

# Implication du compartiment endosomal dans la signalisation cellulaire de l'insuline

Bernard Desbuquois<sup>1</sup> et François Authier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Inserm U1016 et CNRS UMR 8104, Institut Cochin, et Université Paris Descartes, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

<sup>2</sup> Service Information Scientifique et Technique (IST) de l'Inserm, Délégation Régionale Inserm Paris V, 2 rue d'Alésia, 75014 Paris, France

Auteur correspondant : Bernard Desbuquois, [bernard.desbuquois@inserm.fr](mailto:bernard.desbuquois@inserm.fr)

Reçu le 1 juillet 2014

**Résumé** – Le récepteur de l'insuline et les protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline résident dans différents compartiments subcellulaires et se redistribuent à l'intérieur de la cellule après activation. Traditionnellement, l'endocytose du complexe insuline-récepteur, qui relaie la dégradation du ligand et la déphosphorylation du récepteur, est considérée comme un mécanisme atténuant ou arrêtant la transmission du signal. Cependant, plusieurs observations suggèrent que l'endocytose du récepteur et/ou l'association de composants de la signalisation au compartiment endosomal sont aussi impliquées de manière positive dans la signalisation de l'insuline : (1) le récepteur de l'insuline reste transitoirement phosphorylé et activé après internalisation ; (2) en réponse à l'insuline, différentes protéines de signalisation des voies PI3K/Akt et Ras/Raf/Mek/Erk s'associent aux endosomes ou à d'autres compartiments intracellulaires, dans lesquels elles sont phosphorylées et/ou activées ; et (3) la déplétion et/ou la surexpression de protéines impliquées dans la régulation du trafic membranaire et de l'endocytose interfèrent avec la signalisation de l'insuline. Ces observations sont en faveur d'une régulation spatiale et temporelle de la signalisation de l'insuline et renforcent le concept selon lequel, comme pour d'autres récepteurs membranaires ayant une fonction de signalisation, endocytose et signalisation sont fonctionnellement liés.

**Mots clés** : Insuline / récepteur de l'insuline / endosomes / transduction du signal

**Abstract** – Involvement of the endosomal compartment in cellular insulin signaling.

The insulin receptor and insulin signaling proteins downstream the receptor reside in different subcellular compartments and undergo redistribution within the cell upon insulin activation. Endocytosis of the insulin-receptor complex, by mediating ligand degradation and receptor dephosphorylation, is generally viewed as a mechanism which attenuates or arrests insulin signal transduction. However, several observations suggest that insulin receptor endocytosis and/or recruitment of insulin signaling proteins to endosomes are also involved in a positive regulation of insulin signaling: (1) upon internalization, the insulin receptor remains transiently phosphorylated and activated; (2) in insulin-stimulated cells or tissues, signaling proteins of the PI3K/Akt and Ras/Raf/Mek/Erk pathways are recruited to endosomes or other intracellular compartments, in which they undergo phosphorylation and/or activation; and (3) depletion or overexpression of proteins involved in the regulation of membrane trafficking and endocytosis interfere with insulin signaling. These observations support a spatial and temporal regulation of insulin signal transduction and reinforce the concept that, as for other membrane signaling receptors, endocytosis and signaling are functionally linked.

**Key words**: Insulin / insulin receptor / endosomes / signal transduction

## Introduction

Les effets de l'insuline sur le métabolisme et la croissance cellulaires sont relayés par l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) spécifique, qui en recrutant et en phosphorylant deux familles de substrats, les protéines IRS et Shc, déclenche l'activation de deux voies de signalisation majeures : la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt et la voie Ras/Raf/Mek/Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) (Siddle, 2012). Ces voies régulent, par une cascade d'interactions moléculaires et de phosphorylations, l'activité et/ou l'expression de multiples cibles cellulaires. La signalisation de l'insuline est aussi soumise à un contrôle négatif par plusieurs mécanismes, notamment la déphosphorylation du récepteur par la phosphotyrosine protéine phosphatase PTP1B et l'inhibition de son activité catalytique par l'adaptateur moléculaire Grb14.

Plusieurs approches complémentaires, les unes morphologiques (microscopie par immunofluorescence, imagerie de cellules vivantes) et d'autres biochimiques (fractionnement subcellulaire, immunoprécipitation, Western blot) ont montré que les protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline résident dans différents compartiments subcellulaires et se redistribuent de manière réversible lors de leur activation. Protéine membranaire intégrale, le récepteur de l'insuline est associé principalement à la membrane plasmique ; en induisant son autophosphorylation, l'insuline déclenche sa migration dans le plan de la membrane puis son endocytose, principalement par voie dépendante de la clathrine. Dépourvues de domaine transmembranaire, les protéines de signalisation en aval du récepteur se distribuent entre le cytosol, la membrane plasmique et des membranes intracellulaires, et s'associent par des interactions protéine-protéine ou protéine-lipide aux compartiments membranaires lors de leur activation.

La membrane plasmique est généralement considérée comme le site principal impliqué dans la phosphorylation des substrats du récepteur (protéines IRS et Shc) et les étapes initiales d'activation des voies PI3K/Akt et Ras/Raf/Mek/Erk. Il est également admis que l'endocytose du complexe insuline-récepteur, en relayant la dégradation de l'insuline et la déphosphorylation du récepteur dans les endosomes, atténue ou arrête la signalisation. Cependant, plusieurs observations suggèrent que le compartiment endosomal représente aussi une plate-forme importante pour la signalisation de l'insuline, au moins dans certaines cibles cellulaires et pour certaines étapes de signalisation : (1) après activation et internalisation, le récepteur de l'insuline reste transitoirement autophosphorylé et activé ; (2) plusieurs protéines de signalisation sont recrutées

et/ou activées dans les endosomes de manière insulino-dépendante, et dans plusieurs cas la preuve de leur co-localisation avec le récepteur internalisé a été établie ; (3) la déplétion ou la surexpression de protéines impliquées dans la régulation du trafic membranaire et de l'endocytose, notamment la GTPase Rab5 et plusieurs de ses effecteurs, interfèrent avec certaines étapes de la signalisation de l'insuline.

Les premières observations montrant l'implication des endosomes ou de compartiments membranaires intracellulaires dans la signalisation de l'insuline dans les adipocytes et le foie, deux cibles majeures de l'hormone, remontent à la décennie 1990–2000 (Baass *et al.*, 1995 ; Di Guglielmo *et al.*, 1998). Cette revue, sans viser à l'exhaustivité, présente l'état actuel de la question et met l'accent sur quelques développements récents.

## État de phosphorylation et d'activation du récepteur de l'insuline internalisé

Les techniques d'immuno-précipitation après phosphorylation des protéines par le P<sup>32</sup> dans des cellules intactes, et, plus récemment, de Western blot avec des anticorps anti-phosphotyrosine, ont montré qu'au cours de son internalisation dans les adipocytes (Klein *et al.*, 1987 ; Kublaoui *et al.*, 1998), les cellules d'hépatome (Backer *et al.*, 1989), le muscle squelettique (Dombrowski *et al.*, 2000) et le foie (Khan *et al.*, 1989 ; Burgess *et al.*, 1992), le récepteur de l'insuline reste transitoirement autophosphorylé et capable de phosphoryler des substrats exogènes tels que poly(Glu,Tyr). Dans le foie, la stimulation par l'insuline *in vivo* de l'autophosphorylation et de l'activité catalytique du récepteur se produit un peu plus tard dans les endosomes que dans la membrane plasmique (Burgess *et al.*, 1992). Paradoxalement, bien que la teneur en phosphotyrosine du récepteur endosomal soit plus faible que celle du récepteur associé à la membrane plasmique, sa capacité à s'autophosphoryler et à phosphoryler des substrats exogènes *in vitro* est augmentée (Burgess *et al.*, 1992).

Après dissociation du complexe insuline-récepteur dans la lumière endosomale acide, le récepteur est rapidement déphosphorylé. Dans les endosomes de foie, une activité tyrosine phosphatase membranaire associée au récepteur et sensible au bisperoxovanadium a été impliquée dans ce processus de déphosphorylation (Faure *et al.*, 1992). Bien que non identifiées, les phosphatase(s) responsable(s) de cette activité sont physiquement séparables des phosphatases LAR, PTP- $\epsilon$  et PTP1B, présentes dans les endosomes (Li *et al.*, 2006). Parmi ces dernières, la phosphatase PTP1B a reçu une attention particulière en raison de sa capacité à lier le récepteur de l'insuline (Boute *et al.*, 2003)

et de son implication dans la déphosphorylation du récepteur dans les cellules cibles de l'insuline *in vitro* et *in vivo* (Asante-Appiah *et al.*, 2003). Cependant, ni la teneur en phosphotyrosine du récepteur associé aux endosomes ni sa déphosphorylation après autophosphorylation *in vitro* ne sont affectées par l'inactivation du gène de la PTP1B chez la souris (Li *et al.*, 2006). Il a été suggéré que le récepteur associé aux endosomes est déphosphorylé par la PTP1B associée à la surface cytoplasmique du réticulum endoplasmique, à la faveur de contacts entre ces deux compartiments (Stuible *et al.*, 2010). Une étude d'imagerie dans des cellules HEK293 a en effet mis en évidence une déphosphorylation du récepteur par la PTP1B dans un compartiment endosomal périmoléculaire (Romsicki *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que, dans des cellules CHO exprimant le récepteur de l'insuline, la déphosphorylation du récepteur se produit dans un compartiment endocytique de recyclage (Cromlish *et al.*, 2006). De manière intéressante, dans des conditions basales, la PTP1B se lie au précurseur du récepteur de l'insuline dans le réticulum endoplasmique, prévenant ainsi une activité autonome de celui-ci avant la fin de sa maturation (Issad *et al.*, 2005; Boubekeur *et al.*, 2011).

