

Biochimie
métabolisme
signal

Les protéases multifonctionnelles de la famille des insulinasés

A l'inverse des récepteurs qui ne reconnaissent spécifiquement qu'un seul peptide hormonal ou qu'un seul facteur de croissance, les protéases sont capables de dégrader *in vitro* un nombre multiple de substrats et, la plupart du temps, plusieurs protéases ont la capacité de dégrader *in vitro* un même substrat. Cette caractéristique découle du fait que la spécificité d'une protéase n'intervient généralement peu ou pas au niveau de la conformation du substrat, mais plutôt au niveau de la liaison peptidique à cliver. De ce fait, bien qu'il soit très facile d'identifier des substrats au moyen d'études purement *in vitro*, il est très difficile d'attribuer à une protéase donnée son (ou ses) substrat(s) physiologiquement dégradé(s) *in vivo*.

De nombreuses enzymes protéolytiques ont été décrites comme potentiellement capables de dégrader *in vitro* l'insuline. Parmi elles, une enzyme appelée insulinasé a fait l'objet d'un nombre considérable d'études portant aussi bien sur ses caractéristiques structurales que sur sa spécificité protéolytique et sa distribution subcellulaire. Cette enzyme a été la première représentante d'une nouvelle famille de métalloprotéases à zinc qui s'est récemment enrichie d'un grand nombre de nouveaux membres.

La famille des insulinasés

Quatre classes de protéases ont été répertoriées sur la base des acides aminés qui composent leur site actif. Ce sont les protéases à sérine (EC 3.4.21), à cystéine (EC 3.4.22), à acide aspartique (EC 3.4.23) et les métalloprotéases (EC 3.4.24) [1]. Les

membres de cette dernière classe, extrêmement diverse puisqu'elle comporte au moins 25 familles, requièrent la présence absolue de cations bivalents (généralement le zinc) pour exercer leur activité protéolytique. L'analyse de la séquence primaire des métalloprotéases et l'étude aux rayons X de ces enzymes cristallisées ont permis d'identifier pour la première fois, avec la thermolysine, la séquence - His-Glu-Xaa-Xaa-His - (HEXXH) dans laquelle les deux histidines coordonnent la liaison de l'atome de zinc et le glutamate agit comme une base catalytique au cours de la coupure peptidique. Cette séquence, représentant en partie le site actif, s'est avérée par la suite être présente dans la plupart des séquences primaires des métalloprotéases à l'exception de deux familles: les carboxypeptidases dont le site actif correspond à la séquence HXXE(X)H et les insulinasés qui possèdent la séquence HXXEH [2]. Sur la base d'une classification qui repose sur la présence de ce pentapeptide dans les séquences protéiques, la famille des insulinasés est constituée actuellement de 16 membres: les insulinasés humains [3], de rat [4] et de drosophile [5]; la N-arginine convertase dibasique (NRD) de rat [6]; la protéase III [7] et la protéine YddC d'*Escherichia coli* [8]; la sous-unité β des protéases mitochondriales de maturation (PM-2) de rat, de levure *Saccharomyces cerevisiae*, de champignon *Neurospora crassa* et de cellules végétales [8]; des produits des gènes *orfP* de *Bacillus subtilis* et *PqqF* de *Klebsiella pneumoniae* [8]; et une protéase de maturation (*chloroplast processing enzyme*, CPE) du chloroplaste de pois *Pisum sativum* [9]; et, enfin, une pro-

téase hypothétique d'*Eimeria bovis* [8] (Tableau I).

Caractéristiques structurales des insulinasés

Outre la présence commune du site actif pentapeptidique, les membres de la famille des insulinasés partagent de fortes analogies de séquence. Ainsi, les séquences des insulinasés de rat et de drosophile, et la protéase III bactérienne ont révélé respectivement 95 %, 47 % et 26 % d'identité avec la séquence de l'insulinasé humaine, indiquant une très forte conservation de la structure primaire de cette enzyme au cours de l'évolution [3, 5]. De même, la NRD de rat [6] ainsi que la CPE de pois [9] présentent respectivement 48 % et 40 % de similitudes structurales avec l'insulinasé humaine [3]. Ces similitudes de séquence s'accompagnent d'une conservation remarquable des propriétés structurales et catalytiques de ces enzymes [10]: une masse moléculaire d'environ 100 kDa; un pH d'activité optimale neutre; une spécificité de substrat préférentielle pour les peptides de masse moléculaire inférieure à 6 kDa; une affinité remarquable pour l'insuline; et une faible spécificité au niveau des liaisons peptidiques clivées. La protéase III bactérienne contient des quantités stœchiométriques de zinc tandis que le zinc et le manganèse sont les métaux physiologiquement associés à l'insulinasé humaine. Les expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ces cations bivalents se fixaient, entre autre, à la séquence HXXEH, montrant ainsi que cette séquence correspondait bien au site actif des insulinasés. Ainsi, la muta-

