

HORMONES PEPTIDIQUES

INSULINE

Le rôle capital joué par le pancréas dans l'homéostasie glucidique a été élucidé en 1899 par Von Mering et Minkowsky mais ce n'est qu'en 1922 que l'insuline fut employée en thérapie humaine afin de remédier à la mortalité induite par le diabète de type 1. La connaissance de la fonctionnalité des cellules productrices d'insuline a progressé grâce aux techniques de dosages radio-immunologiques et d'isolement des îlots de Langerhans. La localisation de ces cellules de type B est typique. Dans un îlot, les cellules B sont distribuées au centre et représentent 70 à 75 % du total cellulaire. L'ultrastructure révèle dans le cytoplasme des granulations dites b constituant la **réserve insulinique** de l'îlot.

La molécule d'insuline se compose de deux chaînes polypeptidiques unies par des ponts disulfure. Cette conformation résulte des modalités de sa synthèse. L'insuline est sécrétée ors des cellules B en même temps que le peptide - c, une molécule au rôle mal connu.

BIOSYNTHESE DE L'INSULINE

L'insuline est formée de 51 acides aminés, arrangés en deux chaînes polypeptidiques A (α) et B (β) reliées par 2 ponts disulfures. A l'intérieur de la chaîne A, il existe un pont disulfure supplémentaire qui lie les résidus des acides aminés 6 et 11. La structure de l'insuline humaine ne diffère de celle de l'insuline du porc que par l'acide aminé C terminal de la chaîne B. Par hémisynthèse il suffit de remplacer l'alanine (C terminal) de la chaîne B de l'insuline du porc par la thréonine pour obtenir l'insuline humaine.

Le gène de l'insuline s'exprime dans les cellules B des îlots de Langerhans du pancréas. La biosynthèse de l'insuline s'amorce dans le noyau des cellules B, à partir de l'information contenue dans le code génétique, située sur le chromosome 11, et son parcours intracellulaire se poursuit dans le réticulum endoplasmique rugueux après la transcription en ARN du gène codant pour une grosse molécule précurseur : la **pré-pro-insuline** qui a une durée de vie courte. L'ARNm traduit et exporté dans le cytoplasme transfère aux ribosomes situés à la surface des citernes (ou saccules) formant le réseau complexe du réticulum, les informations nécessaires pour assembler les acides aminés constituant la pré-pro-insuline. Le segment "pré" coupé par des enzymes, synthétisés par d'autres ribosomes, est responsable de la migration de la chaîne protéique en cours d'assemblage vers l'intérieur des cavités du réticulum endoplasmique rugueux. La molécule de pré-pro-insuline est alors transformée en **pro-insuline** (86 acides aminés, poids moléculaire » 9000) contenant les chaînes d'acides aminés qui donneront l'**insuline** (51 acides aminés, poids moléculaire » 6000), plus un segment, le peptide de connexion ou **peptide-c** (31 acides aminés, poids moléculaire » 3000) reliant la fin de la chaîne A au début de la chaîne B. (**figure 1**). Dans le réticulum, les molécules de pro-insuline s'associent en hexamères, ceci nécessitant la présence de zinc.

