

Devenir de l'insuline captée par le foie de rat *in vivo*. Evidence biochimique en faveur d'une internalisation de l'hormone et de son récepteur

B. DESBUQUOIS, J. WILLEPUT, Henriette BURLET, Brigitte de GALLÉ

*INSERM, U. 30, Hôpital des Enfants-Malades,
149, rue de Sèvres, 75015 Paris.*

Summary. *Fate of insulin taken up by rat liver in vivo. Biochemical evidence for the internalization of ligand and receptor.*

Rat liver homogenates prepared various times after injection of ^{125}I -insulin (10 pmol) or native insulin (50 nmol) have been quantitatively fractionated by differential and linear density gradient centrifugation in sucrose solutions. 15 sec after injection of ^{125}I -insulin, about 55 % of the radioactivity in the homogenate was recovered in the microsomal fraction ; the remaining radioactivity was associated with the nuclear fraction (15 %) and the supernatant (30 %). Within the first 4 min, the radioactivity decreased in the microsomal fraction (maximum : 80 % at 90 sec), while it became negligible in the nuclear fraction. Later, it progressively decreased in the microsomal fraction and concomitantly increased in the supernatant (10 and 60 %, respectively, at 16 min) ; it also diminished slightly in the mitochondrial-lysosomal fraction (10 % at 16 min). The radioactivity associated with the microsomal fraction on density gradients was progressively shifted from the area of the plasma membrane marker, alkaline phosphodiesterase, to that of the Golgi marker, galactosyltransferase (median density : about 1.17, 1.14 and 1.11 at 15 sec, 90 sec and 8 min, respectively). A comparable, less marked shift of insulin binding sites in the microsomal fraction also occurred following injection of native insulin ; it was detectable at 4 min and persisted up to 40 min (median density : about 1.16-1.17 in control rats and 1.15-1.16 in insulin-injected rats). It is concluded that, after formation of insulin-receptor complexes in rat liver, both insulin and its receptors undergo a time-dependent translocation ; this translocation affects the receptors less than the ligand. Plasma membranes and Golgi elements might be sequentially involved in this process.

Introduction.

Le devenir de l'insuline après liaison à ses récepteurs dans l'hépatocyte de rat a été étudié à l'aide d'un ligand marqué par l'iode 125 par deux approches distinctes, mais complémentaires : l'une, morphologique, faisant appel à l'autoradiographie associée à la microscopie électronique ; et l'autre, biochimique, utilisant le fractionnement subcellulaire. Les études morphologiques, conduites sur des hépatocytes fraîchement isolés (Gorden *et al.*, 1978 ; Carpentier *et al.*,

1979 a) et sur le foie intact après injection d'insuline *in vivo* (Carpentier *et al.*, 1979 b ; Bergeron *et al.*, 1979), ont montré que l'hormone s'associait d'abord à la membrane plasmique, puis migrerait vers les lysosomes ou des structures vésiculaires de type lysosomal ; dans l'une de ces études (Bergeron *et al.*, 1979), une association de l'insuline à des éléments de l'appareil de Golgi a été observée. L'approche biochimique, conduite uniquement sur le foie intact (Desbuquois *et al.*, 1979 ; Posner *et al.*, 1980) a mis en évidence une association séquentielle de l'insuline aux membranes plasmiques et à des sous-fractions microsomales de faible densité dérivant de l'appareil de Golgi ; de plus, dans l'une de ces études (Posner *et al.*, 1980), la radioactivité présente dans les sous-fractions microsomales était présente dans des éléments morphologiquement identifiables du Golgi. L'approche biochimique a également permis de montrer qu'après injection d'insuline native à dose élevée, le nombre des récepteurs de l'hormone diminuait dans les membranes plasmiques et augmentait dans les fractions Golgi (Desbuquois *et al.*, 1979) ; cette observation a été attribuée à une translocation des récepteurs accompagnant celle du ligand.