Tableau I			
ALIGNEMENTS DES SITES ACTIFS DE LIAISON DU ZINC DES 16 MEMBRES DE LA FAMILLE DES INSULINASES			
(x)74			
Insulinase humaine	GLS ¹⁰⁸ HFCEH ¹¹² MLF		E ¹⁸⁹
Insulinase de rat	GLS ¹⁰⁸ HFCEH ¹¹² MLF		E ¹⁸⁹
Insulinase de drosophile	GLA ⁸¹ HFCEH ⁸⁵ MLF		E ¹⁶²
NRD de rat	GLA ²⁴⁴ HFLEH ²⁴⁸ MVF		E ³²⁵
Protéase III de <i>E. coli</i>	GLA ⁸⁸ HYLEH ⁹² MSL		E ¹⁶⁹
Protéine YddC de <i>E. coli</i>	GVA ⁷⁶ HFVEH ⁸⁰ MMF		E ¹⁵⁷
PM-2 de rat	GTA ⁹⁹ HFLEH ¹⁰³ MAF		E ¹⁸⁰
PM-2 de <i>S. cerevisiae</i>	GTA ⁷¹ HFLEH ⁷⁵ LAF		E ¹⁵²
PM-2 de <i>N. crassa</i>	GTA ⁸⁴ HFLEH ⁸⁸ LAF		E ¹⁶⁵
PM2a de <i>S. tuberosum</i>	GVA ¹⁴³ HFLEH ¹⁴⁷ MIF		E ²²⁴
PM-2b de <i>S. tuberosum</i>	GTA ¹⁴⁰ HFLEH ¹⁴⁴ MIF		E ²²¹
PM de <i>E. gracilis</i>	GVA ⁷⁰ HFLEH ⁷⁴ MNF		E ¹⁵¹
Produit du gène <i>OrfP</i> de <i>B. subtilis</i>	GIS ⁷⁷ HFLEH ⁷⁷ MNF		E ²⁷⁷
Produit du gène <i>PqqF</i> de <i>K. pneumoniae</i>	GLA ⁴⁹ HLEEH ⁵³ LLF		E ¹³⁰
CPE de <i>P. sativum</i>	GIA ²³⁸ HMIEH ²⁴² VAF		E ³¹⁹
Protéine de <i>E. bovis</i>	GLA ⁷⁷ HFLEH ⁸¹ MLF		E ¹⁵⁸

Les nombres au niveau des séquences indiquent les positions des acides aminés déduites à partir des cadres de lecture ouvert (*orf*) des séquences nucléotidiques correspondantes. Les trois acides aminés liant le zinc (deux histidines (H) et un acide glutamique (E)) sont indiqués en gras. Bien que ne liant pas le zinc, l'acide glutamique contenu dans le pentapeptide HXXEH semble être impliqué dans l'activité catalytique de ces enzymes. NRD, N-arginine convertase dibasique; PM, protéase mitochondriale de maturation; CPE, protéase de maturation du chloroplaste.

tion dans la protéase III bactérienne des deux histidines (H) en arginine et de l'acide glutamique (E) en glutamine dans la séquence ⁸⁸**HYLEH**⁹² ont montré que seules les deux histidines sont impliquées dans la liaison du zinc tandis que les trois acides aminés sont requis pour l'activité catalytique de l'enzyme [11]. Des expériences identiques ont montré que l'acide glutamique 169 situé 76 acides aminés en amont du côté carboxy-terminal de la séquence HXXEH était le troisième site de liaison du zinc dans la protéase III [11]. Des études comparables menées avec l'insulinase humaine ont montré que les deux histidines contenues dans la séquence ¹⁰⁸**HFCEH**¹¹² ainsi que l'acide glutamique en position 189 représentaient les trois sites de liaison du zinc [12, 13].

Distribution subcellulaire des insulinases

Les enzymes de la famille des insulinases sont des protéases solubles

dont la distribution subcellulaire reste encore mal connue [10]. Ainsi, la protéase III est retrouvée dans l'espace périplasmique de la bactérie [7], tandis que les enzymes de maturation de type protéase mitochondriale PM-2 et CPE sont respectivement localisées dans la mitochondrie et le chloroplaste [8, 9]. Chez le mammifère, l'insulinase a été longtemps considérée comme une enzyme cytoplasmique en raison de sa récupération dans la fraction cytosolique par centrifugation différentielle d'homogénats de différents tissus [14]. Cependant, une étude détaillée de sa localisation dans le parenchyme hépatique par fractionnement subcellulaire a montré que l'insulinase était bien présente dans le cytosol, mais qu'elle était aussi associée en quantité importante aux peroxyosomes (*figure 1*) [15].

