

LE RÉCEPTEUR À L'INSULINE : Structure et fonction

P. DE MEYTS (1)

RÉSUMÉ : Quelque 35 ans après les premières études *in vitro* du récepteur à l'insuline, des progrès considérables ont été accomplis dans la biologie structurale de l'interaction insuline-récepteur, et de la classe des récepteurs à tyrosine kinase en général. Cette brève revue tente de mettre en place les différentes pièces du puzzle, en dépit de l'absence d'une structure cristallographique détaillée du complexe insuline-récepteur, et d'établir un modèle qui explique le mécanisme d'activation du récepteur, sa coopérativité négative et le déclenchement des processus de signalisation intracellulaire.

MOTS-CLÉS : *Insuline - Récepteur tyrosine kinase - Coopérativité négative*

THE INSULINE RECEPTOR : STRUCTURE AND FUNCTION

SUMMARY : About 35 years after the first *in vitro* studies of the insulin receptor, considerable progress has been accomplished in the structural biology of the insulin-receptor interaction, and of the receptor tyrosine kinase family in general. This brief review attempts to assemble the various pieces of the puzzle, despite the lack of a detailed crystallographic structure of the insulin-receptor complex, and to establish a model that explains the mechanism of receptor activation, its negative cooperativity, and the triggering of intracellular signalling pathways.

KEYWORDS : *Insulin - Receptor tyrosine kinase - Negative cooperativity*

INTRODUCTION ET BREF HISTORIQUE

L'existence d'un récepteur spécifique localisé dans la membrane cellulaire pour expliquer les effets métaboliques de l'insuline a été postulée il y a près d'un demi-siècle, entre autres par Rachmiel Levine, un pionnier de la diabétologie qui montra, dès 1949, que l'insuline stimule l'entrée du glucose dans les cellules (pour revue, voir réf. 1).

Les premières tentatives d'identifier le récepteur *in situ* à l'aide d'insuline marquée à l'iode radioactif s'étaient avérées infructueuses en raison de la nature non-spécifique de la liaison observée. La méthode de marquage à l'iode radioactif d'hormones peptidiques par la chlormine T, mise au point par Hunter et Greenwood, méthode qui a permis le prodigieux essor de la radioimmunologie, visait à obtenir une activité spécifique maximale du traceur. En 1970, Jesse Roth aux National Institutes of Health (NIH) à Bethesda travaillant sur l'ACTH et, indépendamment, Ted Goodfriend à l'Université de Madison, travaillant sur l'angiotensine, démontrent que cette haute activité spécifique est délétère pour l'activité biologique fragile des peptides, et mettent au point une méthode stoechiométrique «douce» qui résulte en l'obtention d'hormones monoiodées à l'activité biologique intacte. Après la démonstration de récepteurs pour l'ACTH et l'angiotensine, la démonstration de récepteurs à l'insuline dans les membranes cellulaires de cellules hépatiques par House et Weidemann à Canberra, Pierre Freychet et Jesse Roth ainsi que Pedro Cuatrecasas au NIH, suit rapidement (1). La «réceptologie» des hormones peptidiques connaît, dès lors, un développement

explosif, déjà évident lors du mémorable International Symposium on Protein and Polypeptide Hormones organisé à l'Université de Liège en 1971 par le regretté Professeur Henri Van Cauwenberge et ses collègues, auquel participent les pionniers de cette nouvelle discipline ainsi que les radioimmunologistes déjà classiques, y compris les futurs Prix Nobel Martin Rodbell et Rosalyn Yalow. J'y fis la rencontre de Jesse Roth qui m'invita à travailler dans son laboratoire.

Les études de liaison de l'insuline marquée permettront de démontrer *in vitro* l'existence du phénomène de «downregulation» du nombre des récepteurs en présence de concentrations accrues d'insuline (2), phénomène démontré ensuite *in vivo* chez la souris et l'homme obèses insulino-résistants (3). L'affinité de la liaison de l'insuline varie, elle aussi, en proportion inverse de la concentration ambiante d'insuline, par un phénomène de «coopérativité négative» (4,5).

