



**HAL**  
open science

# Étude des mécanismes de libération du propeptide de la sortiline et de ses effets sur l'homéostasie glucidique

Céline Hivelin

► **To cite this version:**

Céline Hivelin. Étude des mécanismes de libération du propeptide de la sortiline et de ses effets sur l'homéostasie glucidique. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4109 . tel-01486112

**HAL Id: tel-01486112**

**<https://theses.hal.science/tel-01486112>**

Submitted on 9 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Nice Côte d'Azur  
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

## **THESE**

Présentée pour obtenir le titre de  
**Docteur en Sciences de la Vie**  
De l'Université Côte d'Azur  
Mention Interactions Moléculaires et Cellulaires

Présentée et soutenue le 6 décembre 2016, à 14h30,  
A l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire par :

**Céline HIVELIN**

# **Etude des mécanismes de libération du propeptide de la sortiline et de ses effets sur l'homéostasie glucidique**

## Jury

Pr. Jacques NOEL

Pr. Amar ABDERRAHMANI

Dr. Stéphane DALLE

Dr. Thierry COPPOLA

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger mon travail de thèse. Merci au Pr. Jacques Noël d'avoir accepté de présider ce jury, merci aux rapporteurs, le Pr Amar Abderhamani et le Dr. Stéphane Dalle.

Je remercie sincèrement le Dr. Jean Mazella de m'avoir accueilli dans son équipe. Ton expertise technique et tes conseils rédactionnels m'ont beaucoup aidé au cours de ma thèse. Grâce à toi, le pipelage n'a plus de secret pour moi !

Thierry, je te remercie sincèrement pour tout. Tu m'as aidé à obtenir cette « fameuse » bourse du Ministère. Dès mon arrivée au labo, tu m'as laissé être autonome et responsable de mes manip. Malgré des résultats parfois décevants, tu as toujours été présent pour y voir du positif et m'inciter à continuer et à persévérer.

Je remercie bien sûr chacun des membres de l'équipe. Sophie, pour nos virées au cheval et en congrès. Christelle, pour nos échanges scientifiques, et les autres, moins scientifiques !! Morgane, pour avoir pris le temps de m'enseigner l'art de la manipulation des souris. Sébastien, pour avoir été un super voisin de bureau pendant trois ans. Bon courage pour ta dernière année et pour la suite !!

Sandy, tu es l'une de mes meilleures rencontres dans cet institut. Toujours à l'écoute et présente, dans les bons comme dans les mauvais moments. J'espère sincèrement (mais je ne me fais pas trop de souci pour toi !!) que se passera bien pour toi et que tu réussiras dans tous tes projets. Une nouvelle vie de post-doc en Allemagne t'attend, alors bon vent !!

Frank, si on m'avait dit que je te rencontrerai pendant ma thèse, je n'y aurais sans doute pas cru. Merci d'être présent au quotidien, de m'aider et de me soutenir. Sans toi, cette dernière année de thèse n'aurait pas été aussi facile à vivre. Sincèrement, merci d'être là, de me faire rêver et d'illuminer ma vie.

Malika, Céline, Thomas, Audrey, merci d'avoir été présents. Je garde de supers souvenirs de tous nos moments passés ensemble, au resto, en rando et au labo. Je vous souhaite à tous les quatre un bel avenir !!

Un immense merci à ma famille et mes beaux-parents. J'adresse ma plus profonde tendresse à mes parents, toujours présents, toujours compréhensifs et de bons conseils. Depuis 26 ans, vous me soutenez, quels que soient mes choix. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, alors merci. Je vous en serai éternellement reconnaissante et j'espère pouvoir un jour vous rendre la pareille.

Plus largement, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées de près ou de loin durant ces trois années passées à l'institut. Chacun d'entre vous, à sa manière, m'a aidé pendant ma thèse, que ce soit sur le plan scientifique ou humain, alors merci à tous.

# Abréviations

---

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	concentration cytosolique de calcium
AA	acide arachidonique
ABCC8	ATP binding cassette, subfamily C, member 8
AC	adenylate cyclase
ADP	adenosine diphosphate
AGC	cAMP dependent, cGMP dependent protein kinase C
AKAP150	A-kinase-anchoring protein 150
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
APOE	apolipoprotein E
APS	adapter protein with pleckstrin homology and src homology domains
AS160	Akt substrate of 160 kDa
ATP	adenosine triphosphate
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
C/EBP $\alpha$	CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$
Ca <sup>2+</sup>	calcium, ion calcique
CAP	c-Cbl associated protein
CCK	cholecystokinine
CI-MPR	cation-independent mannose 6-phosphate receptor
COP1	coatmer protein complex 1
CREB	cAMP response element binding protein
DAG	diacylglycerol
DPP4	dipeptidyl peptidase-4
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAS	fatty acid synthase
FST	forced swimming test
G6P	glucose-6-phosphate
GAD	glutamate décarboxylase
GAP	GTPase activating protein
GDP	guanosine diphosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GIP	gastric inhibitory polypeptide
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium
GLP-1-R	glucagon-like peptide-1-receptor
GLUT	glucose transporter
GTP	guanosine triphosphate
HFD	high fat diet
IL-6	interleukin-6
INF- $\gamma$	interferon- $\gamma$

IP <sub>3</sub> R	inositol triphosphate receptor
IPMC	Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
IRAP	insulin-regulated aminopeptidase
IRS	insulin receptor substrate
IRV	insulin-responsive vesicle
ISRS	inhibiteur sélectif de la recapture de sérotonine
K <sup>+</sup>	potassium, ion potassique
KCNJ11	K <sup>+</sup> voltage-gated channel, subfamily J, member 11
Kir6.2	K <sup>+</sup> inward-rectifier 6.2
LDLR	low density lipoprotein receptor
LepR	leptine receptor
LPL	lipoprotein lipase
LRP1	low density lipoprotein receptor related protein 1
Mg <sup>2+</sup>	magnesium, ion magnesium
MRF	myogenic regulated factor
MTAP2	microtubule-associated protein 2
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na <sup>+</sup>	sodium, ion sodique
NGF	nerve growth factor
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
NTSR	neurotensin receptor
OMS	organisation mondiale de la santé
p75 <sup>NTR</sup>	p75 neurotrophin receptor
PDE3B	phosphodiesterase 3B
PDK1	3-phosphoinositide-dependent kinase 1
PH	pleckstrin homology
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	protein kinase A
PKB/Akt	protein kinase B
PLC	phospholipase C
PP	pancreatic polypeptide
PPAR <sub>γ2</sub>	peroxisome proliferator-activated protein $\gamma_2$
PSD-95	postsynaptic density-95
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAP	receptor-associated protein
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique
RyR	ryanodine receptor
SAP	sphingolipid activator protein