Après leur synthèse sur des ribosomes libres situés dans le cytoplasme, les enzymes peroxyso- males sont ciblées dans la lumière du peroxyosome au moyen de séquences-

signal contenues dans la séquence primaire des protéines peroxyso- males, et qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques localisés à la surface du peroxyosome [16]. L'occupation de ces récepteurs par une séquence-signal provoque l'ouverture d'un pore au travers duquel la protéine est transloquée. Le système de ciblage peroxyosomal de type I correspond à la séquence tripeptidique -Ala/Ser-Lys-Leu (-A/SKL) située en position carboxy-terminale des protéines peroxyso- males [16]. L'étude de la séquence des insulinases a permis d'identifier ce système de ciblage en position carboxy-terminale des insulinases de mammifère (-AKL) et d'insecte (-SKL) expliquant donc la présence des insulinases de mammi- fère dans le compartiment peroxyso- mal [15]. Cependant, la double locali- sation cytoplasmique et peroxyso- male de l'insulinase était inattendue puisque la présence d'une séquence de ciblage peroxyso- male de type I est une condition suffisante pour le ciblage total des protéines dans la lumière de cet organite [16]. Pour- tant, cette double localisation a été confirmée par des études d'immuno- fluorescence en microscopie confo- cale sur des cellules d'ovaire de ham- ster chinois (CHO) surproduisant l'insulinase (*figure 2*) [17], et par microscopie électronique sur des lignées cellulaires Ltk surproduisant aussi cette enzyme [18]. Après la découverte de sa localisation en partie peroxyso- male, la terminologie de cette enzyme fût changée et l'insuli- nase de mammifère fût dénommée PP110 (*peroxisomal protease of 110 kDa*) [17].

Le mécanisme physiologique de la rétention d'une partie de l'insulinase dans le compartiment cytoplasmique a ensuite été étudié par des expé- riences de marquage métabolique dans des cellules d'hépatome ren- dues semi-perméables par la digito- nine [19]. Ces études ont montré que les insulinases humaine et de rat étaient principalement retrouvées dans le compartiment cytoplasmique sous une forme hétérodimérique associée à une protéine de 70kDa encore non identifiée [19]. Ce co-fac- teur pourrait masquer en partie le tripeptide de ciblage peroxyso- mal

