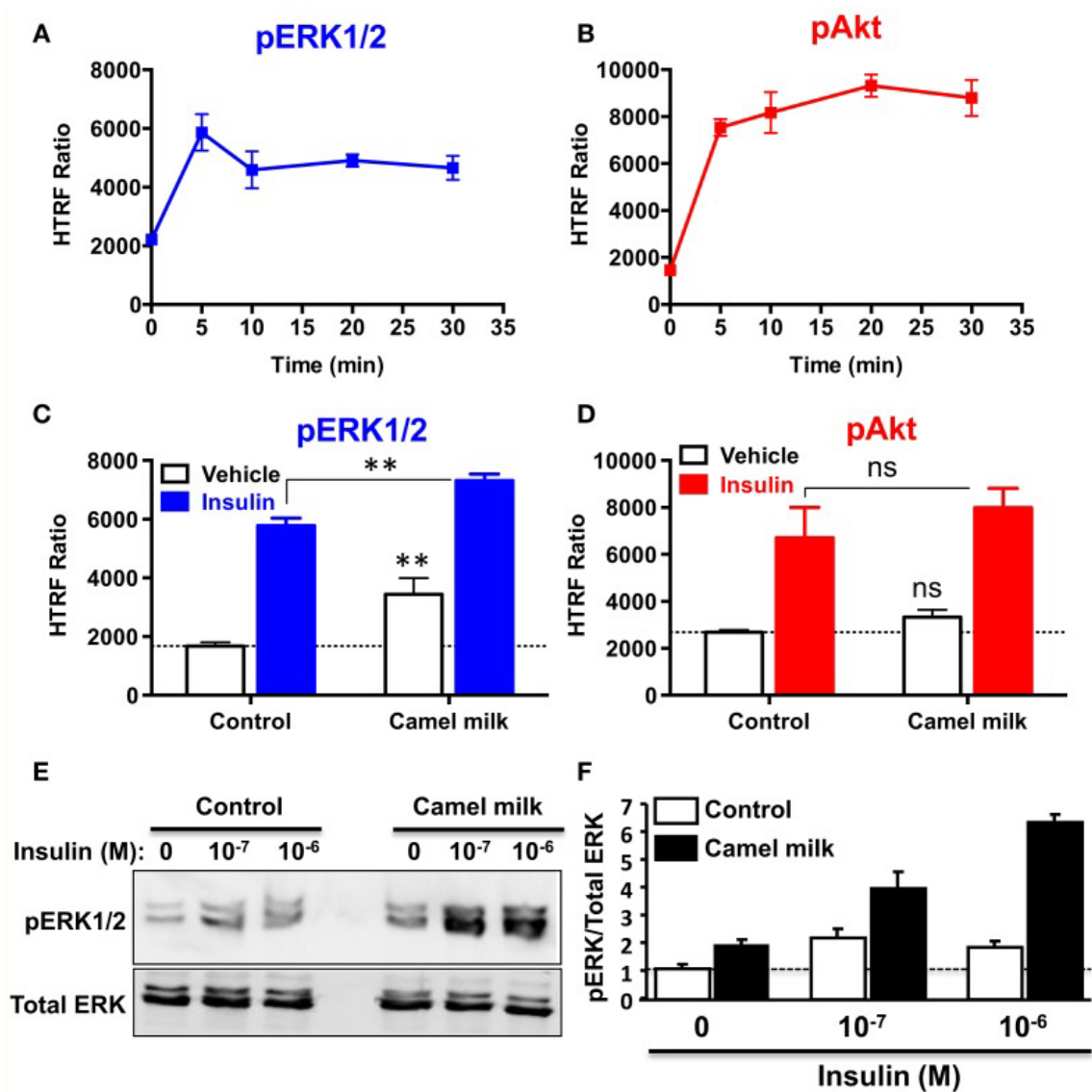


Figure 6

"Effet du Lait de Chamelle sur la phosphorylation de ERK1/2 et Akt". Des cellules HEK293 co-exprimant de manière transitoire hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus ont été utilisées pour la phosphorylation de ERK1 / 2 et d'Akt à l'aide du test basé sur HTRF[®] (A – D) et de la technique SDS-PAGE / Western blot (E, F). Tout d'abord, une analyse temporelle de phospho-ERK1/2 (A) et de phospho-Akt (B) lors d'une stimulation avec 100 nM d'insuline à différents moments a été réalisée et les signaux HTRF ont été mesurés comme décrit dans la section « [Matériels et méthodes](#) » ..» Ensuite, les cellules ont d'abord été prétraitées ou non 30 min avec du Lait de Chamelle et stimulées ou non 5 min avec 100 nM d'insuline avant que les signaux HTRF ne soient mesurés comme indiqué. Pour l'analyse par Western Blot, les cellules ont d'abord été prétraitées ou non 30 min avec du Lait de Chamelle et stimulées ou non 5 min avec 100 ou 1 µM d'insuline avant SDS-PAGE et Western blot en utilisant un anticorps polyclonal de lapin contre phospho-ERK1/2. (Thr202/Tyr204) (E). Les signaux de Western blot ont été quantifiés et exprimés en unités arbitraires après normalisation (F). Les données HTRF sont la moyenne ± SEM de trois (pour Akt) et quatre (pour ERK1/2) expériences indépendantes réalisées en triple. Les données du Western Blot sont représentatives de deux expériences.