SCD-1	stearoyl-CoA desaturase-1
SEM	standard error of the mean
SERCA	sarco-endoplasmique reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SGLT	sodium glucose linked transporter
SH2	src homology 2
SNAP-25	synaptosomal associated protein-25
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor
SUR1	sulfonylurea receptor 1
TALK	TWIK-related alkaline pH-activated K <sup>+</sup>
TASK	tandem-pore acid-sensing K <sup>+</sup>
THIK	tandem-pore halothane-inhibited K <sup>+</sup>
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TREK	TWIK-related K <sup>+</sup>
TRESK	TWIK-related spinal cord K <sup>+</sup>
TUG	tether containing a UBX domain for Glut4
TWIK	tandem-pore weak inward rectifying K <sup>+</sup>
VAMP-2	vesicle associated membrane protein-2
$\alpha$ -SNAP	$\alpha$ -soluble NSF attachment protein
$\Delta V_m$	différence de potentiel membranaire

# Liste des figures

---

Figure 1 : Evolution de la glycémie en fonction des repas. (* : à jeun).....	2
Figure 2 : L'insuline, maturation et structure. ....	4
Figure 3 : Structure primaire des transporteurs GLUTs. ....	5
Figure 4 : La métabolisation du glucose dans la cellule bêta.....	6
Figure 5 : Régulation des canaux impliqués dans la sécrétion d'insuline. ....	7
Figure 6 : Structure et régulations des canaux $K_{ATP}$ . ....	8
Figure 7 : Structure des canaux $Ca_v$ . ....	10
Figure 8 : La sécrétion biphasique d'insuline. ....	12
Figure 9 : Modulation de la sécrétion d'insuline par les hormones et les neurotransmetteurs. .....	14
Figure 10 : Différenciation de la lignée musculaire murine C2C12.....	17
Figure 11 : Morphologie d'un adipocyte.....	18
Figure 12 : Structure du récepteur de l'insuline et activation. ....	19
Figure 13 : La voie PI3K.....	20
Figure 14 : Boucle de régulation des petites protéines Rab. ....	21
Figure 15 : La voie APS-CAP-c-Cbl. ....	22
Figure 16 : Le trafic de Glut4 dans les cellules insulino-sensibles.....	24
Figure 17 : Structures des canaux potassiques. ....	29
Figure 18 : Le canal TREK-1 et ses partenaires.....	34
Figure 19 : Les différentes régulations de l'activité du canal TREK-1. ....	35
Figure 20 : Régulation de l'activité des canaux TREK-1 par les seconds messagers.....	38
Figure 21 : Voies de signalisation impliquées dans les effets de la morphine.....	39
Figure 22 : Structure des récepteurs de la neurotensine. ....	42
Figure 23 : Structure de la sortiline.....	43
Figure 24 : La maturation de la sortiline. ....	45
Figure 25 : La séquence du propeptide (PE). ....	51
Figure 26 : Le propeptide (PE) inhibe les courants TREK-1 induits par l'acide arachidonique (AA) (d'après (Mazella et al., 2010)). ....	52
Figure 27 : La séquence de la spadine, l'analogue synthétique du PE.....	52



Figure 28 : La spadine inhibe les courants TREK-1 induit par l'acide arachidonique (AA) (d'après (Mazella et al., 2010)).....	53
Figure 29 : Effet de la spadine sur la désignation des rongeurs. ....	54
Figure 30 : Rôle hypothétique du PE dans l'homéostasie glucidique (d'après (Mazella et al., 2012)) .....	56
Figure 31 : La spadine pourrait moduler la sécrétion d'insuline des cellules $\beta$ grâce à un effet sur le canal TREK-1. ....	59
Figure 32 : Effet de la spadine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose des cellules Min6. ....	79
Figure 33 : Les effets de l'exendine-4 (Ex4) et de la spadine (SPA) sur l'activité des canaux TREK-1.....	81
Figure 34 : Sous l'effet de l'insuline, les cellules insulino-sensibles pourraient libérer le PE dans la circulation. ....	83
Figure 35 : Principe du dosage du PE selon la technique Alphascreen <sup>TM</sup> .....	85
Figure 36 : Mesure de la concentration de PE en conditions physiopathologiques.....	106
Figure 37 : La spadine ne stimule pas l'entrée de glucose dans les cellules musculaires squelettiques C2C12.....	108
Figure 38 : Les effets connus et hypothétiques de la spadine. ....	113

# Sommaire

---

*Remerciements*

*Abréviations*

*Liste des figures*

*Sommaire*

<i>Introduction</i> .....	1
<b>Partie 1 : Le contrôle de l'homéostasie glucidique</b> .....	<b>2</b>
I/ La cellule bêta du pancréas, un senseur du glucose sanguin .....	3
A. Organisations structurales et fonctionnelles du pancréas .....	3
1) Localisation et organisation du pancréas .....	3
2) L'insuline .....	3
B. La sécrétion d'insuline, un mécanisme finement régulé .....	4
1) L'importance du glucose dans la sécrétion d'insuline .....	4
a- Les transporteurs de glucose de la cellule bêta .....	4
b- Le métabolisme du glucose dans la cellule bêta.....	6
2) Les canaux ioniques impliqués dans la sécrétion d'insuline.....	7
a- Les canaux K <sup>+</sup> sensibles à l'ATP (canaux K <sub>ATP</sub> ) .....	8
b- Les canaux Ca <sup>2+</sup> sensibles au voltage (canaux Ca <sub>v</sub> ).....	9
c- Autres canaux de la cellule bêta.....	11
3) L'exocytose des vésicules d'insuline .....	11
a- La sécrétion biphasique d'insuline .....	11
b- La régulation de l'exocytose : le modèle SNARE.....	12
4) Les effets modulateurs des hormones et des neurotransmetteurs .....	13
a- Les hormones .....	14
b- Les neurotransmetteurs.....	15
II/ Le stockage de glucose dans les tissus insulino-sensibles.....	16
A. Les tissus insulino-sensibles et leurs fonctions.....	16
1) La cellule musculaire squelettique.....	16
2) L'adipocyte .....	17
B. L'insuline stimule le stockage de glucose dans les cellules insulino-sensibles.....	18
1) Caractéristiques du récepteur de l'insuline .....	18
2) Les voies de signalisation associées au récepteur de l'insuline.....	19