Dans le travail présent, les observations biochimiques antérieures sur le devenir des complexes insuline-récepteur dans le foie de rat *in vivo* (Desbuquois *et al.*, 1979 ; Posner *et al.*, 1980) ont été réévaluées au moyen de techniques analytiques. L'approche expérimentale employée, classique, a consisté à comparer, en centrifugation différentielle et en centrifugation en gradient de densité, la distribution subcellulaire de l'insuline et de ses récepteurs à celle de marqueurs enzymatiques représentatifs des principaux organelles de la cellule. L'avantage de cette approche est de permettre une récupération quantitative des complexes insuline-récepteur présents dans l'homogénat initial.

Protocole expérimental.

Des rats mâles, à jeûn depuis 12 h, ont été sacrifiés différents temps après injection d'insuline- I^{125} (5 pmol/100 g de poids) ou d'insuline native (25 nmol/100 g de poids) dans la veine du pénis. Le foie a été prélevé et immédiatement homogénéisé dans une solution de saccharose 0,25 M. Les homogénats ont été quantitativement fractionnés par centrifugation différentielle comme décrit par Aronson et Touster (1974). Les fractions isolées ont été, par ordre croissant de g.min : la fraction nucléaire, la fraction mitochondriale-lysosomale, la fraction microsomale (incluant la « fluffy layer », couche de membranes adhérant faiblement à la surface du culot mitochondrial) et le surnageant post-microsomal. La fraction microsomale a été fractionnée par centrifugation en gradient linéaire de densité selon une modification de la technique de Beaufay *et al.* (1974). Dans chaque fraction (ou sous-fraction) ont été déterminées la radioactivité (après traitement par l'insuline- I^{125}) ou la liaison de l'insuline- I^{125} *in vitro* (après traitement par l'insuline native), les protéines et plusieurs enzymes de référence. Ces derniers ont inclus la phosphodiesterase alcaline I (marqueur de la membrane plasmique), la galactosyltransférase (marqueur du Golgi), la phosphatase acide (marqueur des lysosomes) et la glucose-6-phosphatase (marqueur du réticulum endoplasmique). Pour chacun des constituants, les résultats ont été exprimés en pourcentages de

l'activité totale récupérée dans les fractions ou sous-fractions obtenues à partir de l'homogénat ou des microsomes, respectivement. Dans les techniques de gradient de densité, la densité médiane des constituants a été déterminée comme décrit par Beaufay *et al.* (1974).

Résultats.

Distribution subcellulaire des enzymes de référence et de l'activité de liaison de l'insuline in vitro. — La distribution subcellulaire des enzymes de référence est comparable à celle décrite antérieurement par d'autres auteurs, notamment par Aronson et Touster (1974) et par Amar-Costesec *et al.* (1974). En centrifugation différentielle, la phosphodiesterase alcaline I se distribue à peu près également entre la fraction nucléaire et la fraction microsomale ; la phosphatase acide est présente dans la fraction mitochondriale-lysosomale et, en moindre quantité, dans la fraction microsomale ; la glucose-6-phosphatase est retrouvée principalement dans cette dernière fraction (tabl. 1). En centrifugation en gradient de densité, les densités médianes de ces enzymes décroissent dans l'ordre glucose-6-phosphatase > phosphatase acide > phosphodiesterase alcaline I > galactosyl-transférase (fig. 2).

TABLEAU 1

Distribution des protéines, de plusieurs enzymes de référence et des récepteurs de l'insuline dans les fractions subcellulaires hépatiques préparées par centrifugation différentielle

Constituant	N	ML	P	S
Protéines	12,0	22,7	23,3	42,0
Phosphodiesterase alcaline I	43,8	4,5	47,4	4,2
Phosphatase acide	1,8	58,7	27,0	12,5
Glucose-6-phosphatase	2,9	3,3	81,4	12,4
Récepteurs de l'insuline	17,9	3,4	78,6	

Les résultats sont exprimés, pour chaque constituant, en pourcentage de l'activité totale récupérée. Ils sont la moyenne d'au moins trois expériences. N désigne la fraction nucléaire ; ML, la fraction mitochondriale-lysosomale ; P, la fraction microsomale ; et S, le surnageant.