Après s'être dissociée de son récepteur dans les endosomes, l'insuline est dégradée par une protéase endosomale soluble, la cathepsine D (Authier *et al.*, 2002). Bien que dans certaines conditions le récepteur puisse rester autophosphorylé et activé en l'absence de ligand, des études utilisant des analogues de l'insuline moins sensibles à la protéolyse que l'insuline elle-même ont mis en évidence une corrélation entre la dégradation de l'insuline et la déphosphorylation du récepteur dans les endosomes de foie. Ainsi, l'analogue super-actif insuline [His<sup>A8</sup>, His<sup>B4</sup>, Glu<sup>B10</sup>, His<sup>B24</sup>] (Authier *et al.*, 1998, 2004) et la proinsuline (Desbuquois *et al.*, 2003) qui, après internalisation, sont dégradés l'un et l'autre plus lentement que l'insuline, induisent une accumulation plus marquée et prolongée du récepteur phosphorylé dans les endosomes. Il en est de même avec la mono-arginyl Arg<sup>A0</sup> insuline, qui doit être convertie en insuline avant d'être dégradée (Kouach *et al.*, 2009). L'inhibition de la protéolyse endosomale de l'insuline dans le foie par l'administration de pepstatine A (Authier *et al.*, 2002), un inhibiteur de la cathepsine D, et de chloroquine (Bevan *et al.*, 1997), un agent acidotrope, prolonge aussi la durée de vie du récepteur autophosphorylé dans les endosomes.

L'activation prolongée du récepteur de l'insuline par les analogues super-actifs de l'insuline s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de Shc et des effets mitogéniques de l'insuline (Hansen *et al.*, 1996). Paradoxalement, en dépit de leur capacité à augmenter l'activité tyrosine kinase du récepteur

internalisé, la chloroquine et la bafilomycine (un inhibiteur de l'ATPase à protons vacuolaire) inhibent l'activation de la voie PI3K/Akt dans des hépatocytes en culture après exposition prolongée à l'insuline (Balbis *et al.*, 2004). Cet effet a été attribué à une inhibition du recyclage du récepteur internalisé à la membrane plasmique.

## Induction par l'insuline du recrutement et/ou de l'activation de protéines de signalisation dans le compartiment endosomal

Plusieurs protéines appartenant aux voies de signalisation IRS/PI3K/Akt et Shc/Ras/Raf/Mek/Erk ont été identifiées dans les endosomes ou des compartiments membranaires intracellulaires de différentes cellules ou tissus, après stimulation par l'insuline (Tableau 1). Ces observations suggèrent soit l'endocytose de complexes de signalisation formés à la surface cellulaire, soit le recrutement direct des protéines de signalisation cytosoliques par les endosomes.

### Voie de signalisation IRS/PI3K/Akt

L'activation de cette voie comporte trois étapes, impliquant chacune la translocation des protéines concernées du cytoplasme vers la membrane plasmique et/ou d'autres compartiments membranaires : (1) le recrutement par le récepteur de l'insuline activé des protéines IRS, induisant leur phosphorylation sur des résidus tyrosine; (2) le recrutement par les protéines IRS phosphorylées de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase, lequel induit l'activation de sa sous-unité catalytique p110; et (3) la phosphorylation et l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt par les sérine/thréonine kinases PDK1 (*Phosphoinositide Dependent Kinase 1*) et mTORC2 (*Mammalian target of rapamycin complex 2*), rendues possibles par l'association des kinases Akt et PDK1 par leur domaine PH au PtdIns(3,4,5)P3 généré à la surface membranaire.

Des études utilisant le fractionnement subcellulaire ont montré que dans les adipocytes (Kelly & Ruderman, 1993; Kublaoui *et al.*, 1995), la lignée adipocytaire 3T3L1 (Navé *et al.*, 1996; Ricort *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1998; Heller-Harrison *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998) et les cellules d'hépatome H35 (Smith *et al.*, 1998), la phosphorylation des protéines IRS1 et IRS2, le recrutement de la p85 PI3K aux IRS phosphorylées et l'activation de la p110 PI3K en réponse à l'insuline se produisent principalement dans un compartiment membranaire intracellulaire. Une étude a montré que le récepteur de l'insuline

**Tableau 1.** Protéines de signalisation recrutées dans les endosomes après stimulation par l'insuline.

| Protéine | Nature                 | Partenaire impliqué dans le recrutement aux endosomes | Conséquence fonctionnelle                             | Cellule/tissu                               | Référence   |
|----------|------------------------|---|---|---|---|
| IRS1/2   | Protéine d'assemblage  | pIR   | Phosphorylation sur Tyr<br>Recrutement de p85 PI3K    | Adipocytes<br>Cellules 3T3L1<br>Muscle Foie | Voir texte  |
| PI3K     | Protéine-lipide kinase | pIRS1   | Activation de p110 PI3K<br>Génération de PI(3,4,5) P3 | Adipocytes<br>Cellules 3T3L1<br>Muscle Foie | Voir texte  |
| Akt/PKB  | Ser/Thr kinase         | PI (3,4,5)P3<br>APPL1                                 | Phosphorylation, activation                           | Foie  | Balbis <i>et al.</i> , 2000<br>Cheng <i>et al.</i> , 2010 |
| Ras      | GTPase                 | Grb2/SOS  | Activation  | Fibroblastes                                | Rizzo <i>et al.</i> , 2000                                |
| Raf-1    | Ser/Thr kinase         | Acide phosphatidique                                  | Phosphorylation, activation                           | Fibroblastes                                | Rizzo <i>et al.</i> , 2000                                |
| Mek, Erk | Ser/Thr kinases        |   | Phosphorylation, activation                           | Fibroblastes                                | Rizzo <i>et al.</i> , 2000                                |
| Grb14    | Adaptateur             | pIR   | Inhibition de l'activité IRK                          | Foie  | Desbuquois <i>et al.</i> , 2008                           |
| LRP1     | Récepteur membranaire  | pIR   | Voir texte  | Foie  | Biladeau <i>et al.</i> , 2009                             |

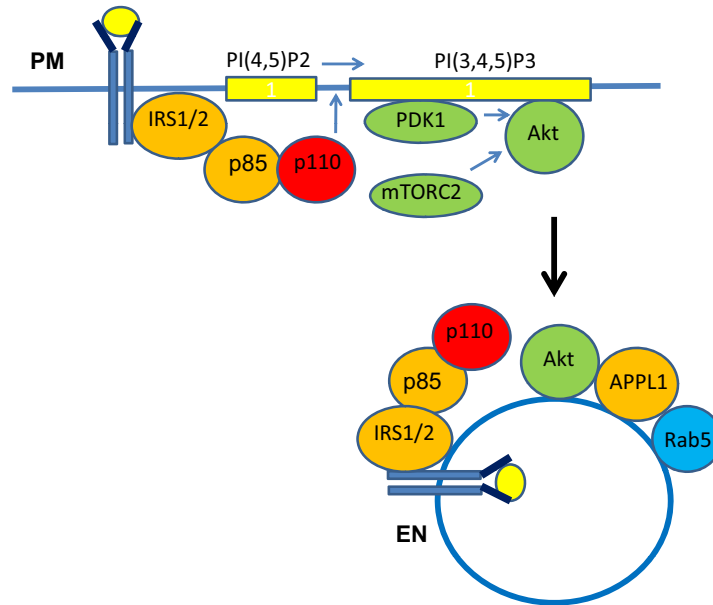
internalisé et phosphorylé s'associe à ce compartiment avec la même cinétique que la protéine IRS1 phosphorylée, suggérant son implication dans la phosphorylation d'IRS1 (Kublaoui *et al.*, 1995). Toutefois, dans une autre étude, la phosphorylation d'IRS1 n'est pas affectée par l'abaissement de la température, suggérant qu'elle ne nécessite pas l'internalisation du récepteur (Heller-Harrison *et al.*, 1998). La nature endosomale du compartiment où se produisent la phosphorylation d'IRS1 et l'activation de la PI3K n'a pas été formellement établie. Le fractionnement des adipocytes par des gradients de densité a montré que le récepteur internalisé migre avec le transporteur de glucose Glut4 mais est physiquement séparable du complexe IRS1/p85 PI3K (Kelly & Ruderman, 1993; Knight *et al.*, 2000). Une autre étude a conclu à une association d'IRS1 et de la PI3K à des éléments du cytosquelette (Clark *et al.*, 1998).