a- La voie de la PI3K.....	19
b- La voie du complexe APS-CAP-c-Cbl .....	22
c- L'extinction du signal insulinique .....	22
3) L'entrée de glucose dans la cellule insulino-sensible .....	23
a- Le transporteur de glucose Glut4.....	23
b- La formation des vésicules contenant Glut4 et sensibles à l'insuline .....	23
c- Le trafic des vésicules contenant Glut4 et sensibles à l'insuline .....	24
III/ Le diabète : définitions, origines et traitements .....	25
A. Le diabète de type 1.....	26
B. Le diabète de type 2.....	26
<b>Partie 2 : Le canal TREK-1, un canal de fond impliqué dans la sécrétion d'insuline .....</b>	<b>29</b>
I/ Description du canal TREK-1 .....	30
A. La grande famille des canaux potassiques à deux domaines P (K2P).....	30
1) La famille des canaux TWIK (tandem-pore weak inward rectifying K <sup>+</sup> channels)	30
2) La famille des canaux TASK (tandem-pore acid-sensing K <sup>+</sup> channels).....	31
3) La famille des canaux TALK (TWIK-related alkaline pH-activated K <sup>+</sup> channels)...	31
4) La famille des canaux THIK (tandem-pore halothane-inhibited K <sup>+</sup> channels) .....	31
5) La famille des canaux TRESK (TWIK-related spinal cord K <sup>+</sup> channels) .....	32
6) La famille des canaux TREK (TWIK-related K <sup>+</sup> channels).....	32
B. L'expression du canal TREK-1 .....	33
C. Structure et dimérisation du canal TREK-1 .....	33
D. Les partenaires du canal TREK-1.....	33
E. Les régulations du canal TREK-1.....	34
1) Les propriétés pharmacologiques du canal TREK-1 .....	35
2) La mécano-sensibilité des canaux TREK-1 .....	36
3) La sensibilité des canaux TREK-1 à l'acidification .....	36
4) La thermo-sensibilité des canaux TREK-1 .....	37
5) La sensibilité des canaux TREK-1 aux acides gras libres insaturés et aux lysophospholipides.....	37
6) La sensibilité des canaux TREK-1 aux seconds messagers .....	37
II/ Le canal TREK-1 dans la physiologie et la physiopathologie .....	38
A. La perception de la douleur .....	39
B. La dépression .....	40
C. Diabètes et pathologies métaboliques .....	41
<b>Partie 3 : La sortiline, une protéine aux multiples fonctions .....</b>	<b>42</b>
I/ La sortiline : structure, expression, maturation et trafic.....	43
A. La structure de la sortiline .....	43

B. Identification de la sortiline : trois approches pour une même protéine .....	44
C. Distributions tissulaires et cellulaires de la sortiline.....	45
D. La maturation de la sortiline .....	45
II/ Les fonctions cellulaires et physiopathologiques de la sortiline .....	46
A. Les fonctions cellulaires de la sortiline .....	46
1) Récepteur/corécepteur de plusieurs ligands.....	46
2) L'adressage des protéines vers le lysosome ou la membrane plasmique.....	47
a- Le lysosome, la voie de dégradation .....	47
b- La membrane plasmique, l'adressage à la surface cellulaire .....	48
B. Les fonctions physiopathologiques de la sortiline .....	48
1) Les maladies neurodégénératives.....	48
2) Les maladies métaboliques .....	49
<b>Partie 4 : La spadine, un analogue du propeptide.....</b>	<b>51</b>
I/ Le propeptide (PE), le produit de maturation de la sortiline .....	51
A. La structure et les fonctions du propeptide (PE) .....	51
B. La spadine, un analogue synthétique du PE .....	52
II/ Les fonctions physiologiques de la spadine.....	53
A. La spadine, un inhibiteur des courants TREK-1.....	53
B. L'effet antidépresseur de la spadine.....	53
<i>Objectifs</i> .....	56
<i>Résultats</i> .....	58
<b>Partie 1 : Etude des effets de la spadine sur la sécrétion d'insuline.....</b>	<b>58</b>
Introduction.....	58
Résultats.....	60
Discussion.....	79
<b>Partie 2 : Etude des mécanismes de production et de libération du PE, et des effets de la spadine sur le modèle adipocytaire .....</b>	<b>83</b>
Introduction.....	83
Matériels et méthodes : le dosage Alphascreen™ .....	85
Résultats.....	87
Discussion.....	105
<i>Discussion générale</i> .....	109
<b>Partie 1 : Les origines et les fonctions du PE .....</b>	<b>109</b>
<b>Partie 2 : La spadine, un nouveau médicament ?.....</b>	<b>111</b>
I/ Les effets de la spadine.....	111
II/ La spadine, un nouveau traitement du diabète de type 2 ?.....	113

<i>Conclusion</i> .....	114
<i>Perspectives</i> .....	115
<i>Références</i> .....	117

# Introduction

---

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 108 millions de personnes étaient atteintes de diabète en 1980. En 2014, soit 34 ans après, ce chiffre a été multiplié par 4 (422 millions de personnes atteintes). En 2030, l'OMS prévoit que le diabète sera la septième cause de mortalité, ce qui conduit à revoir les méthodes de prévention et la thérapeutique. Les traitements actuels, bien qu'efficaces, provoquent de nombreux effets secondaires qui détériorent la qualité de vie des patients. Trouver de nouveaux traitements sans ces effets présente donc un intérêt pharmaceutique majeur.

Le diabète est caractérisé par une mauvaise régulation de la glycémie, provoquée par un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas et/ou une diminution du stockage de glucose par les cellules insulino-sensibles (insulino-résistance). Afin de disposer de l'état actuel de connaissance concernant le contrôle de l'homéostasie glucidique, l'introduction de ce mémoire est divisée en quatre parties :

- La **première partie** présente les mécanismes de régulation de la glycémie et deux pathologies associées, le diabète et l'obésité.
- La **deuxième partie** s'intéresse au canal TREK-1, présent dans les cellules  $\beta$  mais dont la fonction sur la sécrétion d'insuline est encore inconnue. Pour cela, le laboratoire dispose d'un nouvel outil qui lui est propre, la spadine. Il s'agit d'un peptide synthétique aux propriétés antidépressives et inhibitrices des courants TREK-1.
- La **troisième partie** se focalise sur la sortiline, un récepteur membranaire impliqué dans l'adressage du canal TREK-1 à la membrane, ainsi que dans celui du transporteur de glucose responsable de l'entrée de glucose dans les cellules insulino-sensibles.
- La **quatrième partie** se concentre sur la spadine. En effet, sa séquence peptidique n'est pas anodine puisqu'elle est basée sur celle du propeptide (PE), issu de la maturation de la sortiline. Comme le PE, la spadine interagit avec le canal TREK-1 et l'inhibe. C'est également un ligand de la sortiline, mais les mécanismes sous-jacents dans les tissus périphériques sont encore inconnus.

## Partie 1 : Le contrôle de l'homéostasie glucidique

Dans l'organisme, le glucose est une source énergétique indispensable pour le bon fonctionnement des tissus, comme par exemple, le cerveau et la rétine. Malgré la discontinuité des apports glucidiques au cours de la journée, la concentration en glucose dans le sang (glycémie) reste stable. Chez l'Homme, elle varie entre 0,70 et 1,10 g/L le matin à jeun, et entre 1,00 et 1,40 g/L deux heures après un repas (source : Association Française des Diabétiques). Cette homéostasie est le reflet d'une régulation hormonale faisant intervenir plusieurs organes :

- Le pancréas qui sécrète notamment l'insuline (hypoglycémiant) et le glucagon (hyperglycémiant) ;
- Le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique qui interviennent dans le stockage massif du glucose après un repas ;
- Le foie et le rein qui contribuent de façon limitée à l'homéostasie glucidique.