Fait intéressant, nous avons observé que le traitement des cellules pendant 30 minutes avec du Lait de Chamelle augmentait significativement le niveau basal de phosphorylation de ERK1/2 et que cet effet s'ajoutait à la réponse médiée par l'insuline (Figure(Figure 6C).6C). En revanche, ni la phosphorylation basale ni la phosphorylation de l'Akt promue par l'insuline n'ont été affectées de manière significative par le traitement au Lait de Chamelle (Figure(Figure6D).6D). Pour approfondir cet aspect, nous avons également examiné la phosphorylation de ERK1/2 par SDS-PAGE suivie d'un Western Blot utilisant l'anticorps spécifique anti-phospho-ERK1/2 et d'une stimulation avec de l'insuline à deux concentrations saturantes (100 nM et 1 μ M). Comme le montre la figureFigure 6E,6E, le traitement au Lait de Chamelle a augmenté de manière significative le phospho-ERK1/2 basal et a très largement potentialisé la réponse insulino-dépendante avec une potentialisation plus forte à 1 μ M d'insuline, comme l'illustre la quantification d'expériences dupliquées (Figure(Figure 6F).6F). En revanche, la phosphorylation de Akt évaluée parallèlement à ERK1/2 n'a montré aucun effet significatif du Lait de Chamelle (données non présentées). Ensemble, ces observations sont cohérentes avec les données HTRF présentées dans les figuresChiffres6C,D6C, D en utilisant 100 nM d'insuline. Il est intéressant de noter qu'à 1 μ M d'insuline, les cellules prétraitées avec du Lait de Chamelle ont montré une réponse plus qu'additif (multipliée par six) par rapport à la somme des réponses des cellules non traitées (multipliées par deux) et des cellules traitées au lait sans stimulation par l'insuline (multipliée par deux) (Chiffre(Figure 6F).6F). Même si cette observation ne précise pas si le Lait de Chamelle a induit la phosphorylation de ERK1/2 via hIR, cela conforte l'existence d'un effet allostérique du Lait de Chamelle sur l'insuline et son récepteur en ce qui concerne la phosphorylation de ERK1/2, qui peut dépendre de la potentialisation allostérique. de l'association/activation hIR-Grb2 observée dans les figures Chiffres22et33.

[Aller à:](#)

Discussion

Comme indiqué ci - dessus, de nombreuses études antérieures *in vivo* utilisant des modèles de rats diabétiques de type 1 ont rapporté des propriétés hypoglycémiques du Lait de Chamelle ([11-19](#) , [35](#)). En raison du rôle central du récepteur de l'insuline et de ses voies de signalisation intracellulaires dans le contrôle de l'absorption du glucose et de ses taux sanguins, nous avons émis l'hypothèse que les effets hypoglycémiques du Lait de Chamelle pourraient impliquer une action de ses composants directement sur le récepteur de l'insuline chez les patients insulino-dépendants ou - manières indépendantes. Pour répondre à cette question, nous avons examiné l'effet du Lait de Chamelle et de ses fractions sur l'activation de hIR dans les cellules HEK293. Pour cela, nous avons utilisé la technologie BRET basée sur l'évaluation de la liaison physique des deux principales protéines de signalisation clés, IRS1 et Grb2, à hIR lors de la stimulation par l'insuline, comme indiqué précédemment pour hIR (23, 24) et EGFR ([pour Grb2](#)) ([25](#)). De plus, nous avons tenté de relier les données BRET à la signalisation en aval du hIR grâce à l'étude de l'impact du Lait de Chamelle sur les deux principales voies de signalisation du hIR, notamment la phosphorylation de ERK1/2 et de l'Akt dans les cellules HEK293.

La cinétique en temps réel et l'analyse BRET dose-réponse ont clairement montré un recrutement significatif et spécifique des protéines IRS1 et Grb2 dans le hIR activé avec la puissance attendue de l'insuline ([23](#) , [29](#) , [34](#)). De plus, les données BRET montrant une forte augmentation du BRET induite par l'insuline entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP et Grb2 – Venus (Figures [\(Figures11et2\)2](#)) ont également été étayés par les données démontrant la phosphorylation de ERK1/2 et Akt via l'activation de hIR dans les cellules HEK293 (Figure [\(Figure6\).6](#)). Ensemble, ces observations sont conformes au paradigme classique de la signalisation hIR puisqu'il est bien connu que l'activation de ERK1/2 engage la voie Grb2/Ras, tandis que l'activation d'Akt résulte de l'engagement de la voie IRS1/PI3-kinase ([29](#) , [30](#)). Ainsi, nos données valident le test BRET en démontrant que le BRET promu par l'insuline augmente entre hIR et IRS1 et Grb2 reflète probablement l'activation de hIR.