Une démonstration plus convaincante de l'activation de la voie IRS/PI3K/Akt dans le compartiment endosomal, précédée par son activation dans la membrane plasmique, a été apportée par fractionnement subcellulaire du foie de rat après injection d'insuline (Balbis *et al.*, 2000) (figure 1). Dans cette étude, l'association du récepteur activé et phosphorylé aux endosomes est accompagnée par le recrutement des protéines IRS1 et IRS2, de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase en association avec les IRS, et de la sérine/thréonine kinase Akt (isoforme 1) dans ce compartiment. Un autre effet de l'insuline est de stimuler la phosphorylation (sur Ser473 et

Thr308) et l'activité de la kinase Akt recrutée aux endosomes et à la membrane plasmique, ainsi que d'Akt dans le cytosol. Bien que la phosphorylation d'Akt soit stimulée à un degré plus marqué dans la membrane plasmique que dans les endosomes, son activation est comparable dans ces deux compartiments. Un travail récent a montré que, dans le foie de souris, le recrutement et l'activation d'Akt dans les endosomes sont accompagnés par un recrutement de l'adaptateur APPL1 (*adaptor protein containing PH domain, phosphotyrosine binding domain and leucine zipper motif 1*), un effecteur de la GTPase Rab5 qui lie et active Akt (Cheng *et al.*, 2010). Comme il sera décrit plus loin, cet adaptateur régule de manière positive le recrutement d'Akt par le compartiment endosomal.

De manière inattendue, bien que la p85 PI3K recrutée à la membrane plasmique et aux endosomes soit en majeure partie (60–85 %) associée à la protéine IRS1 (Balbis *et al.*, 2000), une interaction directe de la p85 avec le récepteur de l'insuline activé et phosphorylé a été mise en évidence dans la membrane plasmique (Drake *et al.*, 2000). Cependant, contrairement à l'interaction de la p85 avec IRS1, cette interaction ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'activité lipide kinase de la PI3K.

Un protocole original combinant, chez le rat, l'administration de bpV(phen) (*Bisperoxo(1,10-phénanthroline)-oxovanadate*), un inhibiteur de protéine phosphotyrosine phosphatase, et de colchicine, qui bloque le transport du récepteur de l'insuline vers la



**Fig. 1.** Recrutement et activation par l'insuline des protéines de signalisation de la voie IRS/PI3K/Akt dans des compartiments subcellulaires de foie (d'après Balbis *et al.*, 2000 et Cheng *et al.*, 2010). Après activation à la membrane plasmique (PM), le récepteur de l'insuline recrute et phosphoryle les protéines IRS1 et IRS2. L'association des IRS phosphorylées à la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase induit l'activation de sa sous-unité catalytique p110. Le PtdIns(3,4,5)P3 produit relaie l'association de la sérine kinase Akt à la membrane plasmique, permettant sa phosphorylation et son activation par les sérine kinases PDK1 et mTORC2. En même temps que le récepteur phosphorylé et activé, le complexe IRS1/PI3K et la kinase Akt activée sont internalisés et s'associent aux endosomes précoces (EN). Un recrutement direct d'Akt cytosolique aux endosomes est possible mais n'a pas été formellement démontré. L'interaction d'Akt avec l'adaptateur APPL1 (un effecteur de Rab5) dans les endosomes facilite son association à la membrane endosomale. L'insuline stimule aussi la phosphorylation d'IRS1 et son association à la p85 PI3K dans le cytosol, suggérant que leur engagement dans un complexe membranaire stable n'est pas obligatoire pour ces effets.

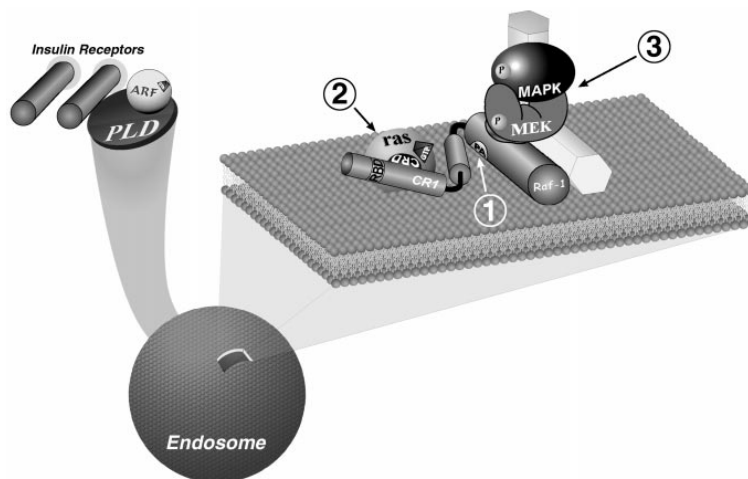
membrane plasmique, a permis de mettre en évidence l'implication de la signalisation endosomale dans des effets distaux de l'insuline (Bevan *et al.*, 1995). Chez ces animaux, l'activation sélective du récepteur de l'insuline dans les endosomes s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation d'IRS1 cytosolique, d'une stimulation du transport du glucose et d'une hypoglycémie (Bevan *et al.*, 1995).

### Voie de signalisation Ras/Raf/Mek/Erk

Induite par le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS et Shc par le récepteur de l'insuline, l'activation de cette voie comporte trois étapes : le recrutement de l'adaptateur Grb2 par les protéines Shc et IRS phosphorylées ; l'activation de la GTPase membranaire Ras par le facteur d'échange GDP/GTP Sos (*Son of Sevenless*) constitutivement associé à Grb2 ; et l'activation, *via* une cascade de phosphorylations, des sérine/thréonine kinases Raf1, Mek1/2 et Erk1/2. Longtemps considérée comme se produisant exclusivement à la membrane plasmique, l'activation de cette voie par les facteurs de croissance se produit aussi dans d'autres compartiments subcellulaires, notamment le réticulum endoplasmique, l'appareil de

Golgi et les endosomes. À cet égard, particulièrement démonstrative a été la mise en évidence des protéines Shc, Grb2/Sos, Ras et Raf dans des endosomes de foie contenant des récepteurs phosphorylés de l'EGF (Di Guglielmo *et al.*, 1994 ; Pol *et al.*, 1998).

À la différence de l'EGF, l'insuline affecte peu le recrutement des protéines de la voie Ras/Raf/Mek/Erk dans les endosomes de foie (Di Guglielmo *et al.*, 1994). Bien que détectable, la phosphorylation de Raf-1 et de Erk (p42/44 MAPK) dans le cytosol hépatique en réponse à l'insuline et à deux analogues superactifs de l'insuline est faible relativement à celle induite par l'EGF (Authier *et al.*, 2004). En revanche, un recrutement endosomal des protéines Ras, Raf1, phospho-Mek et phospho-Erk induit par l'insuline a été mis en évidence par fractionnement subcellulaire, microscopie de fluorescence et imagerie dans des fibroblastes surexprimant le récepteur de l'insuline (Rizzo *et al.*, 2000, 2001) (figure 2). Les études morphologiques ont montré une co-localisation de Raf-GFP avec le récepteur de l'insuline et la protéine EEA1, et une co-localisation de Raf-GFP avec Ras, phosphoMek et phosphoErk dans les endosomes précoces. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que la



**Fig. 2.** Recrutement et activation par l'insuline des protéines de signalisation de la voie Ras/Raf/Mek/Erk dans le compartiment endosomal de fibroblastes surexprimant le récepteur de l'insuline (d'après Rizzo *et al.*, 2000). Après activation à la membrane plasmique, le récepteur de l'insuline stimule la phospholipase D et active, *via* la phosphorylation d'IRS1 et le recrutement à IRS1 du complexe Grb2/Sos, la GTPase Ras. L'acide phosphatidique généré par l'activation de la phospholipase D induit l'association de la sérine kinase Raf-1 à la membrane, et l'interaction de Raf-1 avec Ras, son activation. Ensuite, Raf-1 activé phosphoryle Mek, qui à son tour phosphoryle Erk. En même temps qu'ils sont activés, les composants de la cascade Ras/Raf/Mek/Erk migrent avec le récepteur de l'insuline internalisé et s'associent aux endosomes précoces. La kinase Erk phosphorylée et activée est libérée dans le cytoplasme et va phosphoryler ses cibles dans le noyau (reproduit avec la permission du *Journal of Biological Chemistry*).

translocation de Raf1 aux endosomes requiert son association à l'acide phosphatidique généré par activation de la phospholipase D, l'association de Raf1 à Ras étant impliquée seulement dans son activation (Rizzo *et al.*, 2000).