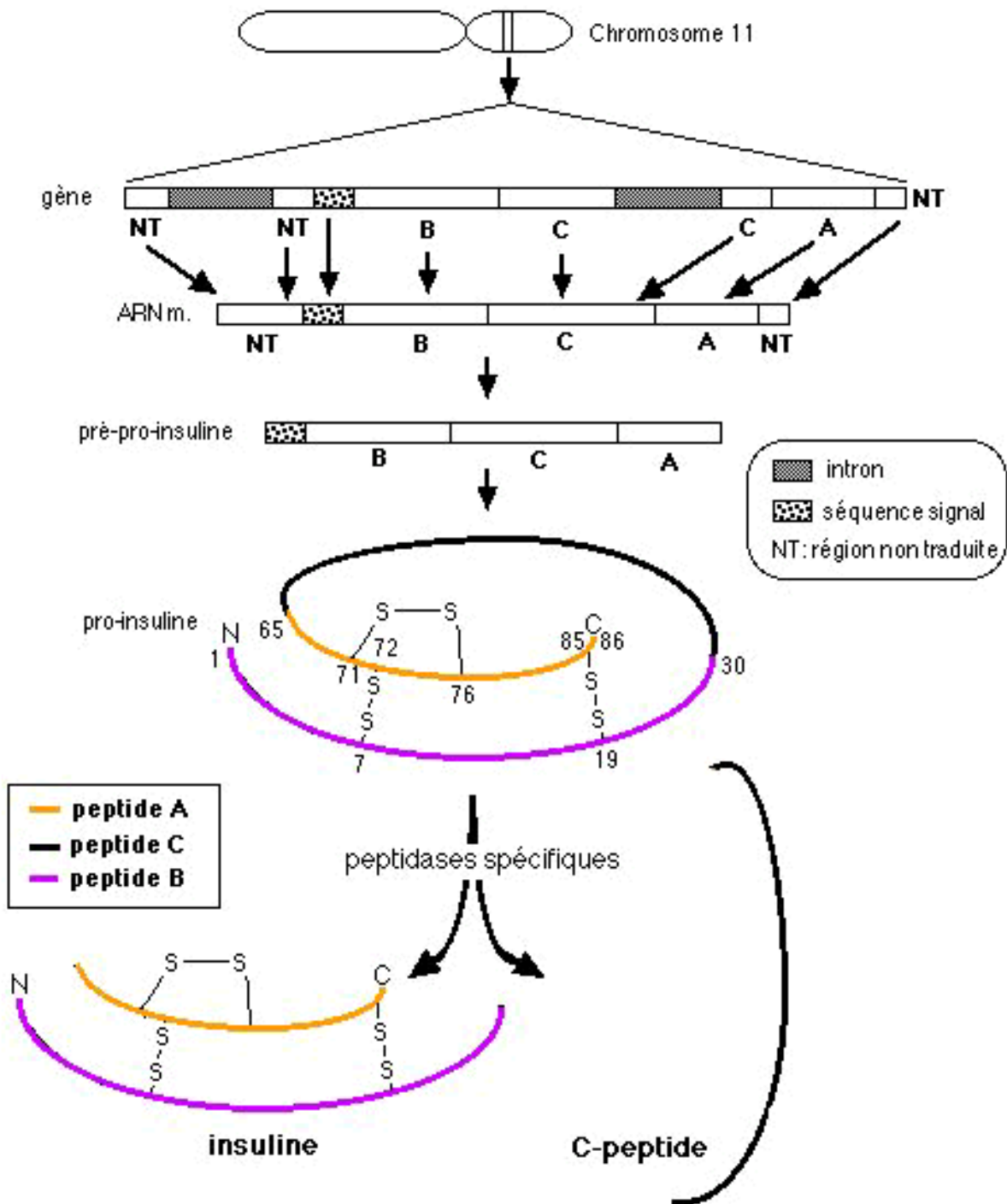


Figure 1 : Etapes de la synthèse de l'insuline et structure finale. Elle est synthétisée sous forme de préproinsuline qui subit des clivages séquentiels qui l'amènent à sa structure définitive.

La proinsuline, vraisemblablement liée à des récepteurs, ainsi que des enzymes de coupure, sont transférées à l'intérieur de petites vésicules vers la *citerne cis* de l'appareil de Golgi (**voir figure en annexe**), c'est-à-dire le pôle le plus proche. La partie extrême de cette citerne bourgeonne. Elle constitue des vésicules qui vont migrer selon un mode de transport régulé et rejoindre la *citerne trans*, située au pôle le plus éloigné, pour fusionner avec elle. Les extrémités dilatées sont caractérisées par la présence, à la surface externe de leur membrane, d'une couche de fins filaments composés d'une protéine appelée clathrine que

l'on trouve souvent associée aux membranes cellulaires lorsque celles-ci entrent en mouvement, notamment lors de la formation de vésicules membranaires. Ces extrémités se détachent pour produire les vésicules sécrétoires "épineuses" (ou "recouvertes"), riches en proinsuline. Le contenu est relativement peu dense et occupe tout l'espace limité par la membrane. A l'intérieur de ces vésicules, la proinsuline subit l'attaque des enzymes qui commencent à couper le peptide-c pour former l'insuline. "Ces enzymes de conversion" ont une activité trypsinique et carboxypeptidasique B. Ce processus s'accompagne d'une acidification du contenu vésiculaire et du détachement du revêtement de clathrine. Le deuxième type de vésicules sécrétoires apparaît. Elles sont donc dépourvues de clathrine, plus nombreuses et dispersées dans tout le cytoplasme. Leur contenu très dense est séparé de la membrane par un halo clair. On les appelle vésicules sécrétoires lisses (ou "non recouvertes"). Elles contiennent essentiellement l'insuline et le peptide-c en quantité équivalente et un peu de pro-insuline résiduelle non coupée. Le contenu hormonal des vésicules n'est libéré de la cellule B que lorsque celle-ci est stimulée par un signal approprié, en l'occurrence une augmentation de la concentration en glucose sanguin. Cependant, **toute l'insuline synthétisée n'est pas sécrétée**, constituant un pool de base. Certaines vésicules lisses, lors de la migration vers la membrane cellulaire, rencontrent des lysosomes, organites de dégradation cytoplasmique, qui détruisent l'insuline. Les cellules B ne libèrent l'insuline dans le sang qu'après avoir franchi la barrière formée par les membranes imperméables : la membrane limitant la vésicule sécrétoire s'approche de la membrane cellulaire, entre en contact, puis fusionne avec elle. Par ce mécanisme dit d'exocytose, l'insuline quitte la cellule, passe dans les capillaires sanguins et se distribue par la circulation pour agir sur les divers organes cibles.