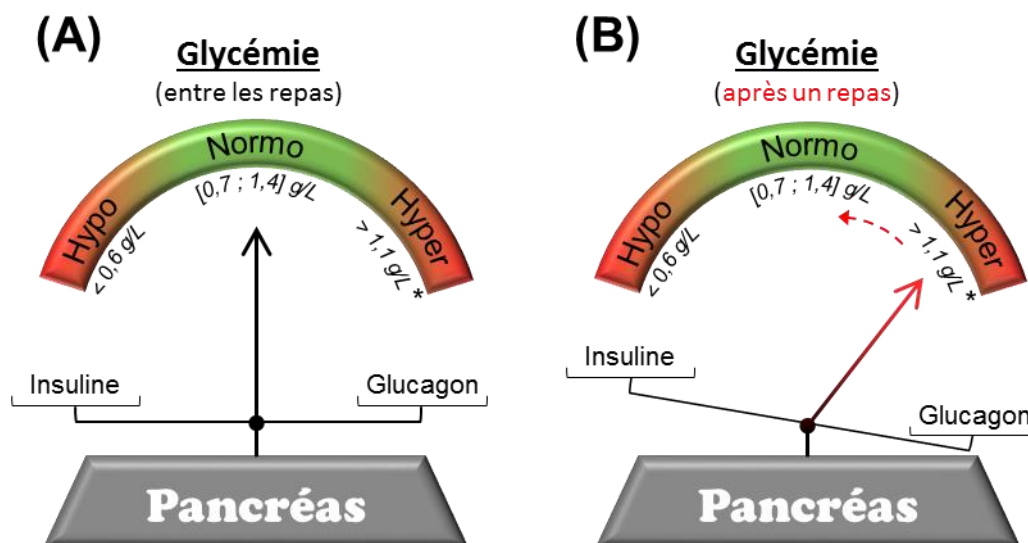


Figure 1 : Evolution de la glycémie en fonction des repas. (\* : à jeun)

Entre les repas, la glycémie est maintenue à un niveau optimal (normo-glycémie) grâce à un équilibre entre le stockage de glucose induit par l'insuline et le déstockage induit par le glucagon (Figure 1A). Après un repas, la glycémie augmente (hyper-glycémie) : l'insuline est libérée au détriment du glucagon, ce qui provoque le stockage du glucose et le retour à une glycémie normale (Figure 1B).

## I/ La cellule bêta du pancréas, un senseur du glucose sanguin

### A. Organisations structurales et fonctionnelles du pancréas

#### 1) Localisation et organisation du pancréas

Le pancréas est une glande située dans la cavité abdominale, entre le duodénum et la rate, entre l'estomac et les vertèbres lombaires 1 et 2 (Motta et al., 1997). Il est divisé en deux compartiments distincts par leur morphologie et leur fonction :

- Le pancréas exocrine représente la majorité du tissu. Il est organisé en acini et produit le suc pancréatique déversé dans le duodénum.
- Le pancréas endocrine, organisé en îlots de Langerhans, produit et libère les hormones impliquées dans le métabolisme du glucose (Hinrichsen, 1997; Motta et al., 1997).

Les îlots de Langerhans sont dispersés entre les acini du pancréas exocrine. Ils sont constitués de plusieurs types cellulaires caractérisés par leur sécrétion hormonale. Chez la souris, les cellules  $\alpha$ , localisées à la périphérie de l'îlot, représentent 20% du pancréas endocrine et produisent principalement le glucagon (Hinrichsen, 1997). Les cellules  $\beta$ , localisées majoritairement au centre de l'îlot, représentent 70% du pancréas endocrine et produisent l'insuline (Hinrichsen, 1997). Les cellules  $\delta$ , localisées à la périphérie de l'îlot, représentent 5% du pancréas endocrine et produisent la somatostatine (Hinrichsen, 1997). Les cellules PP (pancreatic polypeptide), localisées dans l'épithélium du pancréas exocrine, représentent 5% du pancréas endocrine et produisent le PP (Hinrichsen, 1997).

#### 2) L'insuline

L'importance de l'insuline dans la régulation de l'homéostasie glucidique n'est plus à démontrer puisque c'est l'unique hormone hypoglycémiante de l'organisme. Il s'agit d'un polypeptide de 6 kDa, constituée de deux chaînes peptidiques A et B, reliées par deux ponts disulfures (Ryle et al., 1955) (Figure 2). Elle est synthétisée sous la forme d'une pro-hormone, la pro-insuline, puis convertie en insuline mature par l'action de deux pro-hormones



convertases (PC1 et PC2) dans des vésicules issues du Golgi (Smeekens et al., 1992) (Figure 2). L'insuline active est alors stockée dans les granules de sécrétion pour être libérée sous l'effet du glucose sanguin.

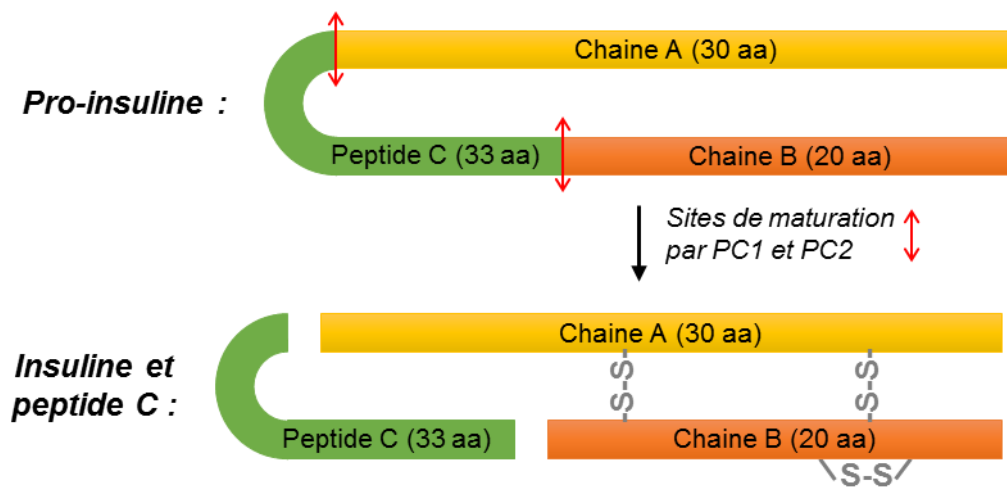


Figure 2 : L'insuline, maturation et structure.