### Régulateurs négatifs de la signalisation

L'adaptateur Grb14, un régulateur négatif majeur de la signalisation de l'insuline recruté par le récepteur activé, a été identifié par Western blot dans différents compartiments subcellulaires du foie (Desbuquois *et al.*, 2008). Localisé à l'état basal en majeure partie dans le cytosol et la fraction microsomale, Grb14 s'associe au domaine tyrosine kinase de la sous-unité  $\beta$  du récepteur de l'insuline activé d'abord à la membrane plasmique, puis dans les endosomes, suggérant sa co-internalisation sous forme de complexe avec le récepteur (figure 3). La capacité d'analogues de l'insuline à stimuler le recrutement de Grb14 dans les endosomes est en corrélation avec leur capacité à stimuler l'autophosphorylation du récepteur (Desbuquois *et al.*, 2008; Kouach *et al.*, 2009).

Comme précédemment mentionné, plusieurs phosphotyrosine phosphatases capables de déphosphoryler le récepteur de l'insuline *in vitro*, notamment la PTP1B, ont été identifiées dans les endosomes de foie (Li *et al.*, 2006); leur implication dans la déphosphorylation *in vivo* du récepteur n'a pas été établie.

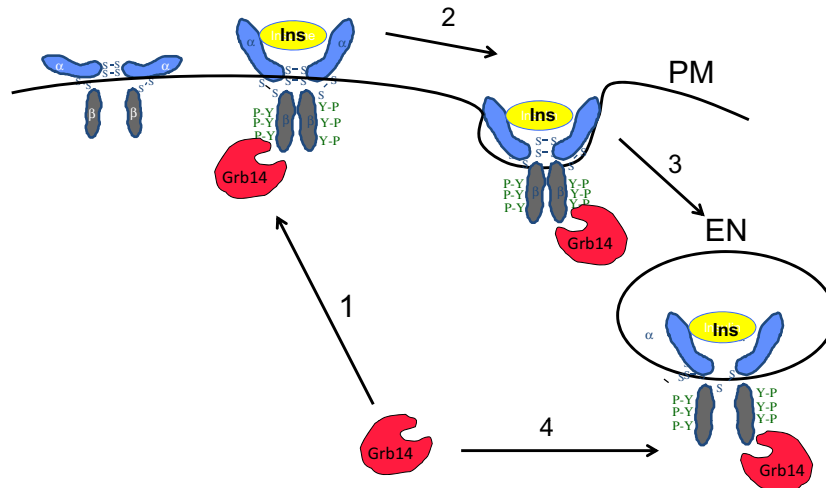
### Autres protéines de signalisation

Une approche protéomique combinant la chromatographie d'affinité et la spectrométrie de masse a récemment permis l'identification, dans des fractions endosomales de foie, de 16 protéines phosphorylées par les kinases de la famille Src en réponse à l'insuline, notamment des récepteurs membranaires et des protéines impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire et de la signalisation (Biladeau *et al.*, 2010). L'une de ces protéines, le LRP1 (*low density lipoprotein-related protein 1*), est associée au récepteur de l'insuline internalisé. Le LRP1 joue un rôle pléiotropique dans la signalisation et le métabolisme des lipoprotéines et a été identifié comme un composant des vésicules de stockage du transporteur de glucose Glut 4 dans les adipocytes (Jedrychowski *et al.*, 2010).

### Relations fonctionnelles entre endocytose et signalisation de l'insuline

#### Endocytose et signalisation relayées par des formes mutées du récepteur

Deux motifs localisés dans la région juxtamembranaire de la sous-unité  $\beta$  du récepteur de l'insuline (950GPLY953 et 984ITLL987) ont été impliqués dans son internalisation. L'isoforme B du récepteur mutée sur ces motifs (950APLA953 et 984LLAA987),



**Fig. 3.** Recrutement par le récepteur activé de l'adaptateur Grb14 dans des fractions subcellulaires de foie (d'après Desbuquois *et al.*, 2008). À l'état basal, l'adaptateur Grb14 est localisé en grande partie dans le cytoplasme et la fraction microsomale. Après activation du récepteur à la membrane plasmique, Grb14 s'associe par ses domaines SH2 et BPS aux trois résidus phosphotyrosine de la boucle régulatrice de la sous-unité  $\beta$  du récepteur (1). Grb14 est ensuite rapidement internalisé dans les endosomes (EN) en complexe avec le récepteur (2, 3). Un recrutement direct de Grb14 cytoplasmique au récepteur internalisé est également possible (4). L'association de Grb14 au récepteur internalisé induit une inhibition de son activité catalytique.

dont l'internalisation est défectueuse, n'est plus capable d'activer, *via* Erk, la transcription du gène *c-fos* dans les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine, mais garde sa capacité à activer le gène de la glucokinase (Uhles *et al.*, 2007). De même, la mutation R252C sur la sous-unité  $\alpha$ , identifiée dans une forme d'insulino-résistance sévère, interfère avec l'internalisation du récepteur et sa capacité à phosphoryler Shc et à activer la voie Ras/Raf/Erk, mais préserve sa capacité à phosphoryler IRS1 et à activer la voie PI3K/Akt (Hamer *et al.*, 2002). Ces observations sont en faveur d'une implication sélective de l'endocytose dans l'activation de la voie Ras/Raf/Mek/Erk.

Une autre mutation du récepteur affectant à la fois l'endocytose et la signalisation est la mutation Arg1152Gln dans la boucle régulatrice du domaine tyrosine kinase, identifiée dans une famille de diabétiques de type 2 (Caruso *et al.*, 2000). L'internalisation constitutive de ce mutant dans des myoblastes a été impliquée dans sa capacité à induire une activation constitutive d'IRS2, mais non IRS1.

#### Effets d'inhibiteurs pharmacologiques de l'endocytose sur la signalisation de l'insuline

Deux inhibiteurs pharmacologiques de l'endocytose, la chlorpromazine et la filipine, ont été examinés pour leur capacité à affecter la signalisation de l'insuline dans des fibroblastes embryonnaires de souris exprimant l'isoforme A du récepteur (Morcavallo *et al.*, 2010). La chlorpromazine inhibe l'endocytose dépendante de la clathrine en affectant la localisation

membranaire de l'adaptateur de la clathrine AP2; la filipine (un polyène antibiotique) inhibe l'endocytose indépendante de la clathrine en complexant le cholestérol. Ces deux agents ne modifient pas la phosphorylation du récepteur et d'IRS1 induite par l'insuline à des temps précoces mais la diminuent à des temps tardifs, suggérant que l'endocytose de ces protéines prolonge leur état de phosphorylation. En revanche, la chlorpromazine inhibe l'activation de la kinase Akt, et la filipine l'activation de la kinase Erk et la phosphorylation sur sérine d'IRS1, indiquant un rôle de l'endocytose dépendante et non dépendante de la clathrine dans ces événements respectifs de la signalisation. L'activation par l'insuline de la p70 S6 kinase semble indépendante de l'internalisation.

#### Conséquences de la déplétion ou surexpression de protéines impliquées dans la régulation de l'endocytose sur la signalisation

Le trafic vésiculaire dans la voie de l'endocytose est régulé par de nombreuses GTPases; la dynamine est impliquée dans la formation des vésicules à clathrine à partir des puits à clathrine, et les protéines de la famille Rab, dans la formation et la dynamique des endosomes (Stenmark, 2012). À l'état activé, lié au GTP, chacune des protéines Rab réside dans une population particulière d'endosomes et recrute des protéines effectrices spécifiques. Ainsi, la protéine Rab5 est associée principalement aux endosomes précoces, et la protéine Rab7, aux endosomes tardifs. Selon la nature des effecteurs de Rab5, plusieurs populations d'endosomes

**Tableau 2.** Conséquences de la déplétion cellulaire de protéines impliquées dans la régulation de l'endocytose sur la signalisation de l'insuline.

| Protéine              | Nature     | Cellule      | Composant de la signalisation affecté |                |      |      |                   | Référence                    |
|-----------------------|------------|--------------|---------------------------------------|----------------|------|------|-------------------|------------------------------|
|                       |            |              | pShc                                  | pIRS1          | pAkt | pErk | S6K1 <sup>4</sup> |                              |
| Dynamine <sup>1</sup> | GTPase     | H4IIE        | ↘                                     | 0              | 0    | ↘    |                   | Ceresa <i>et al.</i> , 1998  |
|                       |            | 3T3L1        | 0                                     | 0              | 0    | 0    |                   | Kao <i>et al.</i> , 2007     |
| Rab4                  | GTPase     | 3T3L1        | ↘                                     |                | ↘    | ↘    |                   | Knight <i>et al.</i> , 2000  |
| Rab5 <sup>1</sup>     | GTPase     | HepG2        |                                       |                | ↘    | ↘    |                   | Hunker <i>et al.</i> , 2006a |
|                       |            | NIH3T3/hIR   | 0                                     | 0 <sup>3</sup> | ↘    | 0    |                   | Su <i>et al.</i> , 2006      |
| Rin1 <sup>1,2</sup>   | Rab5 GEF   | HepG2        |                                       |                | ↘    | ↘    |                   | Hunker <i>et al.</i> , 2006b |
| GAPex-5               | Rab5 GEF   | NIH3T3/hIR   | 0                                     | 0              | ↘    | 0    |                   | Su <i>et al.</i> , 2006      |
| hVps39                | Rab7 GEF   | HEK293, Hela |                                       |                |      |      | ↘                 | Flinn <i>et al.</i> , 2010   |
| APPL1                 | Adaptateur | Hepatocytes  |                                       |                | ↘    |      |                   | Cheng <i>et al.</i> , 2009   |
|                       |            | Adipocytes   |                                       |                | ↘    |      |                   | Saito <i>et al.</i> , 2007   |
| WDFY2                 | Adaptateur | 3T3L1        |                                       |                | ↘    |      |                   | Walz <i>et al.</i> , 2010    |

<sup>1</sup>La déplétion de cette protéine induit aussi une inhibition de l'endocytose du récepteur de l'insuline.