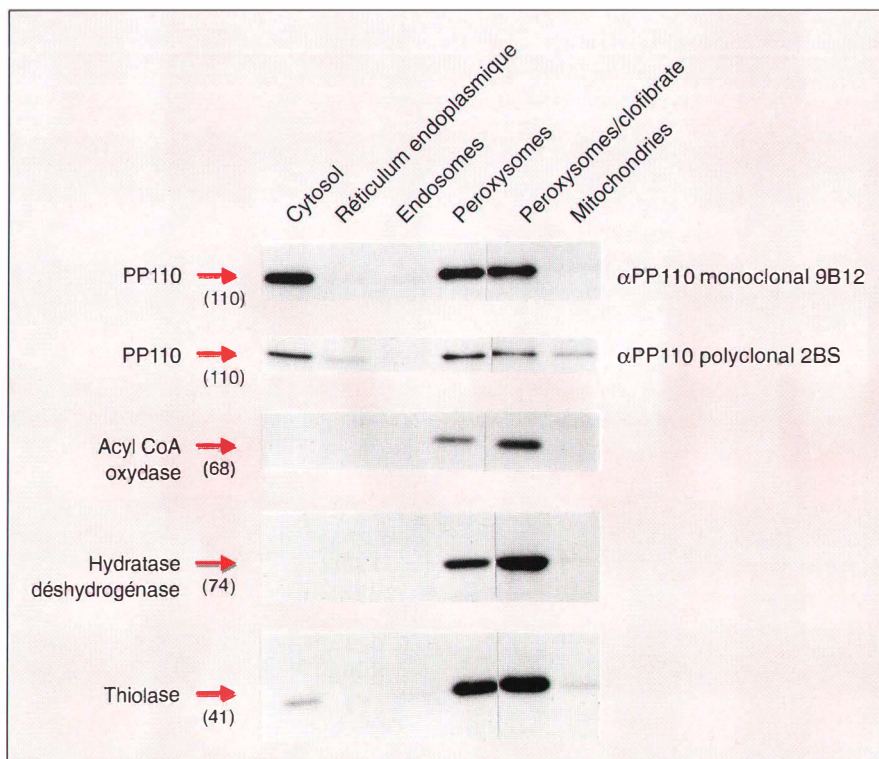


Figure 1. **Immunodétection de l'insulinase (PP110) et des enzymes de la β -oxydation peroxysomale dans les peroxysomes hépatiques de rat.** Des fractions subcellulaires hépatiques ont été préparées par centrifugation différentielle et centrifugation en gradient de densité à partir de rats normaux et de rats préalablement traités par du clofibrate, un hypolipémiant provoquant la prolifération peroxysomale en augmentant la synthèse des enzymes de la β -oxydation. Ces fractions ont été analysées pour leur antigénicité vis-à-vis d'un anticorps monoclonal anti-insulinase 9B12, d'un anticorps polyclonal anti-insulinase 2BS, et d'anticorps polyclonaux dirigés contre la première (acyl-CoA oxydase), la seconde (hydratase déshydrogénase) et la troisième (thiolase) enzyme de la β -oxydation peroxysomale [15].

-A/SKL de l'insulinase, et ainsi empêcher la translocation de l'enzyme au travers de la membrane peroxysomale.

Rôle physiologique des insulinases

Du fait de sa remarquable affinité *in vitro* pour l'insuline, l'insulinase fut proposée comme l'enzyme-clé du métabolisme intracellulaire de cette hormone [14]. Cependant, des études ont montré que l'insulinase était capable de dégrader *in vitro* un très grand nombre d'autres substrats avec des affinités proches voire supérieures à celle de l'insuline (Tableau II) [10, 14]. Ainsi, le facteur atrial natriuré-

tique auriculaire et le *transforming growth factor- α* ont des affinités pour l'insulinase comparables à celle de l'insuline. Cependant, bien qu'étant dégradés *in vitro* par l'insulinase, ces peptides ne peuvent pas représenter les substrats physiologiques de cette enzyme du fait de l'absence d'une localisation dans des compartiments identiques de ces substrats et de la protéase [14]. En effet, la localisation physiologique de ces polypeptides dans la cellule ne peut inclure que la membrane plasmique et les compartiments subcellulaires impliqués dans la voie de l'endocytose, à savoir l'endosome et le lysosome [20, 21]; tandis que la localisation de l'insuli-

nase de mammifère correspond au cytoplasme et au peroxysome [15, 17, 18]. De ce fait, l'implication de l'insulinase dans la dégradation de l'insuline et d'autres polypeptides hormonaux est actuellement écartée. Les chercheurs anglais N.D. Rawlings et A.J. Barrett ont élargi la classification des protéases selon leur type catalytique au profit d'une classification par famille qui ne tient compte que des analogies de séquences entre des protéines ayant de fortes identités structurales, sans restreindre ces comparaisons de séquences aux seules enzymes qui possèdent le pentapeptide HXXEH [1, 4]. A l'aide de cette nouvelle nomenclature, il est possible d'effectuer des analyses phylogéniques permettant d'apprécier les fonctions physiologiques de ces enzymes au cours de l'évolution. Selon ce système, l'insulinase appartient à la famille *Pitriylsin* M16 des métalloprotéases à zinc et comporte, en plus des 16 membres retenus dans l'ancienne classification, des protéines qui, bien que ne comportant pas le site actif pentapeptidique HXXEH (et qu'elles ne sont donc pas des protéases), possèdent une analogie de séquence marquée avec les insulinases [1, 4]. On retrouve ainsi les sous-unités α des protéases mitochondriales de maturation (PM-1) de rat, de levure et de champignon, et les sous-unités 1 et 2 de la cytochrome c réductase humaine et de levure.

Une analyse phylogénique portant sur neuf protéines ayant une analogie de séquence marquée avec l'insulinase humaine a été entreprise selon cette nouvelle méthode de classification (figure 3) [17]. Cette analyse a révélé deux points majeurs: (1) si on écarte les insulinases humaine, de rat et de drosophile, les six autres membres représentent des enzymes localisées dans des compartiments (espace périplasmique de bactérie et mitochondrie) dont la fonction est de dégrader les séquences-signal des molécules précurseurs ciblées dans la lumière de ces compartiments [8]; (2) l'arbre phylogénique a révélé deux sous-familles, la première étant constituée par les insulinases possédant le système de ciblage peroxysomal de type I et la protéase III bacté-

