

Invalidation chez la souris de gènes susceptibles d'être impliqués dans les diabètes non-insulinodépendants

La transmission intracellulaire du signal par le récepteur de l'insuline conduit aux effets métaboliques vitaux de l'insuline. Les trois tissus cibles majeurs pour l'action de l'insuline dans la régulation du métabolisme énergétique sont le muscle, le foie et le tissu adipeux. L'action de l'insuline dans les autres tissus reste moins bien documentée.

Dans l'espèce humaine, les diabètes non-insulinodépendants se caractérisent par une résistance à l'insuline et une défaillance des cellules β du pancréas, et touchent à des degrés divers plusieurs dizaines de millions d'individus dans le monde. Des mutations dans un grand nombre de gènes pourraient altérer la sécrétion ou l'action de l'insuline [1]. En outre, différentes combinaisons de défauts de structure ou d'expression de ces gènes pourraient rendre compte de l'hétérogénéité de la physiopathologie des diabètes non-insulinodépendants.

Les efforts portant sur la recherche de mutations dans le gène du récepteur de l'insuline (*INSR*) ont été particulièrement fructueux dans le cas de sujets ayant une résistance extrême à l'insuline associée à des syndromes graves puisque de nombreuses mutations dans ce gène ont déjà été identifiées. Il a été clairement démontré que certaines formes mutées du récepteur de l'insuline ont des propriétés biochimiques et biologiques altérées. Plus récemment, l'existence de mutations nulles dans *INSR* à l'état homozygote a été démontrée chez un fœtus mort *in utero* ainsi que chez quelques nouveaux-nés (*m/s* n° 10, vol. 9, p. 1139)

[2-5]. Cela a été une surprise de constater que l'absence du récepteur de l'insuline pouvait être compatible avec la vie embryonnaire, et même postnatale, dans la mesure où celui-ci est présent de façon ubiquitaire dans l'organisme et qu'il apparaît très tôt au cours du développement. Les enfants dépourvus de récepteur de l'insuline manifestent toutefois de graves anomalies de la croissance et du développement, ainsi que du métabolisme. On peut s'interroger sur l'existence d'une voie alternative par laquelle l'insuline pourrait, au moins très partiellement, exercer ses effets biologiques.

Afin d'obtenir un modèle animal pour l'étude de diverses affections résultant de l'absence du récepteur de l'insuline, Accili *et al.* [6] et Joshi *et al.* [7] ont employé l'approche de la recombinaison homologe pour invalider *Insr* chez la souris.

Insr a une taille supérieure à 120 kb et comporte 22 exons. Le produit de ce gène est un grand précurseur qui, après clivage protéolytique, engendre les sous-unités α et β du récepteur. Ces sous-unités sont glycosylées et forment des hétérodimères $\alpha_2\beta_2$ qui migrent vers la surface de la cellule (figure 1).

Les vecteurs de remplacement utilisés pour invalider *Insr* ont permis, soit d'introduire un codon de terminaison de la traduction dans l'exon 4, soit de déléter la partie de *Insr* comprenant l'exon 2. Le croisement de souris hétérozygotes a donné naissance à des souris homozygotes avec des fréquences indiquant qu'il n'y a pas de létalité embryonnaire évidente. L'absence du récepteur de l'insu-