Les premières études de relations structure-activité, basées sur les propriétés de liaison d'insulines de divers vertébrés, d'insulines modifiées chimiquement ou préparées par synthèse totale ou par hémisynthèse enzymatique, permettent de cartographier une première surface de liaison au récepteur sur la molécule d'insuline (4, 6), que nous appellerons désormais la «surface classique» de liaison (voir plus loin) (1, 7).

L'AVÈNEMENT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Les progrès de la biologie moléculaire dans les années septante ouvrent la voie à la biosynthèse de l'insuline par ingénierie génétique en 1979; l'insuline humaine recombinante sera sur le marché en 1982. De plus, il est désormais possible de modifier à volonté la séquence d'acides aminés de la molécule d'insuline, permettant la

(1) Directeur Scientifique, Receptor Systems Biology Laboratory, Hagedorn Research Institute, 2820 Gentofte, Danemark

biosynthèse de nombreux analogues pour une étude plus approfondie de ses relations structure-activité, ainsi que le design d'analogues aux propriétés pharmacocinétiques améliorées pour l'optimisation du traitement des patients diabétiques (8).

L'ADN complémentaire du récepteur insulinaire est cloné en 1985 par les groupes d'Axel Ullrich à Genentech (9) et Bill Rutter à Chiron (10), et la séquence du gène déterminée peu après, fournissant des données essentielles sur la structure et l'organisation moléculaire du récepteur. Cette structure, comme celle de l'insuline, peut désormais aussi être explorée par mutagenèse dirigée. Il est aussi possible d'exprimer la protéine du récepteur dans diverses lignées de cellules et d'étudier le récepteur purifié. En principe, il devient aussi possible de déterminer la structure du complexe hormone-récepteur par cristallographie aux rayons X, mais les diverses tentatives n'ont pas encore été couronnées de succès.

Me basant sur les données ainsi acquises et de multiples approches expérimentales que la place me manque pour décrire en détail, je résume ici l'état actuel de nos connaissances sur la structure du récepteur et la nature de son interaction avec la molécule d'insuline.

STRUCTURE DU RÉCEPTEUR À L'INSULINE

Le récepteur insulinaire appartient à la super-famille des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) (Fig. 1), ainsi dénommée parce que la partie intracellulaire du récepteur comporte un module enzymatique qui phosphoryle les chaînes latérales tyrosines de divers substrats intracellulaires, déclenchant les cascades de signalisation (voir plus loin). On dénombre une soixantaine de RTKs dans le génome humain, groupés en 19 familles selon l'architecture du domaine extracellulaire, lequel utilise une variété de modules protéiques pour créer des sites de liaison spécifiques pour le ligand, hormone, cytokine ou facteur de croissance (Fig. 1). Les RTKs comportent, en général, une seule chaîne polypeptidique transmembranaire, à l'exception des récepteurs apparentés pour l'insuline et les facteurs de croissance insulinomimétiques (IGF-I et IGF-II, numéro 2 dans la Fig. 1), qui sont des dimères covalents (deux sous-unités α extracellulaires et deux sous-unités β transmembranaires) liés par un petit nombre de ponts disulfures (Fig. 2). Mais il est important de noter qu'à l'état activé, tous les RTKs sont des dimères et sont, en fait, activés par un mécanisme de dimérisation induit par le ligand. La dimérisation rapproche les deux domaines tyrosine kinase, permettant la phosphorylation d'une