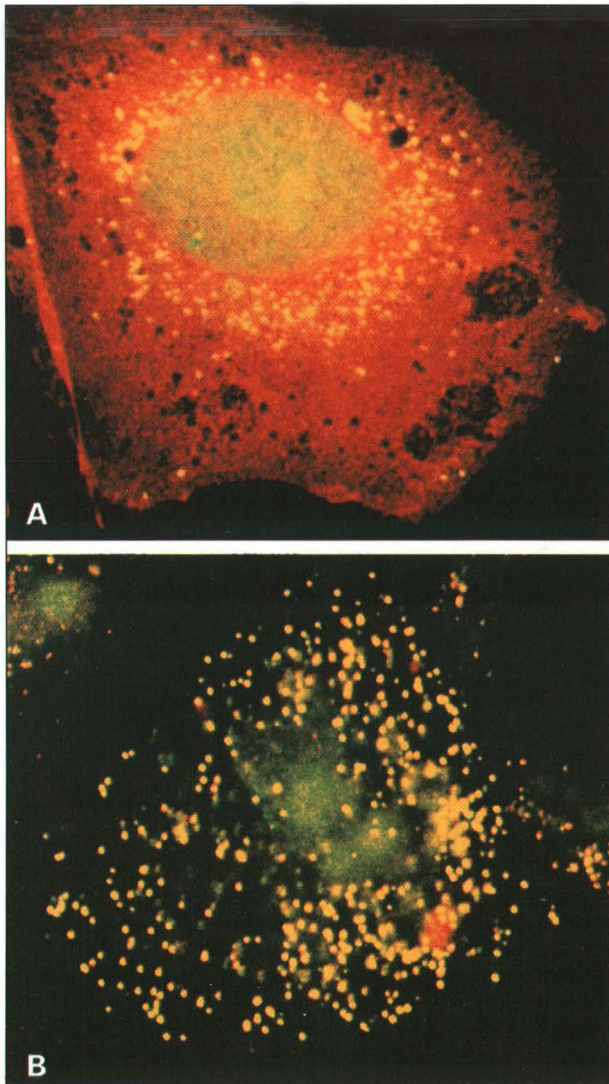


Figure 2. Double localisation cytoplasmique et peroxy-somale de l'insulinase humaine. Les cellules CHO ont été transfectées par un ADN complémentaire codant pour l'insulinase humaine afin d'augmenter la concentration cellulaire de cette enzyme. Puis, (A) la localisation de l'insulinase a été étudiée par une technique d'immunofluorescence en double marquage. Les cellules ont été marquées, d'une part, par un anticorps monoclonal anti-insulinase humaine (fluorochrome rouge), et d'autre part, par un anticorps polyclonal anticatalase (fluorochrome vert), une enzyme marqueur du peroxy-some. Le premier marquage diffus et rouge correspond à l'insulinase cytoplasmique puisque ce marquage peut être sélectivement éliminé en traitant les

cellules par de faibles concentrations de digitonine, (B), un traitement qui permet d'éliminer spécifiquement les protéines cytoplasmiques, sans perturber la distribution des autres protéines de la cellule. Le second marquage en jaune est intraperoxy-somal puisqu'il correspond à la coïncidence exacte des deux antigènes provoquant ainsi le mélange des deux fluorochromes, le mélange du rouge et du vert donnant le jaune [17].

rienne, et la seconde étant constituée des sous-unités α et β des protéases mitochondriales de maturation. Ainsi, la possibilité que l'insulinase peroxy-somale puisse être impliquée dans la dégradation des séquences-signal a été examinée [17]. Les enzymes peroxy-somales de type II, qui sont principalement les enzymes de la β -oxydation peroxy-somale, sont ciblées dans la lumière du peroxy-some grâce à une séquence-signal d'environ 25 acides aminés, située du côté aminoterminal et qui est systé-

matiquement éliminée et dégradée à l'intérieur de l'organite (figure 4) [16]. En utilisant un peptide synthétique de 26 acides aminés reproduisant la séquence-signal de la préthiolase (enzyme de la β -oxydation peroxy-somale), il a été montré [17]: (1) que cette séquence-signal libre se liait à l'insulinase de mammifère avec une affinité de $5 \mu\text{M}$; (2) qu'une dégradation spécifique et rapide de la séquence-signal était catalysée par l'insulinase; et, enfin; (3) que la séquence-signal liée au précurseur

n'était pas un substrat pour l'insulinase (figure 4). Du fait d'une analogie de séquence assez marquée entre les différentes séquences-signal des pré-curseurs de type II [17], il est attendu que l'ensemble de ces séquences-signal représente les substrats physiologiquement dégradés par l'insulinase dans le peroxy-some. Cette protéolyse des séquences-signal libres permettrait une diffusion des produits de dégradation de ces molécules au travers de la membrane peroxy-somale qui est imperméable aux peptides de masse moléculaire supérieure à 1 kDa. Cependant, l'implication de l'insulinase dans d'autres événements protéolytiques intervenant dans la lumière du peroxy-some n'est pas à exclure.