La sécrétion d'insuline s'établit selon deux modes : continu pour maintenir un taux **basal** d'insuline circulante et **stimulé** en réponse à un signal tel que l'absorption d'aliments. Ce deuxième mode est biphasique : tout d'abord une phase précoce liée à la libération de l'insuline stockée puis une phase tardive, post prandiale, correspondant à la libération de l'insuline nouvellement synthétisée.

SECRETION ET REGULATION

La production de l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas est étroitement coordonnée à celle du glucagon par les cellules α . La régulation du taux relatif de l'insuline et du glucagon contrôle l'appétit du foie à maintenir, à un niveau constant, l'approvisionnement en glucose des tissus périphériques. La production de l'insuline par les cellules β répond à une variété de stimuli à savoir le glucose, les acides aminés, les hormones gastro-intestinales et le glucagon.

- Le glucose est le stimulus le plus important pour la production de l'insuline et auquel les cellules β sont les plus sensibles chez les animaux. Un repas riche en glucides élève la sécrétion de l'insuline et diminue celle du glucagon.
- Les acides aminés, résultant de l'hydrolyse des protéines d'un repas, entraînent une sécrétion accrue de l'insuline. L'acide aminé qui se comporte comme le stimulus le plus efficace est l'arginine.
- Les hormones gastro-intestinales contribuent aussi à l'augmentation de la

sécrétion de l'insuline à la suite d'un repas. Elles ont un rôle d'anticipation, déclenchant la sécrétion de l'insuline avant l'effet de l'élévation sanguine en glucose. Ceci permet d'expliquer pourquoi on observe une sécrétion d'insuline plus importante lorsqu'une même quantité de glucose est administrée par voie orale que par voie veineuse.

- Le glucagon voit sa sécrétion inhibée par le glucose pendant que ce dernier stimule celle de l'insuline. On en conclut que la sécrétion de l'insuline inhibe celle du glucagon, ce qui constitue un contrôle du glucagon par l'insuline. Dans le cas du diabète du type 1, plusieurs symptômes de la maladie seraient le fait des effets métaboliques incontrôlés du glucagon, suite à la non sécrétion de l'insuline.

La synthèse et la sécrétion de l'insuline sont inhibées en l'absence de substrats énergétiques et en cas de traumatisme. Dans ce dernier cas, le contrôle du métabolisme énergétique est récupéré par l'adrénaline sécrétée par la médullosurrénale, en réponse au stress ou au traumatisme.

EFFETS METABOLIQUES

Les effets de l'insuline sont multiples car ils concernent à la fois le métabolisme (anabolisme) des trois familles de nutriments : glucides, lipides et protéides essentiellement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle (**figure 2**).

- **Au niveau glucidique**, sa principale activité est de favoriser l'entrée du glucose dans les cellules des tissus insulinosensibles. Au niveau de ses cellules cibles, cette hormone facilite la pénétration du glucose dans le cytoplasme en augmentant la perméabilité de leur membrane au moyen d'un recrutement de récepteurs au glucose GLUT4. L'insuline stimule l'enrichissement de la membrane plasmique en transporteurs GLUT4. Pour cela, des vésicules contenant les transporteurs fusionnent avec la membrane. Une autre hormone d'origine intestinale, le GLP-1, est également capable d'augmenter le nombre de récepteurs GLUT4 (et GLUT 1) sur les adipocytes, du moins in vitro. De façon moins marquante, l'insuline inhibe aussi l'endocytose de GLUT4.

- **Au niveau des cellules hépatiques**, l'insuline **stimule la glycogénèse** c'est-à-dire le stockage du glucose sous forme de glycogène dont elle inhibe la dégradation par stimulation de l'activité glycogène synthase.

L'insuline stimule l'utilisation du glucose par la glycolyse ou son oxydation par la voie des pentoses-phosphate et s'oppose à la fabrication de glucose à partir d'acides aminés glucoformateurs (néoglucogénèse) et à la sortie du glucose du foie. Cette hormone inhibe la production du glucose en diminuant la glycogénolyse par inhibition de la glycogène phosphorylase.

- **Au niveau des cellules musculaires**, l'insuline **favorise le transport membranaire** et la **conversion du glucose en glycogène** par activation de la glucose 1 phosphate uridyl transférase, de la voie des pentoses et du cycle de Krebs. La stimulation de la sécrétion d'insuline est sous le contrôle principal des enzymes **glucokinase** (GK) et glucose 1,6 di phosphatase métabolisant les hexoses. La glucokinase joue un rôle prépondérant à ce niveau: des souris transgéniques exprimant plusieurs copies du gène de