<sup>2</sup>Déplétion induite par le mutant Rin1N.

<sup>3</sup>Inhibition de l'association de pIRS1 à p85 PI3K.

<sup>4</sup>Effecteur de mTORC1.

précoces ont été identifiées; à côté des endosomes classiques, positifs pour la protéine EEA1, il existe deux autres populations d'endosomes exprimant, respectivement, les adaptateurs APPL et WDFY. Les endosomes APPL-positifs, plus particulièrement impliqués dans la signalisation, sont les précurseurs des endosomes EEA1-positifs; leur maturation (directe ou *via* les endosomes WDFY-positifs) est induite par l'acquisition du PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) (Zoncu *et al.*, 2009). Les conséquences de la déplétion ou de la surexpression de la dynamine, des protéines Rab et de leurs effecteurs sur l'endocytose du récepteur de l'insuline et la signalisation de l'insuline (Tableau 2) sont décrites ici.

## Dynamine

L'inhibition de la formation des vésicules à clathrine par des mutants dominants négatifs de la dynamine (dynamine K44A) ou de la sous-unité  $\mu 2$  de l'adaptateur de la clathrine AP-2 ( $\mu 2$ T156A) s'accompagne d'une inhibition partielle de la capacité de l'insuline à phosphoryler l'adaptateur Shc et à activer la kinase Erk dans les cellules d'hépatome H4 (Ceresa *et al.*, 1998), ainsi qu'à activer, *via* Erk, la transcription du gène *c-fos* dans les cellules endocrines  $\beta$  pancréatiques (Uhles *et al.*, 2007). En revanche, la phosphorylation d'IRS1 et l'activation de la voie PI3K/Akt dans ces modèles sont peu ou non affectées. À première vue, ces résultats suggèrent un rôle de l'endocytose dépendante de la clathrine dans la phosphorylation de Shc et l'activation de la voie Ras/Raf/Mek/Erk. Cependant, aucune des deux voies de signalisation de l'insuline n'est affectée par l'expression de la dynamine K44A dans les adipocytes (Ceresa *et al.*, 1998; Kao *et al.*, 1998) ni par

la déplétion de la dynamine dans des fibroblastes surexprimant le récepteur de l'insuline (Su *et al.*, 2006).

## GTPase Rab4

Impliquée dans la stimulation par l'insuline de la translocation du transporteur de glucose Glut4 dans les cellules 3T3L1, la GTPase Rab4 régule aussi de manière positive les étapes proximales de la signalisation de l'insuline dans cette lignée (Knight *et al.*, 2000). La surexpression d'un mutant de Rab4 dépourvu d'un motif de prénylation dans des cellules 3T3L1 inhibe la capacité de l'insuline à stimuler la phosphorylation d'IRS1, le recrutement de p85 PI3K par IRS1 et l'activité d'Akt dans le cytoplasme et des membranes intracellulaires. Cette observation milite en faveur de l'implication d'un trafic vésiculaire dépendant de Rab4 dans l'activation de la voie PI3K/Akt.

## GTPase Rab5

L'endocytose du récepteur de l'insuline et la capacité de l'insuline à stimuler l'association de la p85 PI3K à IRS1 et à activer Akt dans des fibroblastes NIH3T3./hIR sont l'une et l'autre inhibées par la déplétion des trois isoformes de Rab5 en association, ainsi que par la déplétion de GAPex-5, un facteur d'échange GDP-GTP pour Rab5 (Su *et al.*, 2006). Il a été suggéré que Rab5 pourrait faciliter la fusion des membranes contenant IRS1 avec celles contenant la p85, ou l'association de la p85 PI3K à IRS1 à l'interface membrane/cytosquelette. Des effets comparables de Rab5 ont été observés dans une autre étude sur des cellules HepG2 (Hunker *et al.*, 2006). Les auteurs



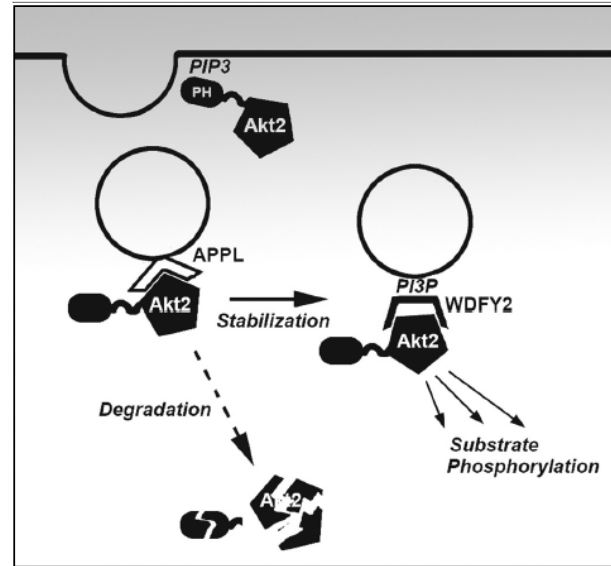
ont montré que l'endocytose du récepteur et l'activation des kinases Akt et Erk dans ces cellules sont potentialisées par l'expression de Rab5 et Rab5 Q79L (un mutant constitutivement actif), et à l'inverse diminuées par l'expression de Rab5 S34N (un mutant dominant négatif). De manière intéressante, l'expression de Rab5 Q79L induit une activation des kinases Akt, Raf et Erk en l'absence d'insuline (Hunker *et al.*, 2006a).

#### Adaptateur APPL1

Cet effecteur de la GTPase Rab5 régule de manière positive la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes en stimulant l'association et l'activation de la sérine kinase Akt dans le compartiment endosomal (Cheng *et al.*, 2010). Identifié initialement comme un partenaire d'Akt, APPL1 s'associe à Rab5 par son domaine BAR (*Bin-Amphiphysin-Rvs*) amino-terminal et son domaine PH central, et à Akt par son domaine PTB carboxy-terminal. La surexpression d'APPL1 dans des hépatocytes en culture potentialise la capacité de l'insuline à activer Akt, à phosphoryler des substrats d'Akt tels que FOXO1 et GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), et à inhiber la production de glucose et l'expression des enzymes de la néoglucogénèse; sa déplétion par ARN interférence exerce des effets opposés. *In vivo* chez la souris, la déplétion d'APPL1 dans le foie diminue la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, et sa surexpression chez des souris génétiquement obèses et diabétiques db/db améliore ces paramètres. L'adaptateur APPL1 régule aussi de manière positive l'activation d'Akt2 et l'action de l'insuline sur le transport du glucose dans les adipocytes et les cellules 3T3L1 (Saito *et al.*, 2007). APPL1 n'affecte pas la signalisation de l'insuline en amont d'Akt; il potentialise l'activation d'Akt par l'insuline en inhibant son association à la protéine cytosolique TRB3, induisant ainsi son recrutement aux endosomes, et à un moindre degré à la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 2010). Récemment, l'ubiquitination d'APPL1 par l'ubiquitine ligase E3 TRAF6 (*tumour necrosis factor receptor associated factor 6*) a été impliquée dans sa translocation aux endosomes induite par l'insuline (Cheng *et al.*, 2013).