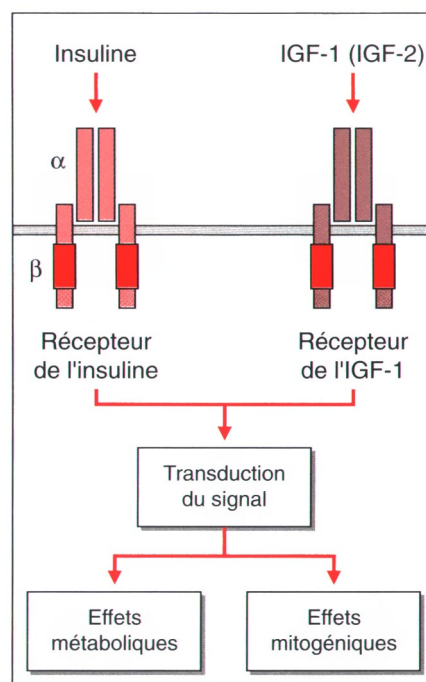


Figure 1. **Les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1** sont composés de deux types de sous-unités, α et β . La chaîne α est exclusivement extracellulaire et comporte le site de fixation du ligand. La chaîne β possède un court domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui porte une activité tyrosine kinase. La forme fonctionnelle du récepteur est un hétérodimère $\alpha_2\beta_2$ et les chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfure. La transmission intracellulaire du signal résultant de l'activation de ces deux types de récepteurs conduit à un certain nombre d'effets métaboliques et mitogéniques dont certains sont communs et d'autres spécifiques.

line chez les souris homozygotes a confirmé que celles-ci ont une mutation nulle dans *Insr*.

Les souris hétérozygotes sont normales et fertiles, et aucune intolérance au glucose n'est constatée après hyperglycémie provoquée. Cette situation est différente de celle observée chez l'homme. En effet, bien que les parents dont les enfants sont dépourvus du récepteur de l'insuline soient normaux, ils manifestent une intolérance au glucose.

Il est encore plus étonnant de constater que les souris homozygotes sont d'apparence normale à la naissance dans la mesure où de graves anomalies du développement ont été observées chez les enfants homozygotes pour la mutation nulle dans *INSR*. On peut même se demander si certaines affections chez ces enfants dépourvus de récepteur de l'insuline ne seraient pas dues à d'autres défauts génétiques. Toutefois, les souris homozygotes pour la mutation qui ont été obtenues pour l'instant ont un fond génétique C57B1/6 ou B6D2F1 et il serait intéressant d'examiner si le développement intra-utérin en l'absence du récepteur de l'insuline serait anormal chez des souris ayant d'autres fonds génétiques, tels que celui de la lignée 129. Une telle situation a déjà été observée, en particulier pour des souris dépourvues de récepteur de l'EGF [8].

C'est seulement quelques heures après la naissance et le début de l'allaitement qu'une série de troubles métaboliques postnatals apparaissent chez les souris homozygotes. Une hyperglycémie extrême associée à une hyperlipidémie conduisent à une acidocétose diabétique et à une stéatose hépatique. L'hyperglycémie entraîne également une hyperinsulinémie. La glycémie de ces souris à jeun reste élevée. On peut noter aussi une réduction du glycogène hépatique. Les anomalies éventuelles du métabolisme lipidique des cellules adipeuses restent à étudier. En outre, ces souris développent une hypotrophie des muscles et un retard de croissance postnatal qui peut devenir dramatique, le poids des souriceaux homozygotes pouvant être inférieur de 30-40% à celui des hétérozygotes ou des animaux normaux. Tous les

souriceaux dépourvus de récepteur de l'insuline meurent dans la semaine qui suit la naissance. Les désordres métaboliques chez les enfants homozygotes pour la mutation nulle dans *INSR* sont très différents: hypoglycémie extrême à jeun, hyperinsulinémie pouvant être dix fois plus élevée que chez les souris homozygotes, hyperglycémie postprandiale avec un diabète peu prononcé.