La distribution subcellulaire des sites de liaison de l'insuline en centrifugation différentielle rappelle celle de la phosphodiesterase alcaline I, mais ne lui est pas exactement superposable (tabl. 1). Comme déjà observé par d'autres auteurs, les sites de liaison sont au moins trois fois plus abondants dans la fraction microsomale que dans la fraction nucléaire. Par contre, en gradient de densité (fig. 3), les sites de liaison sont retrouvés à peu près à la même position que la phosphodiesterase alcaline.

Cinétique de fixation injectée sur le foie de l'insuline-¹²⁵I. — L'injection d'insuline-¹²⁵I est suivie d'une fixation rapide de la radioactivité sur le foie. Cette fixation est maximale de 90 s à 4 min après l'injection (environ 5 % de la dose

injectée par g de poids frais) ; elle décroît à 40 % de cette valeur à 8 min, et à 10 % à 16 min. Au cours des premières minutes, la fixation de la radioactivité à la fraction particulaire totale est inhibée d'au moins 85 % par l'injection simultanée d'insuline native à la dose de 25 nmol/100 g de poids, observation suggérant la nature saturable des sites de fixation. Aux temps précoces (15 et 90 s), au moins 90 % de la radioactivité présente dans l'homogénat est précipitable par l'acide trichloroacétique, mais à des temps plus tardifs ce pourcentage décroît rapidement (environ 80 % à 4 min et 40 % à 16 min). En gel filtration sur Sephadex G 50 ou G 75, l'insuline dégradée migre en grande partie à la même position que la monoiodotyrosine.

Distribution subcellulaire de la radioactivité associée au foie après injection d'insuline- 125 I. — Les résultats du fractionnement utilisant la centrifugation différentielle sont montrés sur la figure 1. Immédiatement après l'injection (15 s), environ 55 % de la radioactivité sont associés à la fraction microsomale, et 15 % à la fraction nucléaire ; le restant est retrouvé dans le surnageant. Si l'on exclut la radioactivité présente dans ce dernier, la distribution rappelle celle des sites de liaison de l'insuline *in vitro* (tabl. 1). Pendant les premières minutes, la radioactivité croît dans la fraction microsomale (maximum, 80 % à 90 s) et décroît dans la fraction nucléaire et le surnageant. Au-delà de 4 min, elle décroît progressivement dans la fraction microsomale et, réciproquement, augmente dans le surnageant ; elle augmente aussi dans la fraction mitochondriale lysosomale, mais à un degré plus modéré. A 16 min, le temps le plus tardif, environ 30, 60 et 10 % de la radioactivité sont associés, respectivement, à ces diverses fractions. Le degré des altérations de l'insuline radioactive associée aux fractions, jugé par le test de précipitation par l'acide trichloroacétique, croît dans l'ordre ; fraction nucléaire < fractions microsomale < surnageant. Ces résultats sont, dans leurs grandes lignes, comparables à ceux récemment rapportés par Izzo *et al.* (1979) et Papachristodoulou *et al.* (1981).

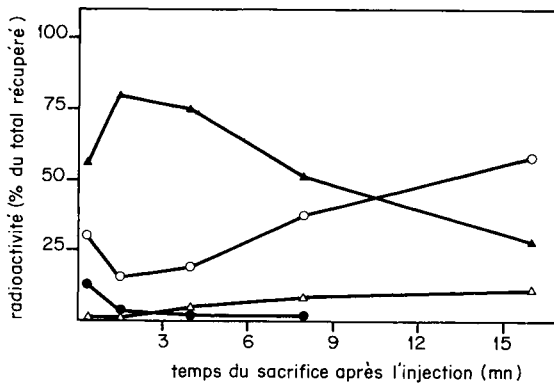


FIG. 1. — Distribution de la radioactivité dans les fractions subcellulaires hépatiques préparées par centrifugation différentielle, différents temps après l'injection d'insuline 125 I. Chaque point expérimental est la moyenne d'au moins trois déterminations. (●), fraction nucléaire ; (Δ), fraction mitochondriale-lysosomale ; (▲), fraction microsomale ; (○), surnageant.