la GK ont une glycémie diminuée alors que les humains atteints de MODY-2 possédant moins de gènes fonctionnels sont hyperglycémiques. La production d'insuline chez les animaux transgéniques "multi-GK" est cependant réduite car il y a compensation hépatopancréatique: alors que le foie peut utiliser plus facilement le glucose, la sécrétion d'insuline diminue, ce qui a pour effet de contrer la pénétration du glucose et de maintenir la glycémie à un taux certes inférieur de 20 à 30 % à celui des animaux normaux, mais qui reste acceptable. La glucokinase apparaît donc bien comme une enzyme clef de la régulation de l'activité des cellules B. Les oses non métabolisés par son entremise comme le galactose, le ribose ou le xylose sont sans effets sur la cellule B. Les acides aminés lysine et alanine constituent également deux puissants sécrétagogues insuliniques. Il faut ajouter à cette liste une stimulation nerveuse, vagale (que l'on peut bloquer par l'atropine) et par le glucagon son antagoniste. La présence de NO synthase et d'hème oxygénase dans les cellules endocrines insulaires laisse également entrevoir une action possible, paracrine ou neurocrine, du NO ou du CO comme modulateurs des sécrétions hormonales pancréatiques (en agissant peut être sur l'activité de la guanylyl cyclase).

- **Au niveau lipidique**, l'insuline exerce une action anti-lipolytique en diminuant la libération des acides gras libres et du glycérol du tissu adipeux. Ce tissu se révèle particulièrement sensible à l'action de cette hormone, qui y exerce ces effets avec des concentrations plasmatiques de 7 à 10 fois inférieures à celles nécessaires à ses autres actions.

Dans les adipocytes, elle favorise la captation des triglycérides en augmentant l'activité de la lipoprotéine lipase et augmente la synthèse de ces derniers à partir du glucose ou de l'acétate. L'entrée des lipoprotéines sériques dans ces cellules est également stimulée par l'insuline.

Cette hormone favorise, au niveau hépatique, la synthèse des acides gras libres et l'estérification des triglycérides. Enfin, elle agit comme régulateur de la concentration des corps cétoniques circulant en diminuant leur libération par le tissu adipeux et l'oxydation des acides gras libres et de l'acétyl CoA et en augmentant la consommation des corps cétoniques au niveau musculaire.

- **Au niveau protéidique**, L'insuline est responsable de du maintien de la balance azotée. Elle exerce son action anabolique au niveau musculaire et hépatique selon deux voies :

- stimulation de la synthèse protéique à partir d'acides aminés plasmatiques (effets dépendant de l'AMP cyclique)
- inhibition du catabolisme protéique (diminution de la synthèse d'urée) et de la gluconéogénèse à partir d'acides aminés glucoformateurs.

Par ses effets anaboliques l'insuline permet la reconstitution des réserves du glycogène dans le foie et dans les muscles squelettiques, et la conversion des excès du glucose et des acides gras en triacylglycérols en vue de leur stockage dans le tissu adipeux. En plus de ces effets anaboliques, l'insuline joue un rôle de **facteur de croissance** : elle stimule la prolifération des cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin humain (jejunum et colon) au cours de l'embryogénèse. Pendant la croissance, l'insuline agit en

stimulant la formation de somatomédines, polypeptides de faible poids moléculaires, médiateurs de l'effet de l'hormone de croissance. Certaines de ces somatomédines stimulent la prise de sulfate par le cartilage et possèdent de plus un effet insulinique sur le tissu adipeux et le muscle. Elles ont été nommées IGF 1 et 2 (Insulin Growth Factor). Elles ont été suspectées d'intervenir dans le déclenchement de certains cancers du côlon.