Ensuite, nous avons examiné l'effet du Lait de Chamelle et de ses fractions sur les signaux BRET entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP ou Grb2 – Venus. En effet, lors d'un traitement direct de cellules avec du Lait de Chamelle frais uniquement, nos données ont montré que le Lait de Chamelle ne favorisait aucune augmentation significative du BRET entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP ou Grb2 – Vénus, ce qui suggère que le Lait de Chamelle lui-même n'activait pas hIR dans notre modèle. Il convient de noter que BRET est un test basé sur la proximité où la distance et l'orientation du donneur (Rluc8) et de l'accepteur (YFP ou Vénus) sont essentielles pour rendre possible et suffisamment efficace le transfert d'énergie entre Rluc8 et YFP/Vénus au sein de complexes protéiques. En conséquence, l'absence d'augmentation de BRET entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP et Grb2 – Venus peut avoir deux explications différentes. La première explication implique l'absence d'activation de hIR par le Lait de Chamelle et donc aucun recrutement d'IRS1 et Grb2 n'est favorisé. Si un tel scénario se produisait, alors nos données BRET suggèrent l'absence de suffisamment d'insuline dans le Lait de Chamelle et/ou une activité « analogue à l'insuline ». La deuxième possibilité est que le Lait de Chamelle pourrait dans une certaine mesure activer hIR, mais la conformation de hIR – Rluc8 activé n'a pas été traduite en changements BRET avec IRS1 – YFP et Grb2 – Vénus. Cela signifie que les deux protéines pourraient se lier à hIR mais que leur quantité relative est encore faible et/ou que leur distance et/ou orientation sont défavorables au sein du complexe activé pour déclencher une augmentation suffisante du BRET. Il est intéressant de noter que dans le test de phosphorylation de ERK1/2, le Lait de Chamelle a induit de manière significative la phosphorylation de ERK1/2 mais pas de l'Akt, même en l'absence de stimulation par l'insuline (Figures 1). (Figures 6C, E),6C, E), suggérant une activation sélective de la voie ERK1/2 mais pas de la voie Akt dans les cellules HEK293. Bien entendu, un tel effet ne pourrait pas être nécessairement spécifique à l'activation du hIR induite par le Lait de Chamelle, puisqu'il n'existe aucune preuve d'une liaison directe du Lait de Chamelle au hIR. Ainsi, nos données ne peuvent pas exclure la possibilité que le Lait de Chamelle active d'autres récepteurs membranaires dans les cellules HEK293 pour induire la phosphorylation de ERK1/2. Conjugué aux

données du BRET, ce point n'est toujours pas clair et des investigations plus approfondies sont nécessaires.

L'autre découverte importante de notre étude concerne sans aucun doute les effets du Lait de Chamelle et le profilage pharmacologique de ses fractions sur l'activation du hIR induite par l'insuline. Notre étude constitue la première démonstration d'un effet direct du Lait de Chamelle sur l'activation des hIR au niveau cellulaire. En effet, nous avons observé que le Lait de Chamelle et certaines de ses fractions potentialisaient curieusement l'efficacité mais pas la puissance de l'insuline pour favoriser l'augmentation du BRET. Fait intéressant, cela était spécifique au BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus, mais pas à IRS1 – YFP. En effet, la cinétique (Figure(Figure 2D)2D) et dose-réponse (Figure(Figure 3C)3C) L'analyse C) a clairement démontré que le Lait de Chamelle potentialisait sélectivement le signal BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Vénus, même aux niveaux maximaux et aux concentrations saturantes d'insuline (100 nM – 10 µM). Il convient de noter que le Lait de Chamelle n'a pas d'effet sur la puissance de l'insuline, ce qui suggère qu'il n'a aucun effet sur les propriétés de liaison de l'insuline. Ce scénario est caractéristique d'une interaction allostérique entre un composant du Lait de Chamelle et l'insuline au niveau de hIR, qui impacte spécifiquement l'association et/ou la conformation hIR-Grb2 mais pas hIR-IRS1 ainsi que l'activation du complexe. En effet, dans nos conditions, le niveau d'activation du hIR par l'insuline tend vers la saturation comme le montrent les courbes de dose. Par la suite, toute augmentation supplémentaire des signaux BRET ne peut pas être expliquée par un recrutement supplémentaire de Grb2 vers le récepteur activé. L'autre argument en faveur des effets allostériques du Lait de Chamelle est l'absence de désensibilisation du hIR après 30 minutes de traitement avec du Lait de Chamelle où l'insuline a complètement activé le hIR et même une potentialisation a été observée. Une fixation orthostérique du Lait de Chamelle aurait été caractérisée soit par une absence d'activation ultérieure par l'insuline en raison de la saturation du système et/ou d'une désensibilisation de l'hIR, soit par une inhibition (en cas d'action antagoniste). Une façon de concilier tout cela est d'émettre l'hypothèse que le Lait de Chamelle induit et stabilise de manière