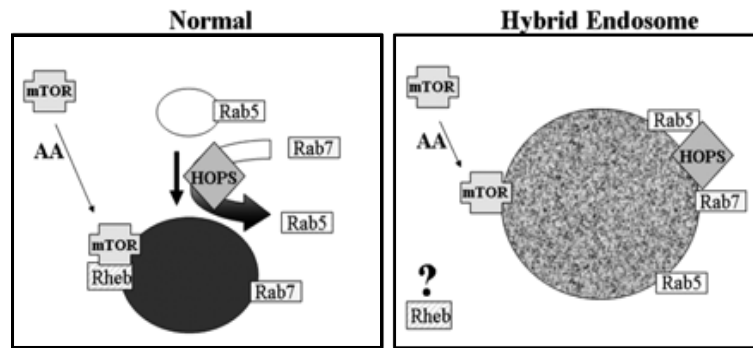
#### Adaptateur WDFY2

Comme l'adaptateur APPL1, WDFY2 (une protéine contenant des motifs WD40 et un domaine FYVE) régule positivement l'activation d'Akt par l'insuline dans le compartiment endosomal des cellules 3T3L1 (Walz *et al.*, 2010). Identifiée comme un partenaire d'Akt2 dans un crible double-hybride, cette protéine est localisée dans une population d'endosomes précoces EEA1-négatifs proche de la membrane



**Fig. 4.** Modèle proposé par Walz *et al.* (2009) pour expliquer comment les adaptateurs APPL1 et WDFY2 contrôlent la signalisation d'Akt2 dans les endosomes. L'étape initiale dans l'activation d'Akt2 est son association à la membrane plasmique, induite par l'interaction de son domaine PH avec le phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate généré par activation de la PI3-kinase. Après translocation dans les endosomes, Akt2 est d'abord associé à l'adaptateur APPL1, mais à mesure que le taux du phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate dans les endosomes diminue tandis que celui du phosphatidylinositol 3-phosphate augmente, WDFY2 remplace APPL1. Une fois associée à WDFY2, Akt2 est stabilisée et protégée de la dégradation. La phosphorylation des substrats d'Akt2 pourrait se produire à partir des endosomes enrichis en WDFY2 (reproduit avec la permission du *Journal of Biological Chemistry*).

plasmique. Elle s'associe par son domaine FYVE au phosphatidylinositol 3-phosphate présent dans la membrane endosomale, et son expression dans les endosomes varie en raison inverse de l'expression de la protéine APPL1. Une co-localisation de la protéine WDFY2 et Akt2 dans des endosomes de cellules 3T3L1 a été mise en évidence par microscopie de fluorescence quantitative (Walz *et al.*, 2010). La déplétion de WDFY2 induite par ARN interférence induit une diminution du taux d'Akt2 et de sa phosphorylation en réponse à l'insuline, ainsi qu'une diminution globale de la phosphorylation des substrats d'Akt. Elle induit aussi une diminution du transport du glucose et à long terme, une diminution d'expression des gènes impliqués dans l'adipogénèse. La mise en évidence d'une interaction d'Akt2 avec deux protéines présentes dans les endosomes, APPL1 et WDFY2, a conduit à proposer un modèle rendant compte de leur implication dans le contrôle endosomal de la signalisation d'Akt2 (figure 4).



**Fig. 5.** Modèle proposé par Flinn *et al.* (2010) pour expliquer l'implication des endosomes tardifs dans l'activation par les acides aminés et l'insuline de mTORC1. L'activation de mTORC1 par l'insuline, relayée par l'activation de la GTPase Rheb (*Ras homologue enriched in brain*), nécessite la conversion préalable des endosomes précoces en endosomes tardifs. Celle-ci implique le remplacement de la GTPase Rab5 par la GTPase Rab7 et l'action d'un facteur d'échange GDP/GTP pour Rab7, la protéine hVps39 (membre du complexe HOPS). Les acides aminés stimulent la translocation de mTOR vers les endosomes tardifs, permettant son interaction avec la protéine Rheb. Si la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs est bloquée (à droite), soit par surexpression d'un mutant de Rab5 constitutivement activé, soit par déplétion de hVps39, mTOR reste localisé dans un compartiment hybride et n'a plus accès à la protéine Rheb. Dans ces conditions, mTORC1 n'est plus activé (reproduit avec la permission de *Molecular Biology of the Cell*).

#### GTPase Rab7

Le compartiment endosomal tardif exprimant cette GTPase joue un rôle essentiel dans l'activation par l'insuline de mTORC1, un complexe protéique qui régule la synthèse protéique, la croissance cellulaire et l'autophagie en réponse à des facteurs de croissance, des nutriments, l'énergie et le stress cellulaire (Flinn *et al.*, 2010; Zoncu *et al.*, 2011). En bloquant la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs, la déplétion de la protéine hVps39, un facteur d'échange GDP-GTP pour Rab7, induit l'association de mTORC1 à un compartiment endosomal hybride et inhibe son activation par la GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), cible du complexe TSC-1/TSC-2 (lui-même cible des kinases Akt et Erk) (figure 5). Les mêmes effets sont reproduits par la surexpression d'un mutant constitutivement actif de la GTPase Rab5. Dans les cellules surexprimant Rab5, la surexpression de la GTPase Rheb, qui active mTORC1 indépendamment de sa localisation, restaure la réponse à l'insuline. Ces résultats suggèrent que la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs, en permettant à mTORC1 d'interagir avec la GTPase Rheb, est essentielle pour son activation par l'insuline et les amino-acides.

#### Implication des voies de signalisation de l'insuline dans la régulation de l'endocytose du récepteur de l'insuline

Si l'endocytose de récepteurs ayant une fonction de signalisation régule celle-ci en induisant la formation de complexes de signalisation dans les endosomes, réciproquement l'activation de la signalisation module

des composants spécifiques de la machinerie d'endocytose (Sorkin & von Zastrow, 2002, 2009). À cet égard, une régulation de l'endocytose du récepteur de l'insuline par les voies de signalisation PI3K/Akt et Ras/Raf/Mek/Erk, ainsi que par les PKCs atypiques en aval de la PI3K, a été observée.

Le traitement de fibroblastes surexprimant le récepteur de l'insuline par une association de wortmanine et de PD9805 (inhibiteurs respectifs des voies PI3K/Akt et Ras/Raf/Mek/Erk) induit une inhibition de l'endocytose du récepteur (Sasaoka *et al.*, 2000). Des effets comparables sont reproduits par la micro-injection du domaine SH2 de la sous-unité p85 de la PI3K et d'un mutant catalytiquement inactif de la MAP kinase. En outre, la wortmanine et le PD98059 en association, et à moindre degré le PD98059 seul, inhibent la capacité d'un traitement prolongé par l'insuline à induire une diminution de l'expression du récepteur à la surface cellulaire et une dégradation de ses sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces résultats sont en faveur d'une régulation positive de l'endocytose du récepteur par la voie Ras/Raf/Mek/Erk, et à moindre degré, la voie PI3K.

La sérine kinase Akt et plusieurs isoformes de PKC atypiques activées par l'insuline ont été impliquées dans la régulation de l'internalisation, de la dégradation et de la rétro-endocytose de l'insuline. Ainsi, à partir de stratégies de déplétion ou de surexpression de ces kinases dans des fibroblastes, il a été montré qu'Akt stimule la rétro-endocytose de l'insuline mais n'affecte ni son internalisation ni sa dégradation (Fiory *et al.*, 2004). En revanche, la PKC $\zeta$ , par un effet dépendant de Rab5, stimule l'internalisation de l'insuline. En s'associant

au récepteur de l'insuline activé et phosphorylé, les PKCs  $\alpha$  et  $\delta$  régulent aussi la dégradation et la rétro-endocytose de l'insuline internalisée (Formisano *et al.*, 1998). Dans des cellules déplétées en PKC  $\alpha$  et  $\delta$  par le TPA (un ester de phorbol) ou exprimant le récepteur de l'insuline mutant R1152Q/K1153A, qui n'est pas phosphorylé par ces PKCs, la dégradation de l'insuline internalisée est diminuée et sa libération extracellulaire augmentée.

Il a été récemment montré que la PKC $\epsilon$ , impliquée dans l'intolérance au glucose induite par un régime riche en graisse chez la souris, inhibe la capture hépatique de l'insuline circulante et contrôle la localisation et le trafic cellulaire du récepteur de l'insuline (Pedersen *et al.*, 2013). L'analyse par fractionnement subcellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris dont le gène de la PKC $\epsilon$  a été invalidé a mis en évidence une diminution de leur capacité à internaliser l'insuline, une plus grande proportion de récepteurs co-localisés avec la flotilline-1 dans des microdomaines membranaires, et une altération de la redistribution intracellulaire des récepteurs en réponse à l'insuline. À ces modifications s'associe une diminution de l'expression de la protéine CEACAM-1 (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*), un substrat du récepteur de l'insuline qui régule la capture hépatique de l'insuline circulante. Ce phénotype est partiellement normalisé par transfection des fibroblastes par la PKC $\epsilon$ . Ces résultats suggèrent un contrôle par la PKC $\epsilon$  de la capture hépatique de l'insuline *via* l'expression de la protéine CEACAM.