Le récepteur de l'insuline et le récepteur de l'IGF-1 (qui sert de médiateur également à l'activité de l'IGF-2) font tous les deux partie de la famille des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase et sont très semblables. Leur activation conduit à des effets métaboliques et mitogéniques, dont certains sont communs et d'autres spécifiques de l'un ou l'autre récepteur. Tous les travaux effectués jusqu'à présent indiquent que les deux récepteurs recrutent les mêmes voies pour la transduction intracellulaire du signal. Un des mécanismes de transmission du signal passe par l'activation du domaine tyrosine kinase de ces récepteurs qui phosphoryle des protéines intermédiaires telles que IRS-1, IRS-2 (*insulin receptor substrate*) et Shc. Ces protéines d'ancrage fixent alors des protéines effectrices qui comportent des domaines SH2 et activent différentes voies de signalisation (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1126*) [9]. Certaines de ces protéines effectrices peuvent aussi se lier directement à ces récepteurs activés pour, éventuellement, moduler certaines voies de transmission. Les bases moléculaires de la spécificité de transmission du signal par chacun des deux récepteurs nous échappent encore en grande partie. Elles pourraient résider dans des différences de cinétique d'activation ou d'affinité pour certaines des protéines cellulaires impliquées dans la voie de transmission.

La situation se complique encore du fait que l'insuline peut se lier au récepteur de l'IGF-1 et les IGF au récepteur de l'insuline avec, toutefois, des affinités plus faibles que pour leur récepteur homologue respectif. Par ailleurs, l'existence de récepteurs hétéropolymériques insuline/IGF-1 a également été démontrée. Bien qu'il reste encore à déterminer si de tels récepteurs jouent un quelconque rôle fonctionnel, des interférences fonc-

tionnelles croisées entre le récepteur de l'insuline et le récepteur de l'IGF1 pourraient en résulter. Pour ces diverses raisons, l'analyse des effets biologiques spécifiques résultant de l'activation de ces deux récepteurs reste encore difficile car la plupart des cellules en possèdent les deux types. D'autre part, on peut se demander dans quelle mesure le récepteur de l'IGF-1 peut représenter un récepteur alternatif capable d'induire certains effets de l'insuline. Les souris dépourvues de l'un ou l'autre de ces récepteurs permettent d'aborder ces questions sous un jour nouveau.

Des souris portant une mutation nulle du gène du récepteur de l'IGF-1 à l'état homozygote ont un phénotype léthal postnatal précoce [10]. L'absence du récepteur de l'IGF-1 conduit à un retard de croissance intra-utérin associé à des anomalies de la différenciation du muscle, du système nerveux central, de l'os et de l'épiderme. Il semble donc que le récepteur de l'insuline ne puisse pas compenser l'absence du récepteur de l'IGF-1, tout du moins en ce qui concerne certains effets mitogéniques vitaux de ce dernier.

La létalité postnatale des souris dépourvues de récepteur de l'insuline indique que, chez la souris, le récepteur de l'IGF-1 ne peut pas non plus compenser l'absence du récepteur de l'insuline pour certains effets métaboliques vitaux de ce dernier.

Nous avons vu que les troubles résultant de l'absence du récepteur de l'insuline diffèrent chez la souris de ceux observés chez l'homme et il sera intéressant de comprendre les bases moléculaires de ces différences. Notre modèle animal nous permettra peut-être de déterminer la contribution à la genèse des troubles de la défaillance de chacun des trois tissus cibles majeurs de l'insuline. Ce modèle animal peut, également, servir à tester différentes stratégies visant à corriger le phénotype pathologique. Par ailleurs, la transmission du signal et les effets biologiques relayés spécifiquement par le récepteur de l'IGF-1, pourront être étudiés *in vivo* et *ex vivo*, en particulier après établissement de cultures cellulaires. L'invalidation du gène codant pour le récepteur de l'insuline est la der-

nière en date dans ce système : récemment, les gènes codant pour la gluco-kinase (GK), IRS-1 et le transporteur de glucose GLUT4 ont également été invalidés chez la souris [11-16]. En outre, comme une alternative à l'invalidation de gènes, l'approche antisens a également été employée pour bloquer l'expression du gène du transporteur de glucose GLUT2 chez des souris transgéniques [17]. Le phénotype de ces souris est brièvement décrit ci-dessous et certaines de leurs caractéristiques sont résumées dans le *Tableau I*.