allostérique une conformation spécifique du hIR, qui peut être différente de la hIR inactive (condition basale) et active (liée à l'insuline) (Figure Une fixation orthostérique du Lait de Chamelle aurait été caractérisée soit par une absence d'activation ultérieure par l'insuline en raison de la saturation du système et/ou d'une désensibilisation de l'hIR, soit par une inhibition (en cas d'action antagoniste). Une façon de concilier tout cela est d'émettre l'hypothèse que le Lait de Chamelle induit et stabilise de manière allostérique une conformation spécifique du hIR, qui peut être différente de la hIR inactive (condition basale) et active (liée à l'insuline) (Figure Une fixation orthostérique du Lait de Chamelle aurait été caractérisée soit par une absence d'activation ultérieure par l'insuline en raison de la saturation du système et/ou d'une désensibilisation de l'hIR, soit par une inhibition (en cas d'action antagoniste). Une façon de concilier tout cela est d'émettre l'hypothèse que le Lait de Chamelle induit et stabilise de manière allostérique une conformation spécifique du hIR, qui peut être différente de la hIR inactive (condition basale) et active (liée à l'insuline) (Figure(7).7). Une telle conformation semble défavorable au processus BRET entre hIR – Rluc8 et IRS1 – YFP et Grb2 – Venus en l'absence de stimulation par l'insuline. Par conséquent, la liaison orthostérique de l'insuline active hIR en induisant d'autres changements de conformation au sein du récepteur, conduisant à une distance/orientation favorable de hIR – Rluc8 et de Grb2 – Vénus (mais pas d'IRS1 – YFP) et provoquant ainsi une augmentation du BRET. En conséquence, si le Lait de Chamelle induisait réellement l'activation de ERK1/2 via hIR, cela conforterait l'existence d'une conformation de hIR spécifique au Lait de Chamelle, capable d'engager Grb2 sur le récepteur et toujours sensible à la stimulation de l'insuline même à des concentrations saturantes via un mécanisme d'activation allostérique. Bien sûr, d'après nos données, la question de savoir si le Lait de Chamelle a induit la phosphorylation de ERK1/2 par son action allostérique sur le hIR n'est toujours pas résolue. Cependant, dans les cellules traitées au Lait de Chamelle, la phosphorylation de ERK1/2 médiée par l'insuline était significativement potentialisée dans les deux cas.® et tests Western blot. Notez que les données HTRF n'ont montré que les effets additifs du Lait de Chamelle sur la phosphorylation ERK1/2 insulino-dépendante, indiquant l'absence d'association directe entre les réponses dépendantes et

indépendantes du hIR du Lait de Chamelle. En revanche, le Western Blot a clairement démontré une forte potentialisation de la phosphorylation de ERK1/2 qui était plus qu'additif dans les cellules co-traitées avec du Lait de Chamelle et de l'insuline (Figures (Figures 6E, F).6E,F). Cette observation conforte l'existence d'un effet allostérique du Lait de Chamelle sur la phosphorylation de ERK1/2, qui peut dépendre de la potentialisation allostérique de la conformation des complexes hIR-Grb2, comme le montrent les figures. Chiffres 22 et 3.3. Une telle modulation allostérique sur le récepteur de l'insuline a été récemment rapportée lorsque des anticorps sélectifs étaient utilisés en combinaison avec une stimulation par l'insuline, plaidant en faveur de l'existence de sites de liaison allostériques fonctionnels sur le hIR (36, 37). En ce qui concerne l'interaction de hIR avec la phosphorylation d'IRS1 et d'Akt, le Lait de Chamelle n'a affecté ni le signal BRET entre hIR – Rluc et IRS1 – YFP, ni l'activation d'Akt, à la fois la réponse basale et médiée par l'insuline. Ces observations suggèrent une modulation allostérique sélective de hIR par le Lait de Chamelle conduisant à des modifications de l'interaction/conformation hIR-Grb2 et de ERK1/2 mais pas des voies IRS1/Akt. Ceci est cohérent avec le concept de sélectivité fonctionnelle, également appelé signalisation biaisée, qui consiste en une hormone ou un agent donné activant un sous-ensemble spécifique de signalisation du récepteur sans en affecter les autres. Des propriétés similaires ont été rapportées sur le facteur de croissance insulin-like-1 par rapport à ERK1/2 par rapport aux voies Akt (38). De plus, le concept de signalisation biaisée est désormais bien documenté pour d'autres récepteurs membranaires, tels que les GPCR (39, 40).