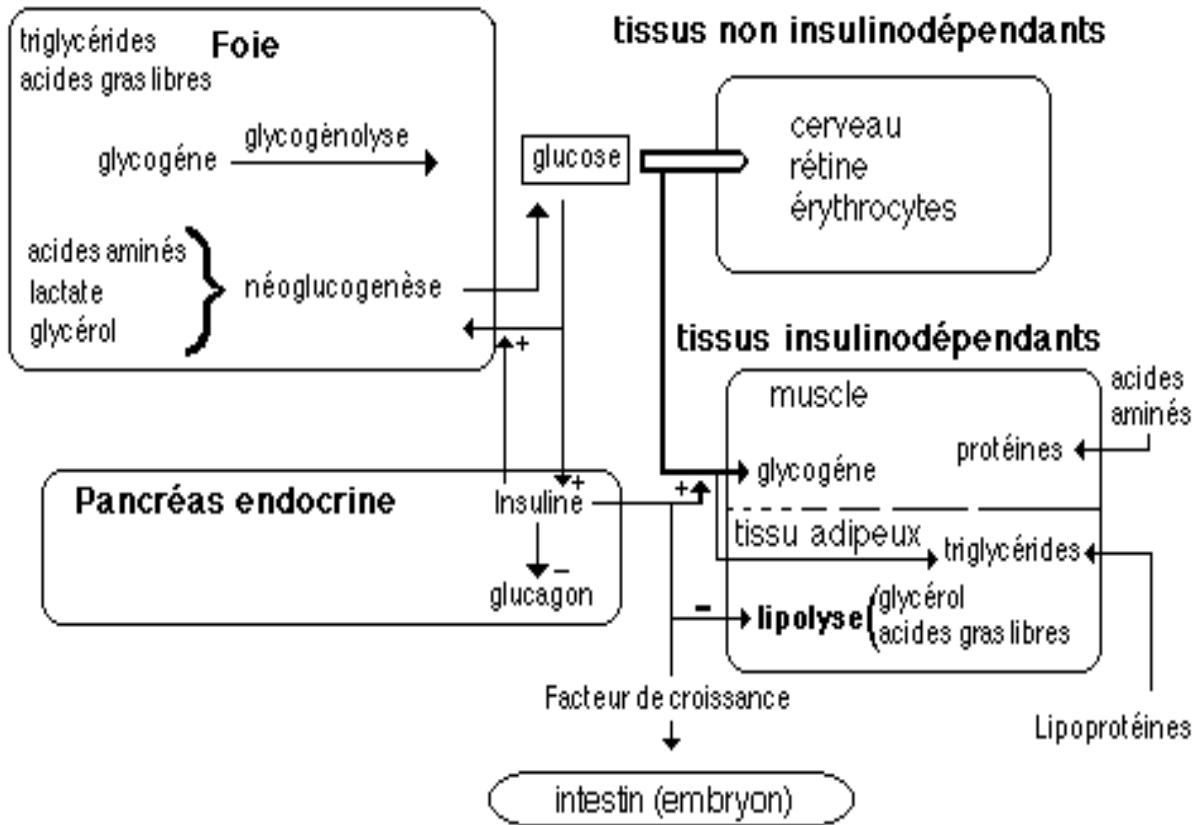


Figure 2 : Influence de l'insuline sur différents tissus

MECANISME D'ACTION

L'insuline, une fois libérée, va se lier aux membranes des cellules-cibles qui possèdent des récepteurs spécifiques transmembranaires du type catalytique. Chaque récepteur a deux domaines (**figure 3**) :

- un premier domaine extracellulaire qui fixe l'insuline (ligand) ;
- un second domaine intracellulaire, lié à l'activité **tyrosine kinase**.

La fixation de l'insuline, à son récepteur, active l'activité **tyrosine kinase** intrinsèque, qui phosphoryle des tyrosines spécifiques au niveau des sous-unités □ du récepteur (autophosphorylation) avant de phosphoryler les résidus tyrosine des protéines cibles. Des phosphorylations en cascade sont initiées au niveau intracellulaire portant sur les groupes hydroxyles des sérines des enzymes ou protéines cibles.

L'un des effets intracellulaires de l'insuline est l'activation par phosphorylation d'une **protéine phosphatase**. Cette dernière, une fois activée, active ou inhibe, à son tour, par déphosphorylation, certaines enzymes-clés ou protéines phosphorylées par la **protéine kinase A**, annihilant ainsi les effets antérieurs du glucagon ou de l'adrénaline. On comprend ainsi les effets antagonistes entre l'insuline d'une part et les autres hormones d'autre part, intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique.