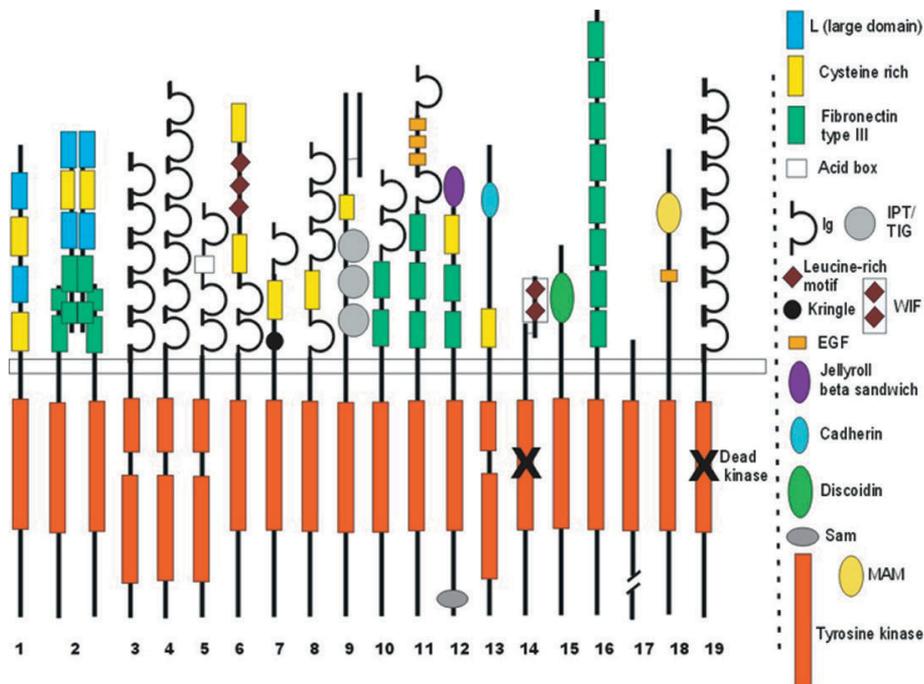


Figure 1 : La superfamille des récepteurs à tyrosine kinase. Reproduit avec permission de Gray S, Stenfeldt-Mathiasen I, De Meyts P, Horm Metab Res 2003, 35, 857-871. Voir cette revue pour détails. Les différents modules protéiques qui constituent les domaines extracellulaires sont décrits à droite de la figure. La sous famille n° 2 (dimères covalents) comprend les deux récepteurs pour l'insuline et les IGFs, ainsi qu'un «récepteur orphelin» sans ligand connu.