Puisque les études biochimiques et morphologiques ont montré l'existence d'une rétention cytoplasmique d'insulinase, il est peu probable que cette enzyme ne fonctionne que dans le peroxy-some. Ainsi, la protéine non spécifique de transfert lipidique, *sterol carrier protein-2*, possède une double localisation cytoplasmique et peroxy-somale malgré la présence d'un tripeptide de ciblage de type I (-AKL) en position carboxy-terminale; il a été montré que l'enzyme cytoplasmique participait à la fonction de cette protéine dans le transport du cholestérol [22]. Aussi, un membre de la famille des hydrolases époxydes possède un tripeptide de ciblage pré-somptif de type I (-SKI) et une double localisation cytoplasmique et peroxy-somale [10]. Récemment, la signification physiologique de l'insulinase cytoplasmique a peut-être été élucidée. L'insulinase cytoplasmique pourrait interagir directement avec les récepteurs stéroïdiens (récepteurs des androgènes et des glucocorticoïdes) et accroître la liaison à l'ADN de ces derniers [23]. Ainsi, ces récepteurs stéroïdiens pourraient représenter les substrats physiologiques de l'insulinase cytoplasmique et directement moduler l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs.

Distribution tissulaire et régulation de la synthèse des insulinases

La plupart des tissus et des types cellulaires produisent l'insulinase. Les ana-

Tableau II		
LES SUBSTRATS <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> DE L'INSULINASE DE MAMMIFÈRE		
Substrats	Km (μ M)	Liaisons peptidiques clivées
<i>In vitro</i>		
Insuline	0,1	Leu ¹³ -Tyr ¹⁴ , Tyr ¹⁴ -Gln ¹⁵ (chaîne A) Ser ⁸ -His ¹⁰ , His ¹⁰ -Leu ¹¹ , Glu ¹³ -Ala ¹⁴ , Ala ¹⁴ -Leu ¹⁵ Tyr ¹⁶ -Leu ¹⁷ , Phe ²⁴ -Phe ²⁵ , Phe ²⁵ -Tyr ²⁶ (chaîne B)
Chaîne B de l'insuline	5,1	ND
Glucagon	5,3	Ser ¹⁶ -Arg ¹⁷ , Arg ¹⁷ -Arg ¹⁸
Peptide atrial natriurétique	0,1	Arg ³ -Arg ⁴ , Cys ⁷ -Phe ⁸ , Asp ¹³ -Arg ¹⁴ , Ser ²⁵ -Phe ²⁶
Peptide natriurétique de cerveau	> 1	Gly ⁶ -Arg ⁷ , Asp ¹⁰ -Arg ¹¹ , Arg ²⁴ -Arg ²⁵
Peptide natriurétique de type C	ND	Gly ⁸ -Leu ⁹ , Asp ¹² -Arg ¹³
Transforming growth factor- α	0,1	ND
Hémoglobine oxydée	38	ND
[Leu ⁵⁰³ -Lys ⁵¹⁸]-sérum albumine bovine	0,135	Phe ⁵⁰⁶ -His ⁵⁰⁷
[Ile ⁸¹ -Glu ¹⁰⁴]-cytochrome c	15	Tyr ⁹⁷ -Leu ⁹⁸
Hormone adrénocorticotrophique	< 1	ND
Facteur de croissance insulino-mimétique I	16	ND
Facteur de croissance insulino-mimétique II	0,56	ND
<i>In vivo</i>		
Séquence-signal peroxysomale de type II de la préthiolase	5	ND

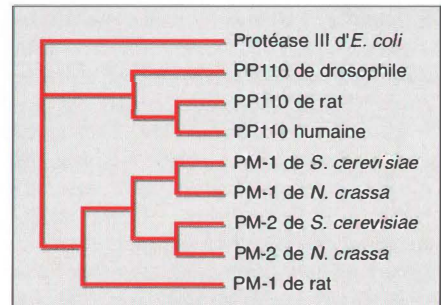


Figure 3. **Arbre phylogénique des enzymes de la famille des insulinases.** Au moyen d'une analyse des analogies de séquence avec le programme Multalin fondé sur les travaux de Rawlings et Barrett [1, 4], les insulinases (PP110) et d'autres enzymes ayant des analogies de séquence marquées ont été classées selon leur lien proche ou éloigné au travers de l'évolution.