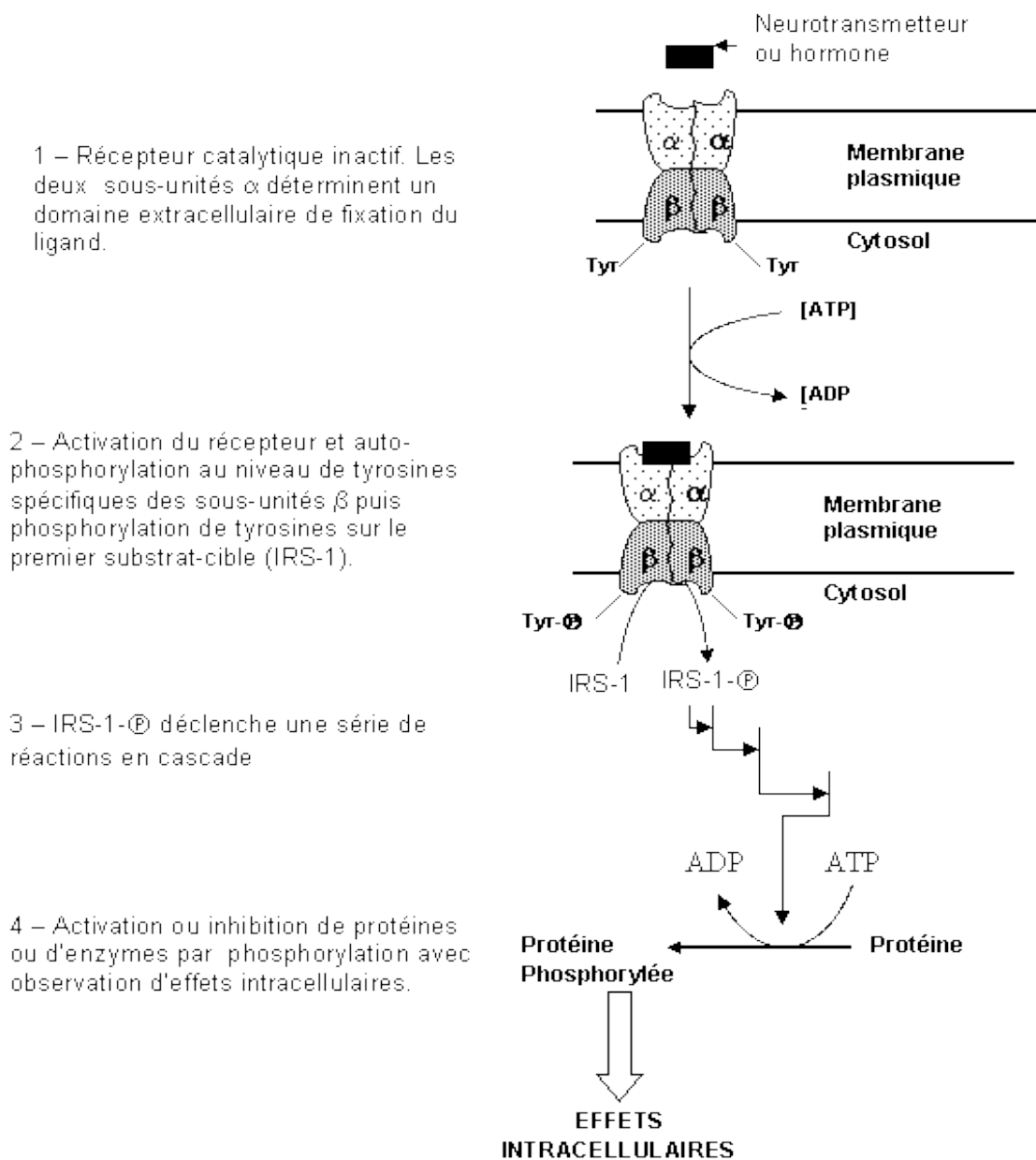


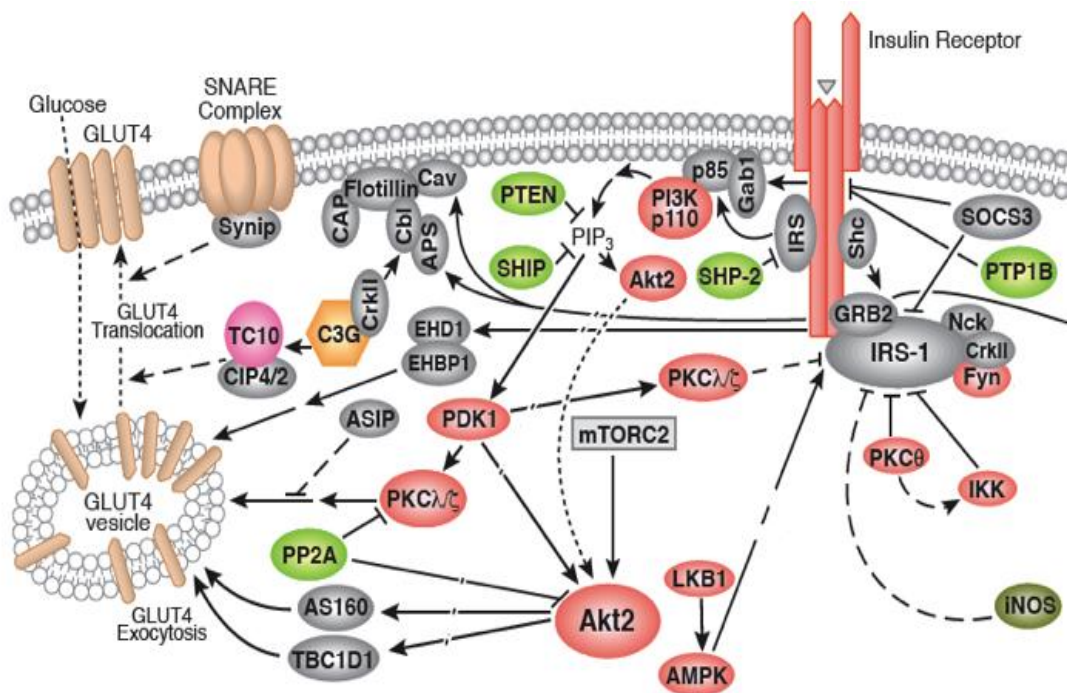
Figure 3 : Mécanisme d'action de l'insuline : La formation du complexe récepteur-insuline active une protéine kinase tyrosine-spécifique qui assure une autophosphorylation du récepteur avant de phosphoryler le premier substrat cible intracellulaire. Des réactions de phosphorylation en cascade conduisent à des effets intracellulaires.