## Conclusion

L'endocytose des récepteurs ayant une fonction de signalisation a longtemps été considérée comme un mécanisme régulant négativement la signalisation à la surface des cellules. Il est désormais établi que les endosomes sont aussi impliqués dans une régulation positive de la signalisation, notamment en facilitant l'accès du domaine cytoplasmique des récepteurs aux protéines de signalisation intracellulaires (Sorkin & von Zastrow, 2002, 2009; Murphy *et al.*, 2009; Posner & Laporte, 2010; Platta & Stenmark, 2011). Si la signalisation endosomale ne fait souvent que prolonger ou amplifier la signalisation initiée à la membrane plasmique, certains événements de signalisation ont leur origine exclusive dans les endosomes. La distribution spatiale des différentes molécules de signalisation est un déterminant important de la spécificité de la signalisation.

Les données de la littérature analysées dans cette revue suggèrent que l'endocytose du récepteur de l'insuline, tout en régulant négativement la signalisation en relayant la déphosphorylation du récepteur et la dégradation de l'insuline, est aussi impliquée dans

une régulation positive de la signalisation. Loin d'être contradictoires, ces effets opposés rendent compte, au moins en partie, de la complexité de la régulation spatiale et temporelle de la signalisation de l'insuline. Toutefois, l'implication du compartiment endosomal dans une régulation positive de la signalisation apparaît complexe, variant selon les étapes de la signalisation étudiées, et les modèles cellulaires (ou animaux) et approches expérimentales mises en œuvre.

La démonstration qu'après stimulation par l'insuline, les protéines de la voie IRS/PI3K/Akt sont recrutées, phosphorylées et/ou activées d'abord dans la membrane plasmique puis dans les endosomes, milite en faveur de l'implication séquentielle de ces deux compartiments dans la signalisation, au moins dans le foie. Toutefois, une co-internalisation d'Akt avec le récepteur de l'insuline et le complexe IRS/PI3K n'a pas été rigoureusement établie, et une translocation directe d'Akt du cytosol aux endosomes, induite/facilitée par l'adaptateur APPL1, doit être considérée. Les endosomes exprimant cet adaptateur ont en effet été impliqués dans l'activation d'Akt par d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, notamment TrkA, le récepteur du NGF (Sorkin *et al.*, 2009). Les conséquences de la surexpression et de la déplétion de la GTPase Rab5 et de ses effecteurs APPL1 et WDFY2 sur l'activation d'Akt et les effets relayés par Akt dans des modèles cellulaires et animaux militent en faveur d'une implication physiologique de la signalisation endosomale dans ces effets.

La mise en évidence d'une activation par l'insuline des composants de la voie Ras/Raf/Mek/Erk dans les endosomes de fibroblastes surexprimant le récepteur est en faveur de leur implication dans l'activation de cette voie, comme l'est la diminution de la phosphorylation de Shc et de l'activation de Erk dans des cellules d'hépatome exprimant un mutant dominant négatif de la dynamine. Cependant, à la différence de l'EGF, l'insuline n'active pas la voie de signalisation Ras/Raf/Mek/Erk dans les endosomes de foie, sans doute en raison du temps de résidence plus bref et du recyclage rapide du récepteur de l'insuline vers la membrane plasmique, relativement au récepteur de l'EGF.

*Remerciements.* Les auteurs remercient Anne-Françoise Burnol pour sa lecture critique du manuscrit.

## Références

- Asante-Appiah E., Kennedy P.P., Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulation of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284, E663-670.
- Authier F., Di Guglielmo G., Danielsen G.M., Bergeron J.J.M., Uptake and metabolic fate of [HisA8, HisB4,

- GluB10, HisB27] insulin in rat liver *in vivo*. *Biochem J*, 1998, 332, 421–430.
- Authier F., Metioui M., Fabrega S., Kouach M., Briand G. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D. *J Biol Chem*, 2002, 277, 9437–9446.
- Authier F., Merlen C., Amessou M., Danielsen G.M., Use of high affinity insulin analogues to assess the functional relationships between insulin receptor trafficking, mitogenic signaling and mRNA expression in rat liver. *Biochimie*, 2004, 86, 157–166.
- Baass P.C., Di Guglielmo G.M., Authier F., Posner B.I., Bergeron J.J.M., Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol*, 1995, 5, 465–470.
- Backer J.M., Kahn C.R., White M.F., Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor during insulin stimulated internalization in rat hepatoma cells. *J Biol Chem*, 1989, 264, 1694–1701.
- Balbis A., Baquiran G., Bergeron J.J., Posner B.I., Compartmentalization and insulin-induced translocations of insulin receptor substrates, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase B in rat liver. *Endocrinology*, 2000, 141, 4041–4049.
- Balbis A., Baquiran G., Dumas, V., Posner B.I., Effect of inhibiting vacuolar acidification on insulin signaling in hepatocytes. *J Biol Chem*, 2004, 279, 12777–12785.
- Bevan A.P., Burgess J.W., Drake P.G., Shaver A., Bergeron J.J.M., Posner B.I., Selective activation of the rat hepatic endosomal insulin receptor kinase. Role for the endosome in insulin signaling. *J Biol Chem*, 1995, 270, 10784–10791.
- Bevan A.P., Krook A., Tikerpae J., Seabright P.J., Siddle K., Smith G.D., Chloroquine extends the lifetime of the activated insulin receptor complex in endosomes. *J Biol Chem*, 1997, 272, 26833–26840.
- Bilaladeau N., Fiset A., Boulanger M.-C., Bhardwaj S., Winstall E., Lavoie J.N., Faure R.L., Proteomic analysis of Src family kinases signaling complexes in Golgi endosomal fractions using a site-selective anti-phosphotyrosine antibody: identification of LRP1-insulin receptor complexes. *J Proteome Res*, 2010, 9, 708–717.
- Boubekeur S., Boute N., Pagesy P., Zilberfarb V., Christeff N., Issad T., A new highly efficient substrate trapping mutant of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) reveals full activation of the insulin receptor precursor. *J Biol Chem*, 2011, 286, 19373–19380.
- Boute N., Boubekeur S., Lacasa D., Issad T., Dynamics of the interaction between the insulin receptor and tyrosine phosphatase 1B in living cells. *EMBO Rep*, 2003, 4, 313–319.
- Burgess J.W., Wada I., Ling N., Khan M.N., Bergeron J.J.M., Posner B.I., Decrease in  $\beta$ -subunit phosphotyrosine correlates with internalization and activation of the endosomal insulin receptor kinase. *J Biol Chem*, 1992, 267, 10077–10086.
- Caruso M., Miele C., Oliva A., Condorelli G., Oriente F., Riccardi G., Capaldo B., Fiory F., Accili D., Formisano P., Beguinot F., The IR1152 mutant insulin receptor selectively impairs insulin action in skeletal muscle but not liver. *Diabetes*, 2000, 49, 1194–1202.
- Ceresa B.P., Kao A.W., Santeler S.R., Pessin J.F., Inhibition of clathrin-mediated endocytosis attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol*, 1998, 18, 3862–3870.
- Cheng K.K., Iglesias M.A., Lam K.S., Wang Y., Sweeney G., Zhu, W., Vanhoutte P.M., Kraegen E.W., Xu A., APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes *via* Akt activation in mice. *Cell Metab*, 2009, 9, 417–427.
- Cheng K.K., Lam K.S., Wang Y., Wu D., Zhang M., Wang B., Li X., Hoo R.L., Huang Z., Sweeney G., Xu A., TRAF-6 mediated ubiquitination of APPL1 enhances hepatic actions of insulin by promoting the membrane translocation of Akt. *Biochem J*, 2013, 455, 207–216.
- Clark S.F., Martin S., Carozzi A.J., Hill M.M., James D.E., Intracellular localization of phosphatidylinositol 3-kinase and insulin receptor substrate-1 in adipocytes: potential involvement of a membrane skeleton. *J Cell Biol*, 1998, 140, 1211–1225.
- Cromlish W.A., Tang M., Kyskan R., Tran L., Kennedy B.P., PTP1B-dependent insulin receptor phosphorylation/residency in the endocytic recycling compartment of CHO-IR cells. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72, 1279–1292.
- Desbuquois B., Chauvet G., Kouach M., Authier J., Cell itinerary and metabolic fate of proinsulin in rat liver: *In vivo* and *in vitro* studies. *Endocrinology*, 2003, 144, 5308–5321.
- Desbuquois B., Béréziat V., Authier F., Girard J., Burnol A.F., Compartmentalization and *in vivo* insulin-induced translocation of the insulin-signaling inhibitor Grb14 in rat liver. *FEBS J*, 2008, 275, 4363–4377.
- Di Guglielmo G.M., Baass P.C., Ou W.J., Posner B.I., Bergeron J.J.M., Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J*, 1994, 13, 4269–4277.
- Dombrowski L., Faure R., Marette A., Sustained activation of insulin receptors internalized in Glut4 vesicles of insulin-stimulated skeletal muscle. *Diabetes*, 2000, 49, 1772–1782.
- Drake P.G., Balbis A., Wu J., Bergeron J.J., Posner B.I., Association of phosphatidylinositol 3-kinase with the insulin receptor: compartmentation in rat liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, E266–274.
- Faure R., Baquiran G., Bergeron J.J.M., Posner B.I., The dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors. Role of endosome-associated phosphotyrosine phosphatases. *J Biol Chem*, 1992, 267, 11215–11221.
- Fiory F., Oriente F., Miele C., Romano C., Trencia A., Alberobello A.T., Esposito I., Valentino R., Beguinot F., Formisano P., Protein kinase C and protein kinase B regulate distinct steps of insulin endocytosis and intracellular sorting. *J Biol Chem*, 2004, 279, 11137–11145.