## *B. La sécrétion d'insuline, un mécanisme finement régulé*

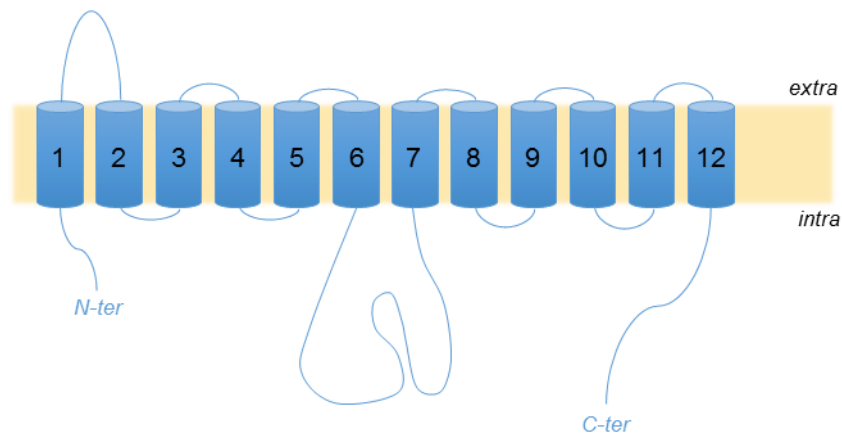
### 1) L'importance du glucose dans la sécrétion d'insuline

#### *$\alpha$ - Les transporteurs de glucose de la cellule bêta*

De façon générale, le glucose entre dans la cellule grâce à deux types de transporteurs, ceux de la famille SGLT (sodium glucose linked transporter) ou ceux de la famille GLUT (glucose transporter).

Dans les cellules  $\beta$  et insulino-sensibles, les transporteurs GLUT participent à l'entrée de glucose. Chaque membre de cette famille (qui en comptabilise quatorze) est caractérisé par sa spécificité et son affinité pour un hexose, ses distributions tissulaire et subcellulaire, ses régulations et ses fonctions physiologiques. Contrairement aux transporteurs SGLT qui nécessitent un apport énergétique (sous forme d'ATP (adenosine triphosphate)) pour absorber le glucose au niveau intestinal et rénal, les transporteurs GLUT assurent un passage facilité des hexoses selon leur gradient de concentration.

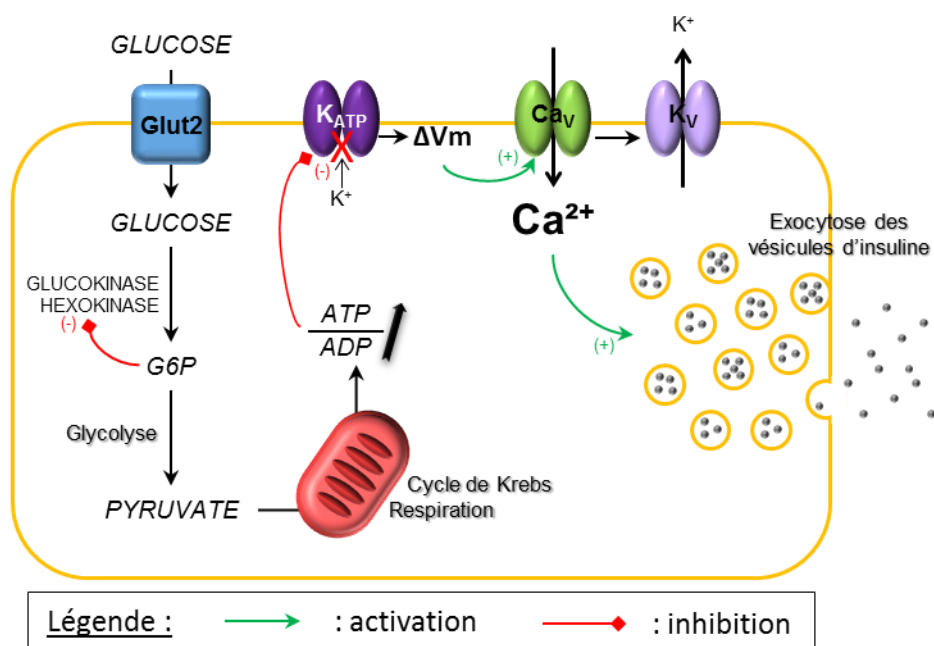
Les transporteurs GLUT sont constitués de douze domaines transmembranaires, leurs extrémités N- et C-terminales étant intracellulaires (Mueckler et al., 1985) (Figure 3). Ils sont divisés en trois groupes en fonction de leur structure primaire : les classes I (Glut1-4 et Glut14) et II (Glut5, 7, 9, 11) présentent des N-glycosylation au niveau de la première boucle extracellulaire, la classe III (Glut6, 8, 10, 12, 13) possèdent des N-glycosylations dans la cinquième boucle extracellulaire.



**Figure 3 : Structure primaire des transporteurs GLUTs.**

Chez les rongeurs, Glut2 est le principal transporteur de glucose de la cellule  $\beta$ , alors que chez l'Homme, il s'agit de Glut1 et Glut3 (De Vos et al., 1995). Glut2 présente une faible affinité pour le glucose ( $K_m \approx 17$  mM) et est également exprimé dans les intestins, le foie et les reins (Johnson et al., 1990). De nombreuses études ont montré le lien étroit entre la sécrétion d'insuline induite par le glucose et l'expression de Glut2. En effet, chez le rat diabétique, l'hyperglycémie est associée à une diminution de la sécrétion d'insuline et de l'expression de Glut2 principalement dans les cellules  $\beta$  (Thorens et al., 1990). De plus, les acides gras non estérifiés et les glucocorticoïdes ont un effet négatif sur la sécrétion d'insuline, respectivement en réduisant l'expression de Glut2 et en augmentant sa dégradation (Gremlich et al., 1997a; Gremlich et al., 1997b).

## *b- Le métabolisme du glucose dans la cellule bêta*



**Figure 4 : La métabolisation du glucose dans la cellule bêta.**

Suite à son entrée dans la cellule  $\beta$ , le glucose est phosphorylé en G6P (glucose-6-phosphate) par deux enzymes (Figure 4) :

- Une hexokinase de haute affinité ( $K_m = 0,1 \text{ mM}$ ), inhibée par le G6P ;
- Une glucokinase de basse affinité ( $K_m = 7,9 \text{ mM}$ ), insensible au G6P (Ashcroft and Randle, 1970).

Le G6P est ensuite converti en pyruvate lors de la glycolyse puis utilisé par la mitochondrie pour produire massivement de l'ATP (Figure 4). Le ratio cytoplasmique ATP/ADP augmente, ce qui conduit à la fermeture des canaux  $K^+$  sensibles à l'ATP (canaux  $K_{ATP}$ ) puis à la dépolarisation membranaire (Ammala et al., 1991) (Figure 4). Lorsque la cellule  $\beta$  est suffisamment dépolarisée, les canaux  $Ca^{2+}$  sensibles au voltage (canaux  $Ca_V$ ) s'ouvrent et laissent entrer le calcium ( $Ca^{2+}$ ) dans la cellule (Keahey et al., 1989) (Figure 4). Ce dernier est un second messenger très important dans la cellule  $\beta$  puisqu'il participe à la régulation de l'exocytose des vésicules d'insuline. Les canaux  $K^+$  sensibles au voltage (canaux  $K_V$ ) s'ouvrent également pour permettre la repolarisation de la membrane plasmique et stopper le signal de l'insuline (Findlay et al., 1985; Henquin, 1990) (Figure 4).