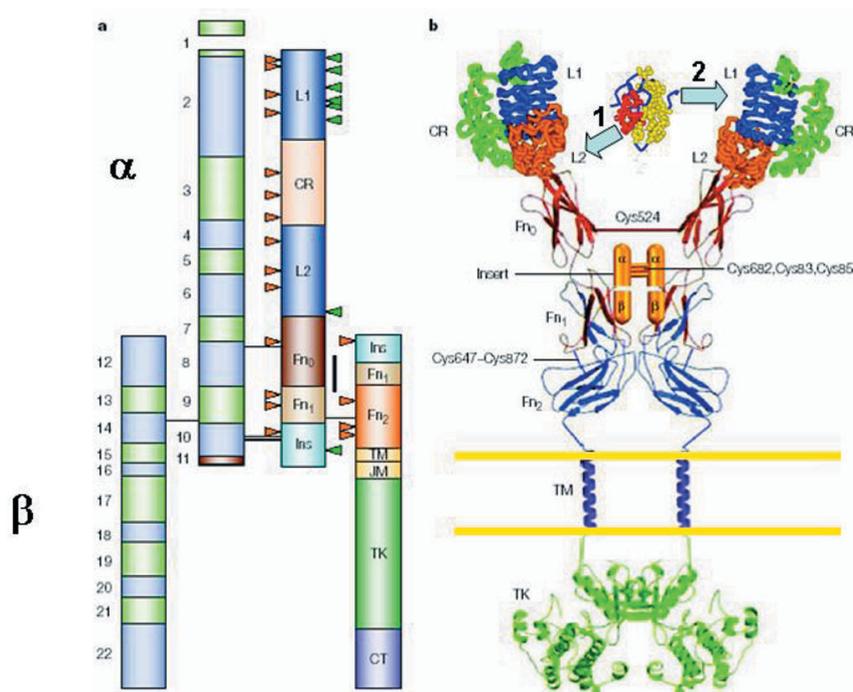


Figure 2 : Structure $\alpha 2\beta 2$ du récepteur à l'insuline. Adapté de la référence 7, voir cette revue pour détails. a. Vue schématique de l'organisation générale du récepteur. Partie gauche : Schéma des séquences protéiques encodées par les 22 exons du gène du récepteur. Partie droite : Modules protéiques correspondants, voir texte pour détails. b. Prédiction tri-dimensionnelle des différents modules constitutifs du récepteur. La structure du domaine L1-CR-L2 est modélisée d'après la structure cristallographique équivalente du récepteur de l'IGF-I. La structure du domaine tyrosine kinase (TK) est également une structure cristallographique. Les autres structures sont des prédictions théoriques. La structure tri-dimensionnelle de la molécule d'insuline est montrée au milieu, avec la surface «classique» de liaison montrée en jaune et la nouvelle surface de liaison en rouge. Les deux flèches marquées 1 et 2 illustrent le mécanisme séquentiel bivalent postulé dans les références 1,5,7 (voir texte pour explications).

kinase par l'autre («transphosphorylation»), ce qui multiplie l'activité enzymatique par un facteur 30 et crée, en outre, des sites de liaison (tyrosines phosphorylées) pour diverses molécules impliquées dans la signalisation.

La structure du récepteur insulinaire (Fig. 2) est faite d'une série de modules protéiques, successivement en partant de l'extrémité N-terminale: un domaine L1-CR-L2 constitué de deux larges domaines globulaires (hélices β faites de leucine-rich repeats) séparés par un domaine riche en cystéines; trois domaines fibronectines de type III (Fn0, Fn1 et Fn2), dont le second est interrompu par une insertion de structure inconnue qui contient le site de clivage entre sous-unités α et β ; le domaine transmembranaire, et le domaine tyrosine kinase.

NATURE DE L'INTERACTION ENTRE L'INSULINE ET SON RÉCEPTEUR

L'insuline sécrétée par la cellule β du pancréas circule sous forme monomérique; le monomère est la forme bioactive de l'insuline, qui se lie au récepteur cellulaire. A concentration supraphysiologique, l'insuline forme des dimères, et en présence de zinc, des hexamères de 6 molécules qui constituent la forme de stockage de l'insu-

line dans les granules de la cellule β . Grâce à la structure cristallographique de l'insuline déterminée par Dorothy Crowfoot Hodgkin et son groupe en 1969 (11), la nature des surfaces impliquées dans la dimérisation et l'hexamérisation de l'insuline sont connues avec précision (Fig. 3). Nos travaux et d'autres ont montré que ce sont largement les mêmes surfaces que l'insuline utilise pour se lier au récepteur (1,4,5,7).

Le rôle de la surface «classique» de liaison (qui se superpose en grande partie avec la surface de dimérisation), mentionnée plus haut, a été confirmé récemment par alanine scanning mutagenesis (balayage par mutagenèse en alanine) de l'insuline (1,7). Cette technique consiste à remplacer systématiquement chaque acide aminé par une alanine, dépourvue de chaîne latérale; une perte significative d'affinité pour le récepteur démontre l'importance de cet acide aminé pour la liaison au récepteur. Nous avons, en outre, démontré récemment, par la même technique, l'importance d'acides aminés impliqués dans la surface d'hexamérisation pour la liaison au récepteur, cartographiant de la sorte une nouvelle surface de liaison (1) (Fig. 2).

Différentes approches expérimentales ont été utilisées pour situer sur le récepteur les surfaces impliquées dans la liaison de l'insuline, y compris