- Flinn R.J., Yan Y., Goswami S., Parker P.J., Backer J.M., The late endosome is essential for mTORC1 signaling. *Mol Biol Cell*, 2010, 21, 833.
- Formisano P., Oriente F., Miele C., Caruso M., Auricchio R., Vigliotta G., Condorelli G., Beguinot F., In NIH-3T3 fibroblasts, insulin receptor interaction with specific protein kinase C isoforms controls receptor intracellular routing. *J Biol Chem*, 1998, 273, 13197–13202.
- Hamer I., Foti M., Emkey R., Cordier-Bussat M., Philippe J., De Meyts P., Mauder C., Kahn C.R., Carpentier J.L., An arginine to cysteine(252) mutation in insulin receptors from a patient with severe insulin resistance inhibits receptor internalization but preserves signaling events. *Diabetologia*, 2002, 45, 657–667.
- Hansen B.F., Danielsen G.M., Drejer K., Sørensen A.R., Wiberg F.C., Klein H.H., Lundermose A.G., Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J*, 1996, 315, 271–279.
- Heller-Harrison R.A., Morin M., Czech M.P., Insulin regulation of membrane-associated insulin receptor substrate 1. *J Biol Chem*, 1995, 270, 24442–24450.
- Hunker C.M., Kruk I., Hall J., Gambini H., Veisaga M.L., Barbieri M.A., Role of Rab5 in insulin receptor-mediated endocytosis and signaling. *Arch Biochem Biophys*, 2006a, 449, 130–143.
- Hunker C.M., Gambini H., Galvis A., Hall J., Kruk I., Veisaga M.L., Barbieri M.A., Rin1 regulates insulin receptor signal transduction pathways. *Exp Cell Res*, 2006b, 312, 1106–1114.
- Inoue G., Cheatham B., Emkey R., Kahn C.R., Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin receptor substrate (IRS1 and IRS2). *J Biol Chem*, 1998, 273, 11548–11555.
- Issad T., Boute M., Boubekeur S., Lacasa D., Interaction of PTP1B with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimie*, 2005, 87, 111–116.
- Jedrychowski M.P., Gartner C.A., Gygi S.P., Zhou L., Herz J., Kandror K.V., Pilch P.F., Proteomic analysis of Glut4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *J Biol Chem*, 2010, 285, 104–114.
- Kao A.W., Ceresa B.P., Santeler S.R., Pessin J.E., Expression of a dominant interfering dynamin mutant in 3T3L1 adipocytes inhibits Glut4 endocytosis without affecting insulin signaling. *J Biol Chem*, 1998, 273, 25450–25457.
- Kelly K.L., Ruderman N.B., Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185 kDa tyrosine phosphorylation protein (IRS1) and localization in a low density membrane vesicle. *J Biol Chem*, 1993, 268, 4391–4398.
- Khan M.N., Baquiran G., Brule C., Burgess J., Foster B., Bergeron J.J.M., Internalization and activation of the rat liver insulin receptor kinase *in vivo*. *J Biol Chem*, 1989, 264, 12391–12940.
- Klein H.H., Freidenberg G.R., Mattheill S., Olefsky J.M., Insulin receptor kinase following internalization in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 1987, 262, 10557–10564.
- Knight J.B., Cao K.T., Gibson V., Olson A.L., Expression of a prenylation-deficient Rab4 interferes with propagation of insulin signaling through insulin receptor substrate 1. *Endocrinology*, 2000, 141, 208–218.
- Kouach M., Desbuquois B., Authier F., Endosomal proteolysis of internalized [ArgA0]-human insulin at neutral pH generates the mature insulin peptide in rat liver *in vivo*. *Diabetologia*, 2009, 52, 2621–2632.
- Kublaoui B., Lee J., Pilch P.F., Dynamics of signaling during insulin-stimulated endocytosis of its receptor in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, 270, 59–65.
- Li C., Baquiran G., Gu F., Tremblay M.L., Fazel A., Bergeron J.J.M., Posner B.I., Insulin receptor kinase-associated phosphotyrosine phosphatases in hepatic endosomes: assessing the role of phosphotyrosine phosphatase-1B. *Endocrinology*, 2006, 147, 912–918.
- Morcavallo A., Genua M., Palumbo A., Kletvikova E., Jiracek J., Brzozowski A.M., Iozzo R.V., Belfiore A., Morrione A., Insulin and insulin-like growth factor II differentially regulate endocytic sorting and stability of insulin receptor isoform A. *J Biol Chem*, 2012, 287, 11422–11436.
- Murphy J.E., Padilla B.E., Hasdemir B., Cottrelli G.S., Bunnett N.W., Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, 17615–17622.
- Navé B.T., Haigh R.J., Hayward A.C., Siddle K., Shepherd P.R., Compartment-specific regulation of phosphoinositides 3-kinase by platelet-derived growth factor and insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, 1996, 318, 55–60.
- Pedersen D.J., Diakanastasis B., Stöckli J., Schmitz-Peiffer C. Protein kinase C $\epsilon$  modulates insulin receptor localization and trafficking in mouse embryonic fibroblasts. *Plos One*, 2013, 8, e58046.
- Platta H.W., Stenmark H., Endocytosis and signaling. *Curr Op Cell Biol*, 2011, 23, 393–403.
- Pol A., Calvo M., Enrich C., Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS J*, 1998, 441, 34–38.
- Posner B.I., Laporte S.A., Cellular signaling: peptide hormones and growth factors. *Prog Brain Res*, 2010, 181, 1–16.
- Ricort J.M., Tanti J.F., Van Obberghen E., Le Marchand-Brustel Y., Different effects of insulin and platelet-derived growth factor on phosphatidylinositol 3-kinase at the subcellular level in 3T3-L1 adipocyte. A possible explanation for their specific effects on glucose transport. *Eur J Biochem*, 1996, 239, 17–22.
- Rizzo M.A., Shome K., Watkins S.C., Romero G., The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem*, 2000, 275, 23911–23918.

- Rizzo M.A., Kraft C.A., Watkins S.C., Levitan E.S., Romero G., Agonist-dependent traffic of raft-associated Ras and Raf-1 is required for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, 2001, 276, 34928–34933.
- Romsicki Y., Reece M., Gauthier J.-Y., Asante-Appiah E., Kennedy B.P., Protein tyrosine phosphatase-1B dephosphorylation of the insulin receptor occurs in a perinuclear endosome compartment in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*, 2004, 279, 12868–12875.
- Saito T., Jones C.C., Huang S., Czech M.P., Pilch P.F., The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem*, 2007, 282, 32280–32287.
- Sasaoka T., Wada T., Ishihara H., Takata Y., Haruta T., Usui I., Ishiki M., Kobayashi M., Synergistic role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase cascade in the regulation of insulin receptor trafficking. *Endocrinology*, 1999, 140, 3826–3834.
- Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012, 3, 34.
- Smith R.M., Harada S., Smith J.A., Zhang S., Jarett L., Insulin-induced protein tyrosine phosphorylation cascade and signaling molecules are localized in a caveolin-enriched cell membrane domain. *Cell Signal*, 1998, 10, 355–362.
- Sorkin A., von Zastrow M., Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3, 600–614.
- Sorkin A., von Zastrow M., Endocytosis and signaling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10, 609–622.
- Stenmark H., Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10, 513–525.
- Stuible M., Tremblay M.L., In control at the ER: PTP1B and the down-regulation of RTKs by dephosphorylation and endocytosis. *Trends Cell Biol*, 2010, 20, 672–679.
- Su X., Lodhi I.J., Saltiel A.R., Stahl P.D., Insulin-stimulated interaction between insulin receptor substrate 1 and p85 $\alpha$  and activation of protein kinase B/Akt require Rab5. *J Biol Chem*, 2006, 281, 27982–27990.
- Uhles S., Moede T., Leibiger B., Berggren P.U., Leibiger I.B., Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor signaling. *FASEB J*, 2007, 21, 1609–1621.
- Walz H.A., Shi X., Chouinard M., Bue C.A., Navaroli D.M., Hayakawa A., Zhou Q.L., Nadler J., Leonard D.M., Corvera S., Isoform-specific regulation of Akt signaling by the endosomal protein WDFY2. *J Biol Chem*, 2010, 285, 14101–14108.
- Zoncu R., Perera R.M., Balkin D.M., Pirruccello M., Toomre D., De Camilli P., A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell*, 2009, 136, 1110–1121.
- Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M., mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12, 21–35.