## 2) Les canaux ioniques impliqués dans la sécrétion d'insuline

Le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas le seul ion à contrôler la sécrétion d'insuline, les flux de  $\text{K}^+$  jouent également un rôle majeur dans la modulation du potentiel de membrane de la cellule (Figure 4). La cellule  $\beta$  compte plus de seize familles de canaux ioniques et plus de soixante canaux ioniques différents, localisés à la membrane plasmique et à la surface des organites intracellulaires. Parmi les plus importants (cités précédemment), on trouve les canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$  qui participent à la dépolarisation membranaire, les canaux  $\text{Ca}_v$  qui s'ouvrent lorsque la cellule est suffisamment dépolarisée et les canaux  $\text{K}_v$  qui participent à la repolarisation membranaire. L'activité de ces canaux est finement régulée par des protéines kinases activées lors de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Figure 5).

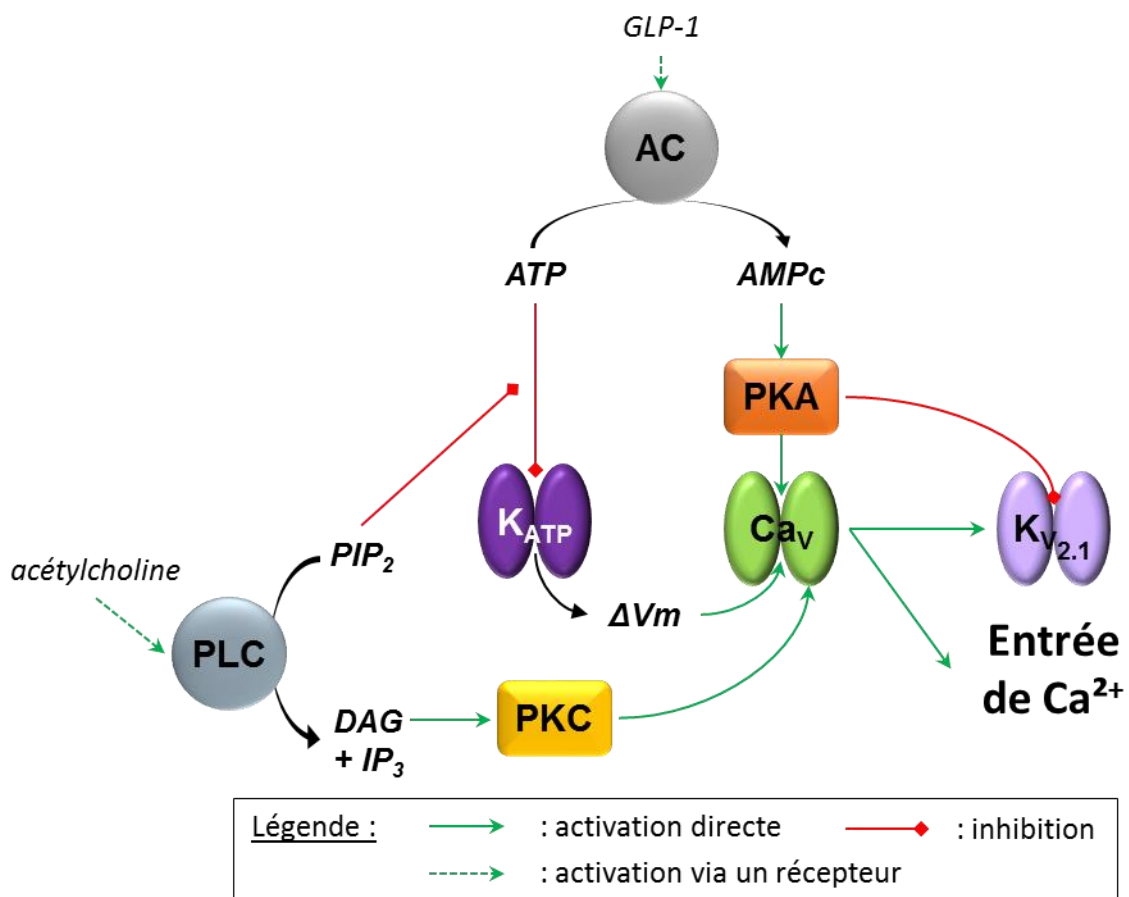


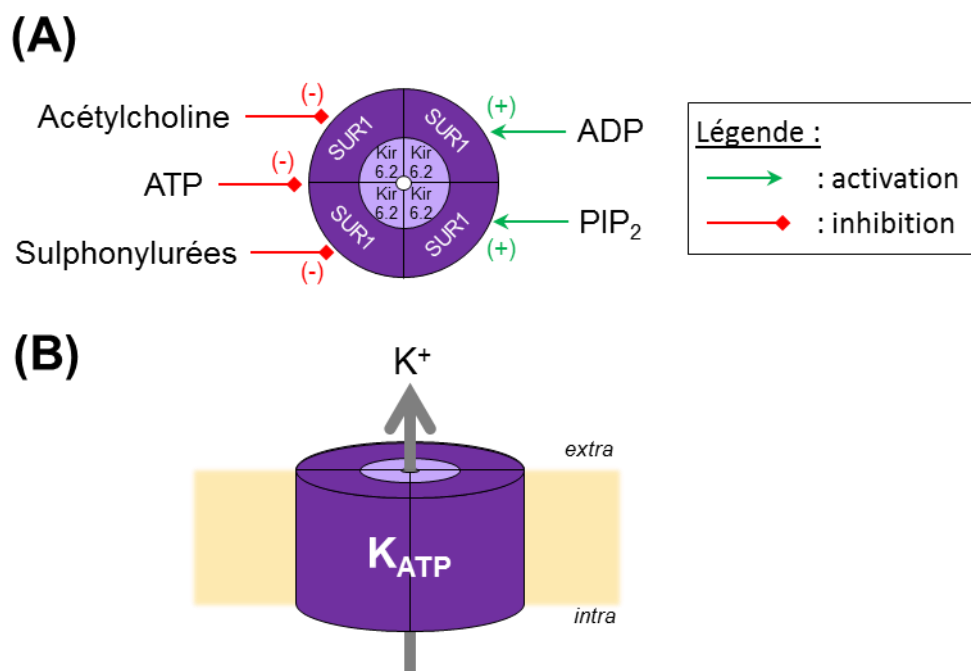
Figure 5 : Régulation des canaux impliqués dans la sécrétion d'insuline.