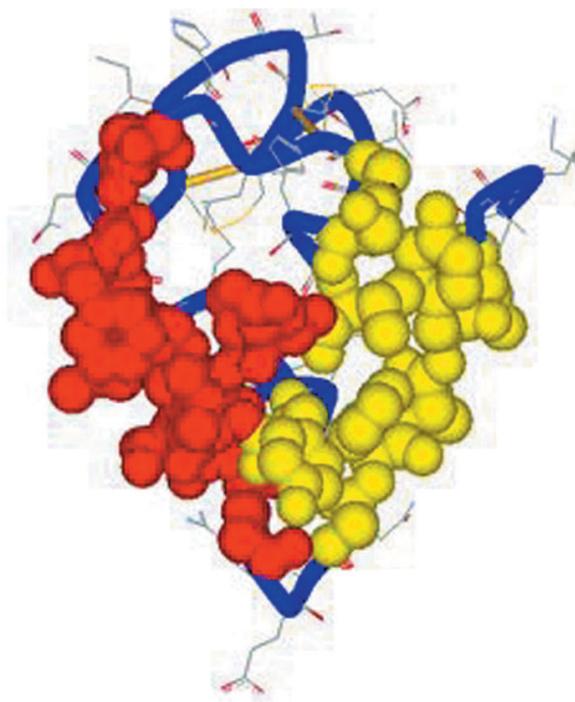


Figure 3. Monomère de l'insuline : Surfaces impliquées dans la dimérisation (en jaune) et l'hexamérisation (en rouge) de la molécule (11). Reproduit avec permission de la référence 1.

le balayage par mutagenèse en alanine (1, 7). Deux domaines ont été ainsi circonscrits, l'un dans le domaine L1, l'autre à la jonction L2-Fn0 (Fig. 2). En outre, un peptide d'une dizaine d'acides aminés, dans l'insertion présente dans le domaine Fn1, apparaît essentiel, en coopération

avec le domaine L1, pour créer un site de liaison de haute affinité.

Il apparaît ainsi que l'insuline se comporte comme un ligand bivalent (comme l'hormone de croissance dont la structure du complexe hormone-récepteur a été complètement élucidée (12)), dont les deux surfaces de liaison se lient à deux sites distincts sur les deux sous-unités α du récepteur (Fig. 2) et, en les rapprochant, favorise le rapprochement des deux domaines tyrosine kinase, et leur transphosphorylation, déclenchant ainsi la cascade de signalisation intracellulaire.

La coopérativité négative (4, 5) pourrait résulter d'une liaison alternative de l'insuline aux deux paires de sites de liaison L1/L2-Fn0, le récepteur n'étant capable de fixer qu'une molécule d'insuline à la fois avec haute affinité (7). Ce mécanisme, qui réduit le temps de résidence de l'insuline sur le récepteur lorsque la concentration ambiante s'accroît, pourrait agir comme un frein vis-à-vis de l'activité mitogène de l'insuline via son récepteur. Ainsi, des analogues, dont la vitesse de dissociation du récepteur est ralentie, ont un pouvoir mitogène accru (13-15).

LES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE

Une description détaillée des mécanismes de signalisation intracellulaire (Fig. 4) dépasse le cadre de cette revue. La tyrosine kinase activée recrute une famille de «docking proteins» (pro-