Les valeurs de Km correspondent aux concentrations de peptide provoquant 50% d'inhibition de l'insulinase. Elles ont été définies par des expériences de compétition de protéolyse de l'insuline iodée par l'insulinase. Les nombres indiquent la position des acides aminés encadrant les liaisons peptidiques clivées sous l'action de l'insulinase. Les clivages peptidiques dans les molécules de substrat ont été déterminés (1) pour l'insuline par des études de radioséquençage des produits de dégradation engendrés au cours d'une incubation de l'insuline iodée avec l'insulinase, et (2) pour le glucagon et les peptides natriurétiques par des études de séquençage des produits de dégradation engendrés au cours de l'incubation des substrats non radiomarqués avec l'insulinase. ND, non déterminé.

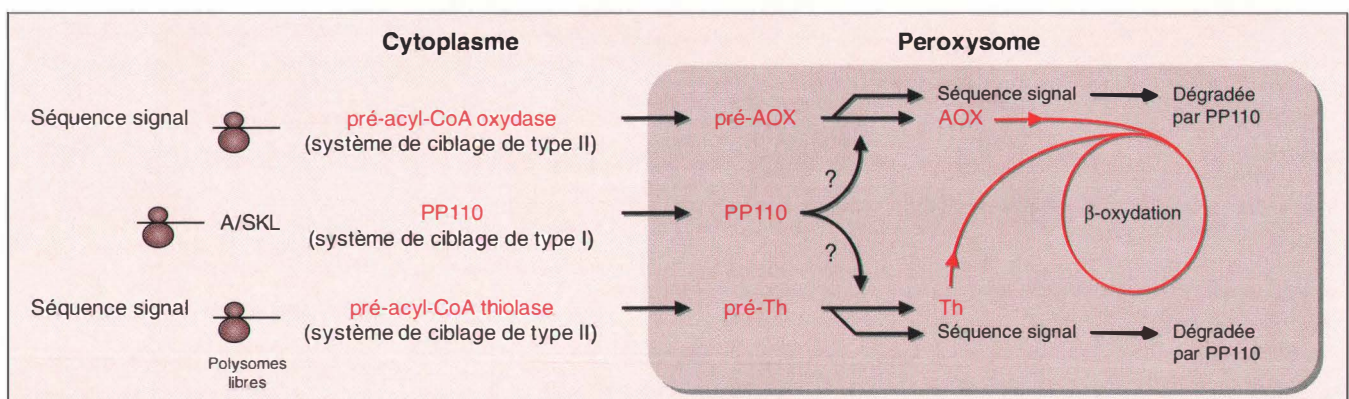


Figure 4. **Rôle potentiel de l'insulinase peroxysomale.** Après leur synthèse sur des ribosomes libres cytoplasmiques, les enzymes peroxysomales sont ciblées dans la lumière de l'organite grâce à trois systèmes de ciblage spécifique. Les enzymes peroxysomales de type I (comme l'insulinase ou PP110) sont ciblées dans le péroxysoме grâce au tripeptide -A/SKL en situation carboxy-terminale. Les enzymes peroxysomales de type II (enzymes de la β -oxydation), telles que l'acyl-CoA thiolase et l'acyl-CoA oxydase sont ciblées grâce à une séquence-signal d'environ 25 acides aminés, située du côté aminoterminal et qui est clivée après la translocation du précurseur dans la lumière de l'organite. Il a été montré par des techniques biochimiques que les séquences-signal libres des enzymes de type II représentaient des substrats physiologiques pour l'insulinase peroxysomale.

lyses de *Northern blot* ont permis d'identifier au moins deux ARN messagers pour l'insulinase dans la plupart des tissus: la longueur du premier (3,7kb) est cohérente avec la masse moléculaire de l'enzyme (110 kDa). Le second ARNm, de 5,5kb, pourrait coder pour une isoforme de l'insulinase d'une masse moléculaire plus importante. Dans les testicules, les deux messagers ont une taille légèrement supérieure [24]. On ne sait pas si ces différences de taille des ARN messagers affectent de façon majeure la séquence de l'insulinase ou sa fonction physiologique dans ce tissu. Une quantification des différents transcrits [24] ainsi que des études d'hybridation *in situ* [25] chez le rat adulte ont révélé que la synthèse de l'insulinase était importante dans les testicules, la langue et le cerveau; modérée dans les reins, la prostate, le cœur, le muscle, le foie, les intestins et la peau; et faible dans la rate, les poumons, le thymus et l'utérus. Le haut niveau de synthèse de l'insulinase dans les gonades milite en faveur de sa régulation au cours du développement. Ainsi, chez le rat, la concentration des transcrits augmente dans les testicules, la langue et le cerveau entre le 14^e et le 28^e jour après la naissance [25]. Chez la drosophile, la synthèse de l'insulinase est pauvre au stade embryonnaire puis augmente de cinq fois de la larve à la nymphe, et de dix fois de la nymphe à l'imago [14]. Enfin, la synthèse de l'insulinase d'*Eimeria bovis* semble réglée durant le développement des sporozoïtes et des mérozoïtes [10] ■