L'analyse de la radioactivité associée à la fraction microsomale par centrifugation en gradient de densité permet d'individualiser deux composants : l'un, mineur, dont la densité apparente est élevée et indépendante du temps écoulé depuis le sacrifice ; et l'autre, majeur, dont la densité est plus faible et décroît avec ce laps de temps (fig. 2). Aux temps 15 s, 90 s et 8 min, la densité médiane du composant majeur est, respectivement, d'environ 1,17, 1,14 et 1,11. A 15 s, ce composant est situé dans la région de la phosphodiesterase alcaline I ; plus tardivement, il coïncide plutôt avec la galactosyltransférase.

Distribution subcellulaire des sites de liaison de l'insuline associés à la fraction microsomale après injection d'insuline native. — Comme on peut le voir sur la figure 3, l'injection d'insuline native provoque un déplacement modéré, mais reproductible, des sites de liaison de l'hormone vers les densités légères (densités médianes : environ 1,16-1,17 chez les animaux témoins et 1,15-1,16 après injection d'insuline). Ce déplacement est apparent dès 4 min après l'injection et persiste au moins 40 min. Il ne s'accompagne pas de modifications du nombre total des sites de liaison dans la fraction microsomale.

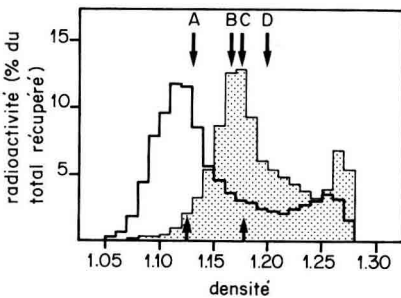


FIG. 2.

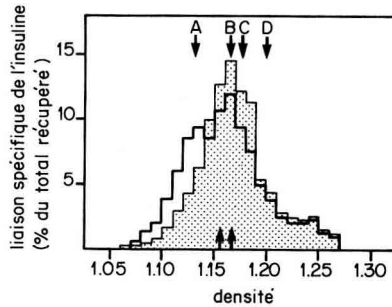


Fig. 3.

FIG. 2. — Profil de distribution de la radioactivité associée à la fraction microsomale après centrifugation en gradient de densité, aux temps 15 s (histogramme hachuré) et 4 min (histogramme non hachuré). Les flèches en bas indiquent les densités du matériel associé à la radioactivité dans ces deux cas. Les flèches en haut indiquent les densités médianes de différents enzymes de référence : galactosyltransférase (A), phosphodiesterase alcaline I (B), phosphatase acide (C) et glucose-6-phosphatase (D).

FIG. 3. — Profil de distribution des sites de liaison de l'insuline associés à la fraction microsomale chez des animaux témoins (histogramme hachuré) et chez des animaux sacrifiés 8 min après injection de 25 nmol/100 g de poids d'insuline native (histogramme non hachuré). Les flèches en bas indiquent les densités médianes des sites de liaison dans les deux conditions expérimentales. Les flèches en haut indiquent celles des marqueurs enzymatiques de référence (voir légende de la fig. 2).

Discussion.

Les résultats de ce travail confirment et étendent les résultats des études antérieures sur le devenir de l'insuline dans le foie de rat *in vivo*, effectuées à l'aide de techniques préparatives de fractionnement (Desbuquois *et al.*, 1979 ;

Posner *et al.*, 1980). La comparaison du profil de distribution de la radioactivité à celui des enzymes de référence est compatible avec une association préférentielle de cette dernière à la membrane plasmique immédiatement après l'injection, et à des éléments du Golgi quelques minutes plus tard. En outre, le profil de distribution en centrifugation différentielle aux temps tardifs (8 et 16 min) est compatible avec une association partielle de la radioactivité aux lysosomes ; cependant cette association n'intéresse pas plus de 10 % de la radioactivité totale présente dans l'homogénat. Les lysosomes étant généralement considérés comme le site ultime d'accumulation des ligands protéiques internalisés, ces résultats s'expliquent probablement par la dégradation rapide de l'insuline à leur niveau.