Dans une cellule non stimulée ou quand la concentration en insuline est faible, le transporteur insulino-dépendant du glucose GLUT4 est localisé dans des vésicules de stockage des cellules hépatiques et musculaires.

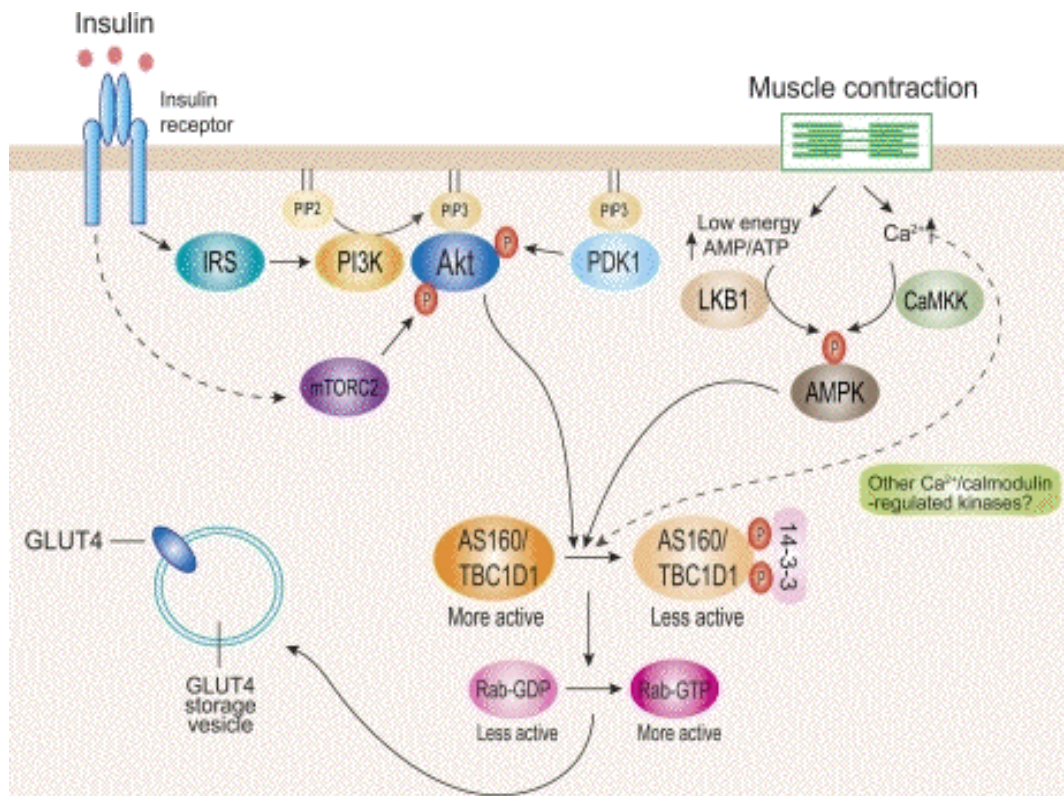
Ces vésicules doivent fusionner avec la membrane plasmique avant que le glucose ne pénètre dans la cellule.

Quand le niveau de glucose circulant est élevé, l'insuline est libérée par les îlots de Langerhans et elle facilite la mobilisation du glucose via une augmentation de la synthèse et de la translocation de GLUT4 des compartiments endosomiques vers la membrane plasmique. L'absorption du glucose augmente.

- L'insuline se fixe sur son récepteur ce qui active le domaine tyrosine kinase du récepteur.
- Le récepteur recrute IRS-1 ("Insulin Receptor Substrate") en le phosphorylant.
- Via sa Tyr phosphorylée, IRS-1 se fixe à son tour sur le domaine SH2 de la kinase PI3 ("phosphatidylinositide 3-kinase" - PI3K). **(figure 4 et 5)**
- PI3K transforme le lipide membranaire PIP2 en PIP3.
- PIP3 est spécifiquement reconnu par les protéines kinases PDK1 et Akt2 ("3-phosphoinositide dependent protein kinase-1") : PDK1 phosphoryle et active Akt2.
- Akt2 phosphoryle à son tour TBC1D1 ("TBC1 domain family member 1" - Thr 596) et AS160 ("Akt substrate of 160 kDa" - Thr 642). Cela a pour conséquence d'inhiber le domaine activateur de l'activité GTPase ("GTPase-activating domain" - GAP) de TBC1D1 et de AS160, domaine dont le rôle est d'augmenter l'hydrolyse du GTP par les protéines Rab.