Des canaux intracellulaires, localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) régulent également la concentration cytosolique de calcium  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  : la

pompe SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) et les récepteurs-canaux RyR (ryanodin receptor) et  $\text{IP}_3\text{R}$  (inositol-triphosphate receptor).

### *$\alpha$ - Les canaux $\text{K}^+$ sensibles à l'ATP (canaux $\text{K}_{\text{ATP}}$ )*

Au repos, la membrane plasmique de la cellule  $\beta$  est plus perméable aux ions  $\text{K}^+$  qu'aux autres ions. La différence de concentration en ions  $\text{K}^+$  entre les compartiments extracellulaire (5 mM) et intracellulaire (150 mM) permet leur diffusion (flux sortant) et le maintien du potentiel de repos membranaire au niveau du potentiel d'équilibre des ions  $\text{K}^+$ , à environ -70 mV (Meissner and Schmelz, 1974).



**Figure 6 : Structure et régulations des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$ .**

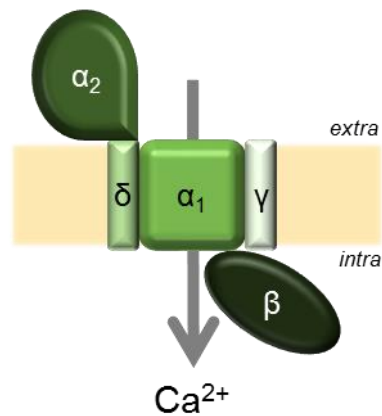
Le niveau d'excitabilité de la cellule  $\beta$  est contrôlé par l'ouverture et la fermeture des canaux  $\text{K}_{\text{ATP}}$ . Ce sont des hétéro-octamères constitués des sous-unités Kir6.2 ( $\text{K}^+$  inward-rectifier 6.2) et SUR1 (sulfonylurea receptor 1) (Inagaki et al., 1995) (Figure 6A). La petite sous-unité Kir6.2 (codée par le gène *KCNJ11*) est la sous-unité traditionnelle du canal dont l'activité est régulée par l'ATP et le  $\text{PIP}_2$  (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate). La grande sous-unité SUR1 (codée par le gène *ABCC8*) est le récepteur aux sulphonylurées et possède des sites de fixation pour l'ATP et l'ADP. Quatre sous-unités Kir6.2 et quatre sous-unités SUR1 forment le canal  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Clement et al., 1997) (Figure 6B).

Du fait de leur sensibilité à l'ATP, les canaux  $K_{ATP}$  sont des senseurs de l'état énergétique de la cellule  $\beta$  et sont régulés de façon complexe (Cook and Hales, 1984). La fixation de l'ATP sur l'une des sous-unités Kir6.2 ou des sulphonylurées sur l'une des sous-unités SUR1 entraîne la fermeture du canal, une diminution de la perméabilité au  $K^+$  et l'augmentation de l'excitabilité de la cellule  $\beta$  (Dorschner et al., 1999; Tucker et al., 1998). L'interaction du  $PIP_2$  sur la sous-unité Kir6.2 réduit l'effet inhibiteur de l'ATP sur l'activité du canal, soit en le stabilisant dans une conformation où l'ATP ne peut pas se fixer, soit en masquant le site de fixation de l'ATP (Baukowitz et al., 1998). A l'inverse, l'acétylcholine, en stimulant son récepteur muscarinique, active la PLC (phospholipase C) qui clive le  $PIP_2$  en DAG (diacylglycérol) et  $IP_3$  (Zawalich et al., 1989). Il en résulte une déplétion du stock sous-membranaire de  $PIP_2$ , ce qui augmente la sensibilité des canaux  $K_{ATP}$  à l'ATP (Nakano et al., 2002).

Chez la souris, l'invalidation de l'une des sous-unités des canaux  $K_{ATP}$  rend la sécrétion d'insuline insensible au glucose (Miki et al., 1998; Shiota et al., 2002). Des mutations entraînant un dysfonctionnement de ces canaux sont responsables de pathologies métaboliques. Ainsi, une perte de fonction des canaux  $K_{ATP}$  est associée à l'hyperinsulinisme congénital : l'expression membranaire du canal est réduite voire inexistante, la cellule  $\beta$  reste dépolarisée et sécrète de façon dérégulée l'insuline (Cartier et al., 2001). A l'inverse, un gain de fonction de ces mêmes canaux est associé au diabète néonatal. En effet, une perte d'affinité pour l'ATP ou une déstabilisation de leur état ouvert provoque une réduction drastique de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  (Koster et al., 2005). Enfin, le polymorphisme E23K de la sous-unité Kir6.2, connue pour réguler l'activité des canaux  $K_{ATP}$ , est associée à la prédisposition au diabète de type 2 (Gloyn et al., 2003).

### *b- Les canaux $Ca^{2+}$ sensibles au voltage (canaux $Cav$ )*

Suite à la fermeture des canaux  $K_{ATP}$ , la membrane plasmique de la cellule  $\beta$  se dépolarise. Chez la souris, lorsque le potentiel de membrane atteint -50 mV, les canaux  $Ca_v$  s'activent et laissent entrer le  $Ca^{2+}$  (calcium) impliqué dans l'exocytose des vésicules d'insuline (Figure 4) (Keahey et al., 1989).



**Figure 7 : Structure des canaux Ca<sub>v</sub>.**

Ces canaux sont composés de quatre sous-unités :

- la sous-unité  $\alpha_1$  constitue le pore sélectif au  $\text{Ca}^{2+}$  et le senseur du voltage ;
- la sous-unité  $\beta$  est une protéine cytoplasmique impliquée dans la régulation du canal ;
- la sous-unité  $\alpha_2/\delta$  est également modulatrice du canal. La protéine extracellulaire  $\alpha_2$  est reliée à la protéine transmembranaire  $\delta$  grâce à un pont disulfure ;
- la sous-unité  $\gamma$  régule l'ouverture du canal et son trafic (Takahashi et al., 1987) (Figure 7).

Le  $\text{Ca}^{2+}$  étant un second message très important, son entrée dans la cellule  $\beta$  par les canaux  $\text{Ca}_v$  est très régulée. En effet, en association avec la calmoduline, il réduit la capacité de réouverture des canaux  $\text{Ca}_v$  (Imredy and Yue, 1994). A l'inverse, l'activation de l'AC (adenylate cyclase) conduit à la production d'AMPc (adénosine monophosphate cylique) puis à l'activation de la PKA (proteïn kinase A), ce qui provoque l'ouverture des canaux  $\text{Ca}_v$  et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la cellule  $\beta$  (Leiser and Fleischer, 1996; Rajan et al., 1989) (Figure 5). De la même façon, les récepteurs muscariniques stimulent la PLC. Le DAG ainsi produit active la PKC (proteïn kinase C) qui favorise l'ouverture des canaux  $\text{Ca}_v$  et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  (Arkhammar et al., 1994; Love et al., 1998) (Figure 5).