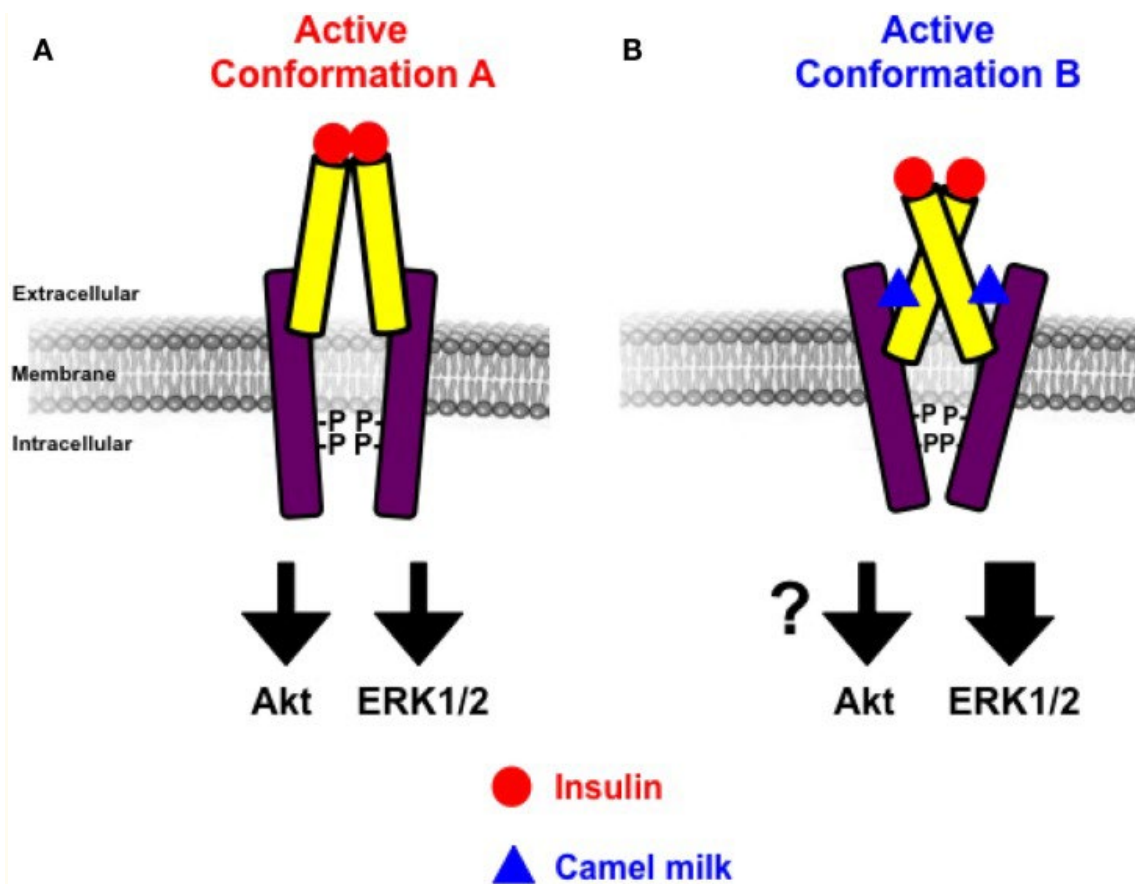


Figure 7

Modèle schématique de l'action allostérique du Lait de Chamelle sur le hIR. L'action allostérique positive du Lait de Chamelle implique l'induction/stabilisation d'une conformation spécifique du hIR avec un impact sur sa signalisation en aval. En effet, en présence de Lait de Chamelle, la conformation de hIR (*conformation B*) (**B**) est plus efficace en ce qui concerne l'activation de ERK1/2 favorisée par l'insuline, mais probablement pas Akt, par rapport à la conformation liée à l'insuline en l'absence de Lait de Chamelle. composant laitier (*conformation A*) (**A**).

En outre, les données sur le BRET entre hIR – Rluc8 et Grb2 – Venus utilisant du Lait de Chamelle entier étaient également étayées par celles avec du lait fractionné où le lait dégraissé était soumis à différents protocoles de séparation. Ensemble, les données de fractionnement ont convergé pour suggérer que l'agent potentialisateur contenu dans le Lait de Chamelle a une nature peptidique/protéique avec un effet positif également observé dans la fraction <10 kDa. Nos données peuvent être cohérentes avec les études précédentes montrant que les séquences d'acides aminés de certaines protéines du Lait de Chamelle sont riches en demi-cystine, de la même manière que les peptides appartenant à la famille de l'insuline ([20](#)). Bien entendu, cet aspect crucial nécessite des analyses expérimentales