- L'étude du phosphoprotéome (ensemble des protéines phosphorylées) a montré qu'il est probable que l'interaction de protéines 14-3-3 avec AS160 et TBC1D1 contribue à cet effet inhibiteur de leur potentiel [activateur de l'activité GTPase de Rab] et contribue ainsi à la régulation des besoins en glucose.
- L'inhibition des domaines GAP de [TBC1D1 / AS160] contribue donc à une activité GTPase diminuée de Rab, qui est donc plus chargé en GTP qu'en GDP. Or Rab est plus actif sous la forme Rab-GTP que sous la forme Rab-GDP.
- La forme active Rab-GTP participe à la translocation des vésicules de stockage de GLUT4 et à la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique. Ainsi la concentration de GLUT4 sur la membrane plasmique est augmentée.



A la surface de la cellule, GLUT4 facilite la diffusion du glucose dans le sens de son gradient de concentration dans les cellules du foie et du muscle.

Une fois dans les cellules, le glucose est rapidement phosphorylé par la glucokinase dans le foie et par l'hexokinase dans les autres tissus pour former le glucose-6-phosphate qui alimente la glycolyse ou qui est polymérisé en glycogène.

L'Appareil de Golgi

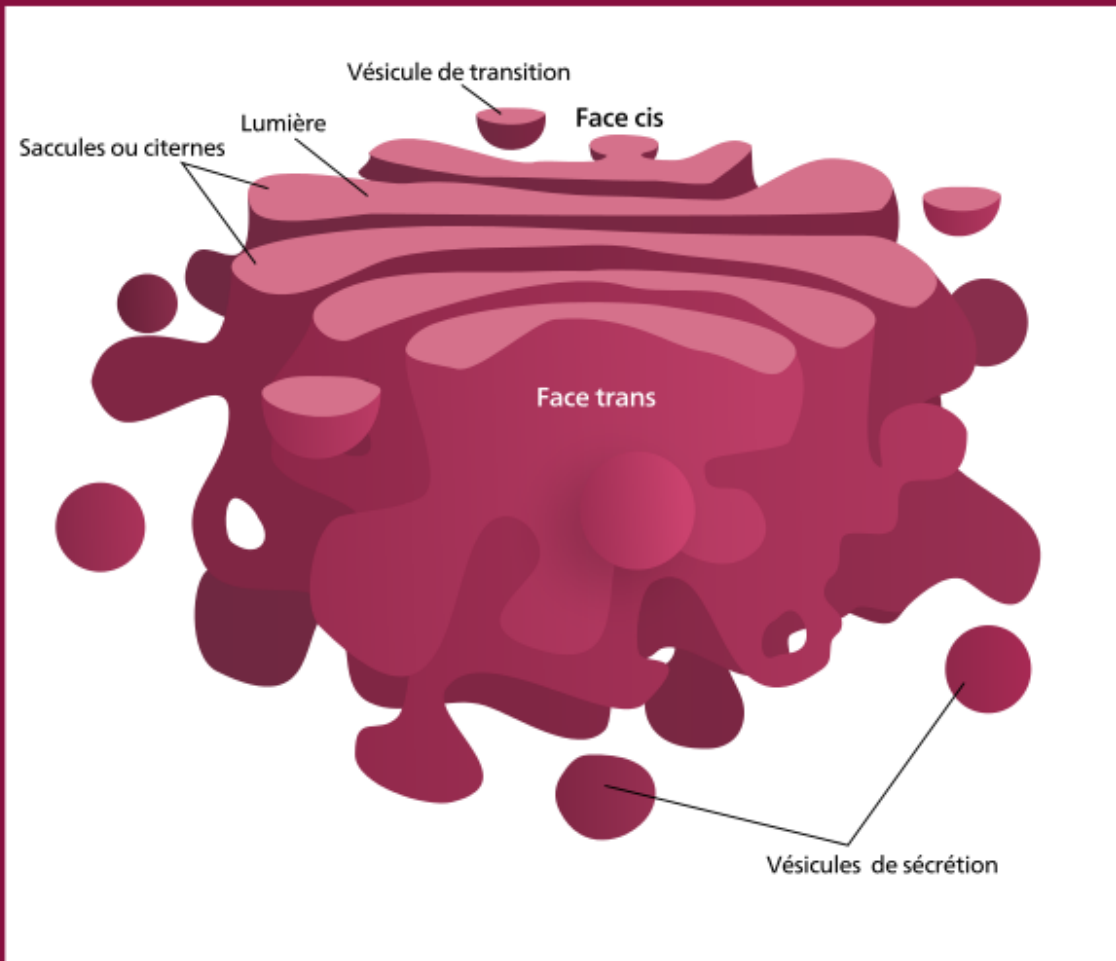


Figure Annexe : structure de l'appareil de Golgi

L'**appareil de Golgi** est un organelle des cellules eucaryotes. Il joue un rôle majeur dans le processus de libération de larges biomolécules à travers la membrane, puisqu'il fait l'intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Il est unique dans une cellule et régule le transport vésiculaire et se charge de modifier les protéines par glycosylation, sulfatation, etc.

Il est composé de deux faces : le site *cis*, face d'entrée des protéines sécrétées par le réticulum et le site *trans*, face de sortie des vésicules.