RÉFÉRENCES

- Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 1993; 290: 205-18.
- Becker AB, Roth RA. An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3835-9.
- Affholter JA, Fried VA, Roth RA. Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* protease III. *Science* 1988; 242: 1415-8.
- Rawlings ND, Barrett AJ. Homologues of insulinase, a new superfamily of metalloendopeptidase. *Biochem J* 1991; 275: 389-91.
- Kuo WL, Gehm BD, Rosner MR. Cloning and expression of the cDNA for a Drosophila insulin-degrading enzyme. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1580-91.
- Pierotti AR, Prat A, Chesneau V, Gaudoux F, Leseney AM, Foulon T, Cohen P. N-arginine dibasic convertase, a metalloendopeptidase as a prototype of a class of processing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6078-82.
- Ding L, Becker AB, Suzuki A, Roth RA. Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and *Escherichia coli* protease III. *J Biol Chem* 1992; 267: 2414-20.
- Braun HP, Schmitz UK. Are the core proteins of the mitochondrial bc₁ complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 171-5.
- VanderVere PS, Bennett TM, Oblong JE, Lamppa GK. A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognized family of metallo-endopeptidases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7177-81.
- Authier F, Posner BI, Bergeron JJM. Insulin-degrading enzyme. *Clin Invest Med* 1996; 19: 149-60.
- Becker AB, Roth RA. Identification of glutamate-169 as the third zinc-binding residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. *Biochem J* 1993; 292: 137-42.
- Gehm BD, Kuo WL, Perlman RK, Rosner MR. Mutations in a zinc-binding domain of human insulin-degrading enzyme eliminate catalytic activity but not insulin binding. *J Biol Chem* 1993; 268: 7943-8.
- Perlman RK, Rosner MR. Identification of zinc ligands of the insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 33140-5.
- Authier F, Posner BI, Bergeron JJM. Hepatic endosomes are a major physiological locus of insulin and glucagon degradation *in vivo*. In: Ciechanover A, Schwartz AL, eds. *Cellular proteolytic systems*. New York: Wiley-Liss, 1994; 15: 89-113.
- Authier F, Rachubinski RA, Posner BI, Bergeron JJM. Endosomal proteolysis of insulin by an acidic thiol metalloprotease unrelated to insulin-degrading enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 3010-6.
- Rachubinski RA, Subramani S. How proteins penetrate peroxisomes. *Cell* 1995; 83: 525-8.
- Authier F, Bergeron JJM, Ou WJ, Rachubinski RA, Posner BI, Walton PA. Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3859-63.
- Kuo WL, Gehm BD, Rosner MR, Li W, Keller G. Inducible expression and cellular localization of insulin-degrading enzyme in a stably transfected cell line. *J Biol Chem* 1994; 269: 22599-606.
- Authier F, Cameron PH, Taupin V. Association of insulin-degrading enzyme with a 70-kDa cytosolic protein in hepatoma cells. *Biochem J* 1996; 319: 149-58.
- Authier F, Mort JS, Bell AW, Posner BI, Bergeron JJM. Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D. *J Biol Chem* 1995; 270: 15798-807.
- Authier F, Posner BI, Bergeron JJM. Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett* 1996; 389: 55-60.
- Ossendorp BC, Wirtz KWA. The non-specific lipid-transfer protein (sterol carrier protein 2) and its relationship to peroxisomes. *Biochimie* 1993; 75: 191-200.
- Kupfer SR, Wilson EM, French FS. Androgen and glucocorticoid receptors interact with insulin degrading enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 20622-8.
- Kuo WL, Montag AG, Rosner MR. Insulin-degrading enzyme is differentially expressed and developmentally regulated in various rat tissues. *Endocrinology* 1993; 132: 604-11.
- Bondy CA, Zhou J, Chin E, Reinhardt RR, Ding L, Roth RA. Cellular distribution of insulin-degrading enzyme gene expression. *J Clin Invest* 1994; 93: 966-73.

François Authier

Chargé de recherche. Inserm U. 30, Hôpital Necker-Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France.

Véronique Taupin

Chef de laboratoire du département de recherche sur le système nerveux central. Laboratoires Synthelabo, 92220 Bagneux, France.

Barry I. Posner

Professeur de médecine. Département de médecine, Université McGill, Montréal H3A-2B2, Québec, Canada.

John J.M. Bergeron

Chef de département. Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Université McGill, Montréal H3A-2B2, Québec, Canada.

TIRÉS À PART

F. Authier.