et techniques plus approfondies et des améliorations dans le but d'obtenir un fractionnement optimal et d'identifier le véritable agent potentialisateur. Nous avons également observé que la stabilité et les conditions de conservation du Lait de Chamelle sont deux éléments importants déterminant la fonctionnalité du Lait de Chamelle, comme indiqué précédemment pour l'insuline du Lait de Chamelle ([4](#)). L'activité du Lait de Chamelle ou de ses fractions résultantes était significativement réduite, voire totalement supprimée, lorsque le Lait de Chamelle était utilisé après son long stockage, démontrant ainsi l'activité biologique des composants du Lait de Chamelle (données non présentées). Ensemble, nos données sont d'une grande importance dans le contexte des profils chimiques et biochimiques du Lait de Chamelle par rapport à d'autres laits apparentés, tels que le lait de bovin ou de chèvre ([5](#), [41-43](#)). _ En effet, la question concernant la teneur en insuline du Lait de Chamelle est encore floue puisque certaines études ont rapporté que le Lait de Chamelle contient des taux élevés d'insuline ([2](#), [44](#)), tandis que d'autres ont montré des taux d'insuline faibles mais significativement plus élevés dans le colostrum de chamelle ([45](#)). De plus, il a été rapporté que les concentrations d'insuline dans le Lait de Chamelle dépendent de manière significative des stades de lactation ([3](#)) ainsi que de la température et des conditions de stockage ([4](#), [46](#)). Ces différentes observations doivent être prises en compte dans l'interprétation des études rapportant les effets hypoglycémiques du Lait de Chamelle *in vivo* sur des modèles animaux et humains de diabète de type 1 ([11-19](#), [35](#)). _ En fait, on ne sait toujours pas comment expliquer les effets bénéfiques du Lait de Chamelle et sa teneur plausible en insuline puisque l'hormone devrait être dégradée dans l'estomac et sinon, elle doit rester fonctionnellement intacte pendant le processus d'absorption dans l'intestin ([22](#), [45](#)).

D'un point de vue physiopathologique, nos découvertes sur les cellules HEK293 transfectées utilisant la technologie BRET aident à mieux comprendre les études antérieures sur les propriétés hypoglycémiques du Lait de Chamelle dans des modèles animaux et humains ([11-19](#), [35](#)). En effet, nos données apportent pour la première fois la preuve que le Lait de

Chamelle agit de manière allostérique au niveau du récepteur de l'insuline, ce qui semble avoir un impact différentiel sur sa signalisation en aval (Figure 7). Néanmoins, le lien entre les effets du Lait de Chamelle que nous avons rapportés ici et ses propriétés hypoglycémiques est encore faible puisque nos données ont signalé des effets potentiels sur la protéine kinase activée par un mitogène (MAPkinase) impliquée dans les processus de prolifération et de différenciation des hIR (29, 30). En revanche, aucun effet significatif n'a été observé sur l'association hIR – IRS1 et la phosphorylation de l'Akt constituant la voie métabolique impliquant le transport du glucose et la glycolyse (29, 30). Par conséquent, des recherches plus approfondies sont nécessaires pour confirmer nos données dans d'autres modèles et pour mieux disséquer ces effets des composants du Lait de Chamelle au niveau moléculaire afin d'établir un lien avec les effets putatifs sur l'absorption du glucose dans les tissus sensibles à l'insuline. Le grand défi serait également d'identifier et de caractériser l'agent actif contenu dans le Lait de Chamelle et d'étudier ses effets sur la liaison de l'insuline et l'activation du hIR. L'implication des adiponectines et d'autres hormones contenues dans le lait et censées influencer l'activité et la signalisation hIR pourrait être des pistes intéressantes à étudier (47 – 49). Enfin, il serait intéressant d'étendre l'étude à d'autres récepteurs impliqués dans l'homéostasie du glucose.

[Aller à:](#)

Contributions d'auteur

AA a réalisé la plupart des expériences et analysé les données. MI a réalisé le fractionnement du Lait de Chamelle. KA-H a contribué aux expériences BRET et HTRF. AA-S a conçu et supervisé certains aspects du projet. CR et JD ont réalisé le Western Blot et ont acquis une expertise en matière de signalisation de l'insuline. MA a conçu et supervisé le projet, réalisé quelques expériences BRET, analysé les données et rédigé le manuscrit.

[Aller à:](#)

Déclaration de conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent que la recherche a été menée en l'absence de toute relation commerciale ou financière pouvant être interprétée comme un potentiel conflit d'intérêts.

[Aller à:](#)

Remerciements

Un merci spécial à Ibrahim Al-Majed (KSU) et à tous les agriculteurs impliqués dans la collecte du Lait de Chamelle.

[Aller à:](#)

Financement

Les auteurs remercient le doyen de la recherche scientifique de l'Université King Saud pour avoir financé ce travail par le biais du groupe de recherche n° : RGP-VPP-286 et de la ville King Abdulaziz pour la science et la technologie (KACST) pour le fonds d'été accordé au Dr Khaled. Al-Hosaini va apprendre les techniques BRET et HTRF à l'Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier, France).