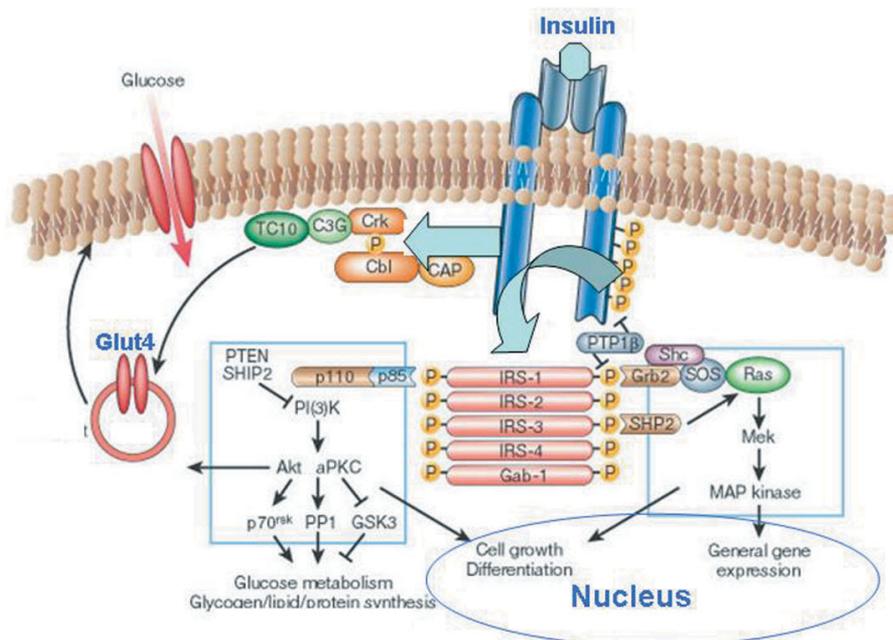


Figure 4. Voies de signalisation intracellulaires du récepteur à l'insuline. Adapté de Saltiel AR et Kahn CR, Nature, 2001, 414, 799-806 ; voir cette référence et texte pour explication détaillée.

téines d'accostage) - IRS 1-6, Shc, Gab1 - dont les tyrosines phosphorylées par le récepteur insuliniq ue lie nt une variété de molécules de signalisation. Ceci résulte en l'activation de deux voies principales de signalisation : la voie de la MAP kinase (dont le rôle pour l'insuline est probablement cantonné à l'activation dans le noyau cellulaire de la transcription de certains gènes) et la voie de la PI-3 kinase, qui joue un rôle essentiel dans le transport du glucose via l'activation de la kinase Akt/PKB, laquelle stimule (par un mécanisme non encore élucidé) la translocation membranaire des transporteurs de glucose GLUT4.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des progrès considérables ont été réalisés au cours des trois dernières décennies dans notre compréhension des relations structure-activité de la molécule d'insuline et de son interaction avec son récepteur et, plus récemment, dans les voies de signalisation intracellulaires. Une étape majeure reste à franchir, l'obtention d'une structure détaillée du complexe hormone-récepteur, qui ouvrirait la voie à de nouvelles approches thérapeutiques, y compris le design d'insulino-mimétiques actifs par voie orale.

BIBLIOGRAPHIE

- De Meyts P.— Insulin and its receptor : structure, function and evolution. *Bioessays*, 2004, **26**, 1351-1362.
- Gavin JR III, Roth J, Neville DM Jr, et al.— Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations : a direct demonstration in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, **71**, 84-88.
- Bar RS, Gorden P, Roth J, et al.— Fluctuation in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients; effect of starvation, refeeding or dieting. *J Clin Invest*, 1976, **58**, 1123-1135.
- De Meyts P, Van Obberghen E, Roth J, et al.— Mapping of the residues of the receptor binding region of insulin responsible for the negative cooperativity. *Nature*, 1978, **273**, 504-509.
- De Meyts P.— The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor binding and negative cooperativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia*, 1994, **37** (Suppl. 2), S135-S148.
- Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, et al.— Receptor-binding region of insulin. *Nature*, 1976, **259**, 369-373.
- De Meyts P, Whittaker J.— Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Disc*, 2002, **1**, 769-783.
- Brange J, Vølund A.— Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, **35**, 307-335.
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, et al.— Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 1985, **313**, 756-761.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, et al.— The human insulin receptor cDNA : the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 1985, **40**, 747-758.
- Baker E, Blundell TL, Cutfield JF, et al.— The structure of 2Zn pig insulin at 1.5 Å resolution. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1988, **19**, 369-456.
- de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA.— Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 1992, **255**, 306-312.
- Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K.— Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J*, 1996, **315**, 271-279.
- De Meyts P, Shymko RM.— Timing-dependent modulation of insulin mitogenic versus metabolic signalling. In: Mechanisms and biological significance of pulsatile hormone secretion, *Novartis Foundation Symposium*, 2000, **223**, 46-60.
- Kurzahls P, Schäffer L, Sørensen A, et al.— Correlations of receptor binding and mitogenic potencies of insulin analogues designed for clinical use. *Diabetes*, 2000, **49**, 999-1005.

DÉDICACE

Cette revue est dédiée au Professeur Pierre J. Lefèbvre, qui m'a initié à la diabétologie.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Dr. P. De Meyts, MD, PhD, F.A.C.E. Receptor Systems Biology Laboratory, Hagedorn Research Institute, Niels Steensens Vej 6, DK-2820 Gentofte, Denmark
Email: pdm@novonordisk.com