GK et GLUT2 ont été impliqués dans la régulation de la sécrétion de l'insuline par le glucose. Les souris hétérozygotes pour une mutation nulle dans le gène de GK sont hyperglycémiques, leur capacité de sécréter l'insuline est diminuée et elles font preuve d'intolérance au glucose. La production de glucose hépatique

persiste, même dans des conditions d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie, et l'incorporation du glucose dans le glycogène est diminuée. Ces souris ont un diabète léger. En revanche, il existe chez les souris homozygotes une hyperglycémie extrême et un diabète très prononcé. Les niveaux du cholestérol et des triglycérides dans le sérum sont également élevés. Au niveau du foie, l'absence de GK s'accompagne d'une réduction de la quantité de glycogène stocké et d'une stéatose. Les souris dépourvues de GK sont plus petites et peuvent survivre jusqu'à 3 à 5 jours après la naissance. Il a été établi que l'induction de la sécrétion d'insuline par le glucose est défectueuse dans les îlots provenant des souris dépourvues de GK, démontrant clairement un rôle de GK dans ce processus. Une des équipes a observé une létalité embryonnaire au

jour 9,5 de la gestation des souris dépourvues de GK [12]. On ignore pour le moment le rôle possible de GK au cours du développement. Enfin, il a été montré que l'expression de l'ADNc codant pour GK dans les cellules β des souris dépourvues de GK suffit à leur survie.

En ce qui concerne GLUT2, des souris transgéniques ayant une réduction de 80 % de la protéine dans les cellules β ont été obtenues. Ces souris ont une hyperglycémie et leurs tests de tolérance au glucose sont anormaux. Il a été montré que la sécrétion de l'insuline par le glucose est diminuée dans les îlots préparés à partir de ces souris.

IRS-1 est l'une des protéines intermédiaires clés dans la transmission du signal par le récepteur de l'insuline. Les souris dépourvues de IRS-1 ont un retard de croissance intra-utérin et postnatal mais n'ont pas de

Tableau I
INVALIDATION DE GÈNES CHEZ LA SOURIS POUR OBTENIR DES MODELES ANIMAUX DE DIABÈTES NON-INSULINODÉPENDANTS

Gènes de protéines impliquées dans la sécrétion ou l'action de l'insuline	Certaines caractéristiques du phénotype des souris mutantes						Références
	Génotype	Viabilité	Désordres métaboliques	Résistance à l'insuline	Intolérance au glucose	Diabète	
GK	+/- -/-	viable létalité postnatale (ou embryonnaire; retard de croissance)	hyperglycémie hyperglycémie cholestérol et triglycérides élevés dans le sérum	- -	oui -	oui (léger) oui	[11-13]
Récepteur de l'insuline	-/*	létalité postnatale (retard de croissance postnatale)	hyperglycémie hyperinsulinémie hyperlipidémie acidocétose hyperglycémie à jeun	-	-	oui	[6, 7]
IRS-1	-/*	viable (retard de croissance embryonnaire et postnatale)	aucun	oui	oui	non	[14-15]
GLUT4	-/*	viable (retard de croissance postnatale longévité réduite)	Hypoglycémie à jeun et hyperglycémie postprandiale chez le mâle; hyperinsulinémie postprandiale chez le mâle et la femelle; lactate, acides gras libre et β - hydroxybutyrate diminués dans le sérum	oui	non	non	[16]

* Les souris hétérozygotes pour la mutation nulle ne montrent aucune anomalie évidente.

troubles métaboliques importants. Seules sont notées une légère intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Cela suggère que IRS-2, homologue de IRS-1, peut pour une large part, remplacer ce dernier.

GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux est le principal transporteur de glucose insulino-dépendant [18]. On pouvait donc penser que l'absence de GLUT4 perturberait considérablement l'homéostasie du glucose (*m/s n° 4, vol. 9, p. 481*). Il a été très surprenant de constater que les souris dépourvues de GLUT4 ne sont pas du tout diabétiques. Il existe chez ces souris une faible hypoglycémie à jeun et une légère hyperglycémie postprandiale seulement chez le mâle. On note également une hyperinsulinémie postprandiale chez le mâle et la femelle indiquant une résistance à l'insuline, ce qui est aussi observé dans les tests de tolérance au glucose. L'absence de GLUT4 engendre toutefois certaines perturbations dans le métabolisme du glucose et des lipides. Par exemple, les concentrations de lactate, d'acides gras libres et de β -hydroxybutyrate dans le sérum d'animaux à jeun sont diminués. Il existe chez ces souris une diminution très marquée des dépôts du tissu adipeux. Enfin, l'absence de GLUT4 conduit à un retard de croissance, une longévité réduite (5 à 7 mois) probablement due à une hypertrophie cardiaque.

En conclusion, l'application de la recombinaison homologue pour invalider d'autres gènes impliqués dans la sécrétion ou l'action de l'insuline devrait permettre d'obtenir d'autres modèles animaux permettant de mieux comprendre la pathogénie des différents diabètes non-insulino-dépendants et les mécanismes de résistance à l'insuline. De tels modèles animaux devraient également guider les recherches de mutations dans divers gènes impliqués dans les maladies humaines ■

Rajiv L. Joshi
Jacques Jami

ICGM, Inserm U. 257, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

R.L. Joshi.

RÉFÉRENCES

1. Froguel P, Vionnet N, Gauguier D, Vaxillaire M, Zouali H, Passa P, Velho G. Génétique du diabète non insulino-dépendant. *médecine/sciences* 1994; 10: 795-804.
2. Krook A, Brueton L, O'Rahilly S. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene in infant with leprechaunism. *Lancet* 1993; 342: 277-8.
3. Psiachou H, Mitton S, Alagband-Zadeh J, Hone J, Taylor SI, Sinclair L. Leprechaunism and homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene. *Lancet* 1993; 342: 924.
4. Wertheimer E, Lu S P, Backeljauw PF, Davenport ML, Taylor SI. Homozygous deletion of the human insulin receptor gene results in leprechaunism. *Nature Genet* 1993; 5: 71-3.
5. Hone J, Accili D, Psiachou H, Alghband-Zadeh J, Mitton S, Wertheimer E, Sinclair L, Taylor SI. Homozygosity for a null allele on the insulin receptor gene in a patient with leprechaunism. *Hum Mutat* 1995; 6: 17-22.
6. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI and Westphal H. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nature Genet* 1996; 12: 106-9.
7. Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J* 1996; 15: 1542-7.

8. Sibilia M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; 269: 234-8.

9. Chardin P. Domaines SH2 et SH3: un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *médecine/sciences* 1994; 10: 709-12.

10. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Roberston EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (IGF1r). *Cell* 1993; 75: 59-72.

11. Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic β cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* 1995; 83: 69-78.

12. Bali D, Svetlanov A, Han-Woong L, Fusco-DeMane D, Leiser M, Li B, Barzilai N, Surana M, Hou H, Fleischer N, DePinho R, Rossetti L, Efrat S. Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 21464-7.

13. Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, Kasai H, Suzuki H, Ueda O, Kamada N, Jishage K, Komeda K, Noda M, Kanazawa Y, Tamiguchi S, Miwa I, Akanuma Y, Komada T, Yazaki Y, Kadowaki T. Pancreatic β -cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 30253-6.

14. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag III B, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372: 186-90.

15. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioaka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372: 182-6.

16. Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 1995; 377: 151-5.

17. Valera A, Solanes G, Fernandez-Alvarez J, Pujol A, Ferrer J, Asins G, Gomis R, Bosch F. Expression of GLUT-2 antisense RNA in β cells of transgenic mice leads to diabetes. *J Biol Chem* 1994; 269: 28543-6.

18. Guerre-Millo M. Les transporteurs d'hexoses. *médecine/sciences* 1995; 11: 1111-9.