[Aller à:](#)

Les références

1. Gaughan JB. Which physiological adaptation allows camels to tolerate high heat load – and what more can we learn? *J Camelid Sci* (2011) 4:85–8. [[Google Scholar](#)]
2. Duehlmeier R, Sammet K, Widdel A, von Engelhardt W, Wernery U, Kinne J, et al. Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* (2007) 146:274–82. 10.1016/j.cbpa.2006.10.029 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Wernery U, Johnson B, Ishmail WT. Insulin content in raw dromedary milk and serum measured over one lactation period. *J Camel Pract Res* (2006) 13:89–90. [[Google Scholar](#)]
4. Wernery U, Nagy P, Bhai I, Schiele W, Johnson B. The effect of heat treatment, pasteurization and different storage temperatures on insulin concentrations in camel milk. *Milchwissenschaft* (2006) 61:25–8. [

5. Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *J Food Compos Anal* (2009) 22:95–101. 10.1016/j.jfca.2008.09.008 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Khan BB, Iqbal A. Production and composition of camel milk. *Pak J Agric Sci* (2001) 38:3–4. [[Google Scholar](#)]
7. Shamsia SM. Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *Int J Genet Mol Biol* (2009) 1:52–8. [[Google Scholar](#)]
8. Abu-Lehiya IH. Composition of camel milk. *Milchwissenschaft* (1987) 42:368–71. [[Google Scholar](#)]
9. Yagil R. *Camels and Camel Milk*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; (1982). [[Google Scholar](#)]
10. el Agamy EI, Ruppanner R, Ismail A, Champagne CP, Assaf R. Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J Dairy Res* (1992) 59:169–75. 10.1017/S0022029900030417 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Khan AA, Alzohairy MA, Mohieldein AH. Antidiabetic effects of camel milk in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Biochem Mol Biol* (2013) 3:151–6. 10.3923/ajbmb.2013.151.158 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Agrawal RP, Beniwal R, Kochar DK, Tuteja FC, Ghorui SK, Sahani MS, et al. Camel milk as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycemic control and reduction in doses of insulin in patients with type-1 diabetes: a 1 year randomized controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* (2005) 68:176–7. 10.1016/j.diabres.2004.12.007 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Agrawal RP, Budania S, Sharma P, Gupta R, Kochar DK, Panwar RB, et al. Zero prevalence of diabetes in camel milk consuming Raica community of north-west Rajasthan, India. *Diabetes Res Clin Pract* (2007) 76:290–6. 10.1016/j.diabres.2006.09.036 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Agrawal RP, Dogra R, Mohta N, Tiwari R, Singhal S, Sultania S. Beneficial effect of camel milk in diabetic nephropathy. *Acta Biomed* (2009) 80:131–4. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Sboui A, Khorchani T, Djegham M, Agrebi A, Elhatmi H, Belhadj O. Anti-diabetic effect of camel milk in alloxan-induced diabetic dogs: a dose-response experiment. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* (2010) 94:540–6. 10.1111/j.1439-0396.2009.00941.x [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Hamad E, Abdel-Rahim E, Romeih E. Beneficial effect of camel milk on liver and kidneys function in diabetic Sprague-Dawley rats. *Int J Dairy Sci* (2011) 6:190–7. 10.3923/ijds.2011.190.197 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Isa S, Ibrahim K, Abubakar I. Effect of camel milk's supplementation on serum glucose levels, lipid profile and body weight of alloxan-induced diabetic rats. *Niger J Basic Appl Sci* (2013) 21:187–92. 10.4314/njbas.v21i3.3 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Breitling L. Insulin and anti-diabetes activity of camel milk. *J Camel Pract Res* (2002) 9:43–5. [[Google Scholar](#)]
19. Agrawal RP, Jain S, Shah S, Chopra A, Agarwal V. Effect of camel milk on glycemic control and insulin requirement in patients with type 1 diabetes: 2-years randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* (2011) 65:1048–52. 10.1038/ejcn.2011.98 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Beg OU, von Bahr-Lindstrom H, Zaidi ZH, Jornvall H. A camel milk whey protein rich in half-cystine. Primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns, and relationships with neurophysin and other active polypeptides. *Eur J Biochem* (1986) 159:195–201. 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09853.x [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Singh R. *Annual Report of National Research Center on Camel*. 1st ed Bikaner: NRCC; (2001). 50 p. [[Google Scholar](#)]