L'étude du profil de distribution des récepteurs de l'insuline en gradient analytique de densité montre que leur occupation par l'hormone *in vivo* diminue d'une manière modérée, mais reproductible, leur densité médiane ; cette observation étend les résultats d'études antérieures, utilisant des techniques préparatives (Desbuquois *et al.*, 1979). Cependant, il convient de remarquer que le déplacement des récepteurs vers les densités légères est de degré plus faible que celui de l'insuline (fig. 2 et 3). Cette observation s'explique peut-être, au moins en partie, par le fait que les récepteurs hépatiques de l'insuline ne sont pas accessibles dans leur totalité à l'hormone *in vivo*, et que seuls les récepteurs occupés sont internalisés. Une autre explication pourrait être le fait que le devenir du récepteur internalisé ne coïncide pas, au-delà d'une certaine étape, avec celui du ligand.

Conclusion.

Après formation du complexe insuline-récepteur dans l'hépatocyte de rat, tant le ligand que le récepteur subissent une translocation. Cette dernière affecte à degré plus important le ligand que le récepteur. Les structures subcellulaires impliquées séquentiellement dans ce processus proviennent, probablement, de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi.

8^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Tours, 12-13 mai 1982.

Remerciements. — Les auteurs remercient Monsieur le Dr R. Wattiaux et Madame S. Wattiaux de Coninck de leurs conseils et de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Références

- AMAR-COSTESECC A., BEAUFAY H., WIBO M., THINES-SEMPOUX D., FEYTMANS E., ROBBI M., BERTHET P., 1974. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. II. Preparation and composition of the microsomal fraction. *J. Cell Biol.*, **61**, 201-212.
- ARONSON N. N., TOUSTER O., 1974. Isolation of rat liver plasma membrane fragments in isotonic sucrose. *Methods Enzymol.*, **31**, 90-102.
- BEAUFAY H., AMAR-COSTESECC A., THINES-SEMPOUX D., WIBO M., ROBBI M., BERTHET J., 1974. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. III. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients. *J. Cell Biol.*, **61**, 213-231.

- BERGERON J. J. M., SIKSTROM R., HAND A. R., POSNER B. I., 1979. Binding and uptake of ^{125}I -insulin to rat liver hepatocytes and endothelium. An *in vivo* radioautographic study. *J. Cell Biol.*, **80**, 427-443.
- CARPENTIER J. L., GORDEN P., FREYCHET P., LE CAM A., ORCI L., 1979 a. Lysosomal association of internalized ^{125}I -insulin in isolated rat hepatocytes. *J. clin. Invest.*, **63**, 1249-1261.
- CARPENTIER J. L., GORDEN P., BARRAZONE P., FREYCHET P., LE CAM A., ORCI L., 1979 b. Intracellular localization of ^{125}I -labeled insulin in hepatocytes from intact rat liver. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2803-2807.
- DESBUQUOIS B., WILLEPUT J., HUET DE FROBERVILLE A., 1979. Receptor-mediated internalisation of insulin in intact rat liver. *FEBS Lett.*, **106**, 338-344.
- GORDEN P., CARPENTIER J. L., FREYCHET P., LE CAM A., ORCI L., 1978. Intracellular translocation of iodine 125-labeled insulin : direct demonstration in isolated hepatocytes. *Science*, **200**, 782-785.
- IZZO J. L., RONCONE A. M., HELTON D. L., ISSO M. J., 1979. Subcellular distribution of intraportally injected ^{125}I -labeled insulin in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 97-109.
- PAPACHRISTODOULOU D. K., BIRBECK M. S. C., SCOTT G. S., THOMAS J. H., 1981. Subcellular distribution of intravenously injected ^{125}I -labeled insulin in rat liver. *Int. J. Biochem.*, **13**, 293-301.
- POSNER B. I., PATEL B., VERMA A. K., BERGERON J. J. M., 1980. Uptake of insulin by plasmalemma and Golgi subcellular fractions of rat liver. *J. biol. Chem.*, **255**, 735-741.
-