22. Malik A, Al-Senaïdy A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. A study of the anti-diabetic agents of camel milk. *Int J Mol Med* (2012) 30:585. 10.3892/ijmm.2012.1051 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Boute N, Pernet K, Issad T. Monitoring the activation state of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* (2001) 60:640–5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Versteyhe S, Blanquart C, Hampe C, Mahmood S, Christeff N, De Meyts P, et al. Insulin receptor substrates-5 and -6 are poor substrates for the insulin receptor. *Mol Med Rep* (2010) 3:189–93. 10.3892/mmr_00000239 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Ayoub MA, See HB, Seeber RM, Armstrong SP, Pflieger KD. Profiling epidermal growth factor receptor and heregulin receptor 3 heteromerization using receptor tyrosine kinase heteromer investigation technology. *PLoS One* (2013) 8:e64672. 10.1371/journal.pone.0064672 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Pin JP, Ayoub MA, Maurel D, Perroy J, Trinquet E. Energy transfer technologies to monitor the dynamics and signaling properties of G – protein – coupled receptors in living cells. In: Pebay-Peyroula E, editor. *Biophysical Analysis of Membrane Proteins – Investigating Structure and Function*. Weinheim: Wiley-VCH; (2008). p. 311–34. [[Google Scholar](#)]
27. Ayoub MA, Trinquet E, Pflieger KD, Pin JP. Differential association modes of the thrombin receptor PAR1 with Galphai1, Galpha12, and beta-arrestin 1. *FASEB J* (2010) 24:3522–35. 10.1096/fj.10-154997 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Ayoub MA, Al-Senaïdy A, Pin JP. Receptor-G protein interaction studied by bioluminescence resonance energy transfer: lessons from protease-activated receptor 1. *Front Endocrinol* (2012) 3:82. 10.3389/fendo.2012.00082 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Combettes-Souverain M, Issad T. Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* (1998) 24:477–89. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* (2002) 1:769–83. 10.1038/nrd917 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Reverchon M, Rame C, Cognie J, Briant E, Elis S, Guillaume D, et al. Resistin in dairy cows: plasma concentrations during early lactation, expression and potential role in adipose tissue. *PLoS One* (2014) 9:e93198. 10.1371/journal.pone.0093198 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Ayoub MA, Trebaux J, Vallaghe J, Charrier-Savourin F, Al-Hosaini K, Gonzalez Moya A, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to monitor extracellular signal-regulated kinase signaling in a high-throughput format. *Front Endocrinol* (2014) 5:94. 10.3389/fendo.2014.00094 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M, et al. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* (2002) 277:21522–8. 10.1074/jbc.M200729200 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Galuska D, Ryder J, Kawano Y, Charron MJ, Zierath JR. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant skeletal muscle. Special reference to GLUT4 transgenic and GLUT4 knockout mice. *Adv Exp Med Biol* (1998) 441:73–85. 10.1007/978-1-4899-1928-1_7 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Agrawal RP, Saran S, Sharma P, Gupta RP, Kochar DK, Sahani MS. Effect of camel milk on residual beta-cell function in recent onset type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* (2007) 77:494–5. 10.1016/j.diabres.2007.01.012 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Issafras H, Bedinger DH, Corbin JA, Goldfine ID, Bhaskar V, White ML, et al. Selective allosteric antibodies to the insulin receptor for the treatment of hyperglycemic and hypoglycemic

- disorders. *J Diabetes Sci Technol* (2014) 8:865–73. 10.1177/1932296814529886 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Bhaskar V, Goldfine ID, Bedinger DH, Lau A, Kuan HF, Gross LM, et al. A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control. *Diabetes* (2012) 61:1263–71. 10.2337/db11-1578 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
38. Rose A, Froment P, Perrot V, Quon MJ, LeRoith D, Dupont J. The luteinizing hormone-releasing hormone inhibits the anti-apoptotic activity of insulin-like growth factor-1 in pituitary alphaT3 cells by protein kinase Calpha-mediated negative regulation of Akt. *J Biol Chem* (2004) 279:52500–16. 10.1074/jbc.M404571200 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* (2007) 320:1–13. 10.1124/jpet.106.104463 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* (2010) 9:373–86. 10.1038/nrd3024 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Brans G, Schroen C, Van der Sman R, Boom R. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J Memb Sci* (2004) 243:263–72. 10.1016/j.memsci.2004.06.029 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Iqbal A, Gill R, Younas M. Milk composition of Pakistani camel (*Camelus dromedaries*) kept under station/farmer's conditions. *Emir J Food Agric* (2011) 13:7–10. 10.9755/ejfa.v12i1.5197 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Yagil R. Camel milk. A review. *Int J Anim Sci* (1987) 2:81. [[Google Scholar](#)]
44. Yagil R, Zagorski O, Van Creveld C, Saran A. Science and camel's milk production. In: Saint Marin G, editor. *Chameaux et dromadaires, animeaux laitiers*. Paris: Expansion Scientifique Francais; (1994). p. 75–89. [[Google Scholar](#)]
45. Zagorski O, Maman A, Yafee A, Meisles A, Van Creveld C, Yagil R. Insulin in milk – a comparative study. *Int J Anim Sci* (1998) 13:241–4. [[Google Scholar](#)]
46. Omer RH, Eltinay AH. Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage. *Pak J Nutr* (2009) 8:607–10. 10.3923/pjn.2009.607.610 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
47. Ley SH, Hanley AJ, Sermer M, Zinman B, O'Connor DL. Associations of prenatal metabolic abnormalities with insulin and adiponectin concentrations in human milk. *Am J Clin Nutr* (2012) 95:867–74. 10.3945/ajcn.111.028431 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Yamaguchi M, Takai S. Chronic administration of bovine milk-derived alpha-lactalbumin improves glucose tolerance via enhancement of adiponectin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. *Biol Pharm Bull* (2014) 37:404–8. 10.1248/bpb.b13-00762 [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* (2006) 116:1784–92. 10.1172/JCI29126 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]