Les canaux  $\text{Ca}_v$  sont largement impliqués dans le diabète : les modèles diabétiques murins présentent une augmentation de leur activité ainsi qu'une diminution de leur expression (Yang and Berggren, 2006). Chez l'Homme, des études cliniques ont révélé l'implication du polymorphisme génétique des canaux  $\text{Ca}_v$  sur l'incidence du développement du diabète de type 2 (Holmkvist et al., 2007; Reinbothe et al., 2013).

### *c- Autres canaux de la cellule bêta*

Les canaux  $K^+$  sensibles au voltage (canaux  $K_v$ ) s'ouvrent consécutivement à l'ouverture des canaux  $Ca_v$ , lorsque le potentiel de membrane atteint  $-30$  mV (Findlay et al., 1985). Ce qui provoque une lente sortie des ions  $K^+$  et repolarise la membrane plasmique : c'est le signal d'arrêt de la sécrétion d'insuline (Roe et al., 1996). Ils sont constitués de quatre sous-unités  $\alpha$  transmembranaires, spécifiques de chaque canal  $K_v$  et pouvant s'associer à des sous-unités  $\beta$  régulatrices (Rudy et al., 1991). Plusieurs canaux  $K_v$  sont exprimés dans la cellule  $\beta$ , tels que  $K_v1.4$ ,  $1.5$ ,  $1.6$ ,  $2.1$ ,  $3.2$ ,  $6.2$  et  $9.3$  mais le canal  $K_v2.1$  est le plus impliqué dans la sécrétion d'insuline (Jacobson and Philipson, 2007; Roe et al., 1996). La stimulation de l'AC par le récepteur du GLP-1 (glucagon-like peptide-1), qui conduit à la production d'AMPc puis à l'activation de la PKA, provoque la fermeture des canaux  $K_v$  dans les cellules  $\beta$  (MacDonald et al., 2002a) (Figure 5). De plus, la chaleur inhibe les courants  $K_v$  (MacDonald et al., 2003). Par ailleurs, la protéine SNAP-25 (synaptosomal associated protein 25), impliquée dans les processus d'exocytose, peut interagir spécifiquement avec les canaux  $K_v$  et provoquer leur fermeture (MacDonald et al., 2002b). Cependant, l'implication de ces canaux dans le développement du diabète de type 2 n'est pas encore définie. Chez la souris, la surexpression de canaux  $K_v1.5$  spécifiquement dans les cellules  $\beta$  engendre une hyperglycémie associée à une hypo-insulinémie, ce qui illustre l'importance de ces canaux dans le contrôle du potentiel de membrane (Philipson et al., 1994).

Le RE (réticulum endoplasmique), organe de stockage de  $Ca^{2+}$ , participe aux variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . La pompe calcique SERCA est à l'origine du stockage de  $Ca^{2+}$  au sein du RE : son entrée est couplée à l'hydrolyse d'ATP (Varadi et al., 1995). Sous l'effet de l' $IP_3$  (produit par la PLC) ou de l'AMPc (produit par l'AC), le  $Ca^{2+}$  peut être mobilisé grâce à l'ouverture des récepteurs  $IP_3R$  et  $RyR$ , respectivement (Blondel et al., 1993; Varadi and Rutter, 2002).

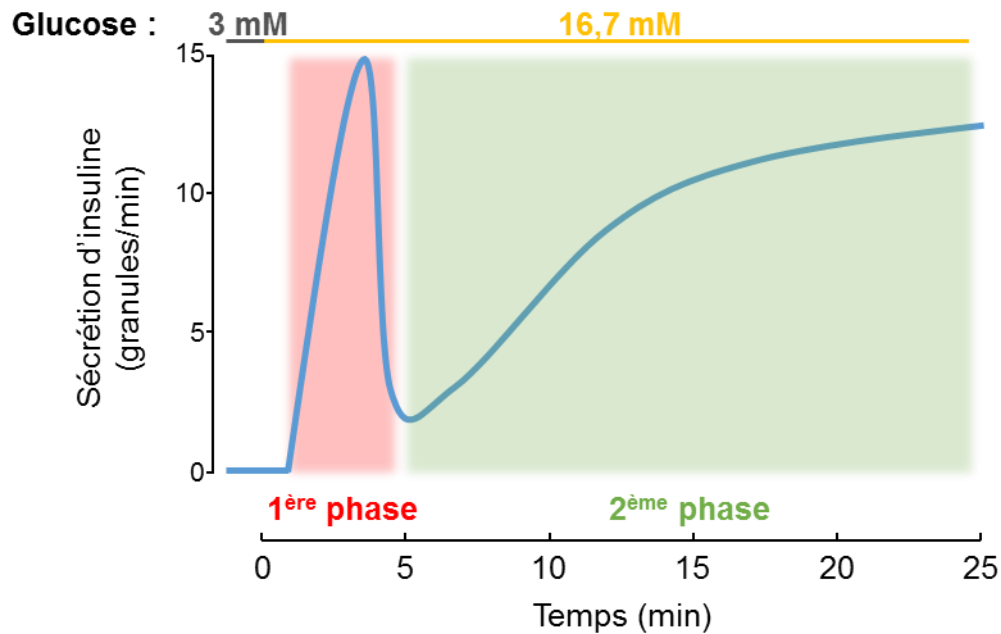
### **3) L'exocytose des vésicules d'insuline**

#### *$\alpha$ - La sécrétion biphasique d'insuline*

La sécrétion d'insuline induite par le glucose est biphasique lorsque la concentration en glucose passe de  $3$  mM à  $16,7$  mM (Curry et al., 1968; Grodsky, 1972) (Figure 8). La première phase, rapide, intense et transitoire, débute environ deux minutes après la



stimulation en glucose (Curry et al., 1968). La deuxième phase commence environ huit minutes après la stimulation en glucose et est associée à une augmentation progressive et soutenue de la concentration d'insuline aussi longtemps que le niveau de glucose est maintenu constant (Curry et al., 1968).



**Figure 8 : La sécrétion biphasique d'insuline.**

Les granules de sécrétion contenant l'insuline sont de larges vésicules de 200 à 500 nm de diamètre (Dean, 1973). Chez la souris, on compte en moyenne 13 000 granules de sécrétion par cellule  $\beta$ , divisées en deux groupes en fonction de leur implication dans l'une des deux phases de sécrétion (Dean, 1973). La première phase fait intervenir un pool de vésicules prêtes à l'exocytose (entre 1 et 5 % des granules de sécrétion) et situées sous la membrane plasmique (Grotsky, 1972). La deuxième phase, plus tardive, nécessite le recrutement de vésicules nouvellement synthétisées, situées entre le RE et la membrane : c'est le pool de réserve (entre 95 et 99 % des granules de sécrétion) (Grotsky, 1972).

### *b- La régulation de l'exocytose : le modèle SNARE*

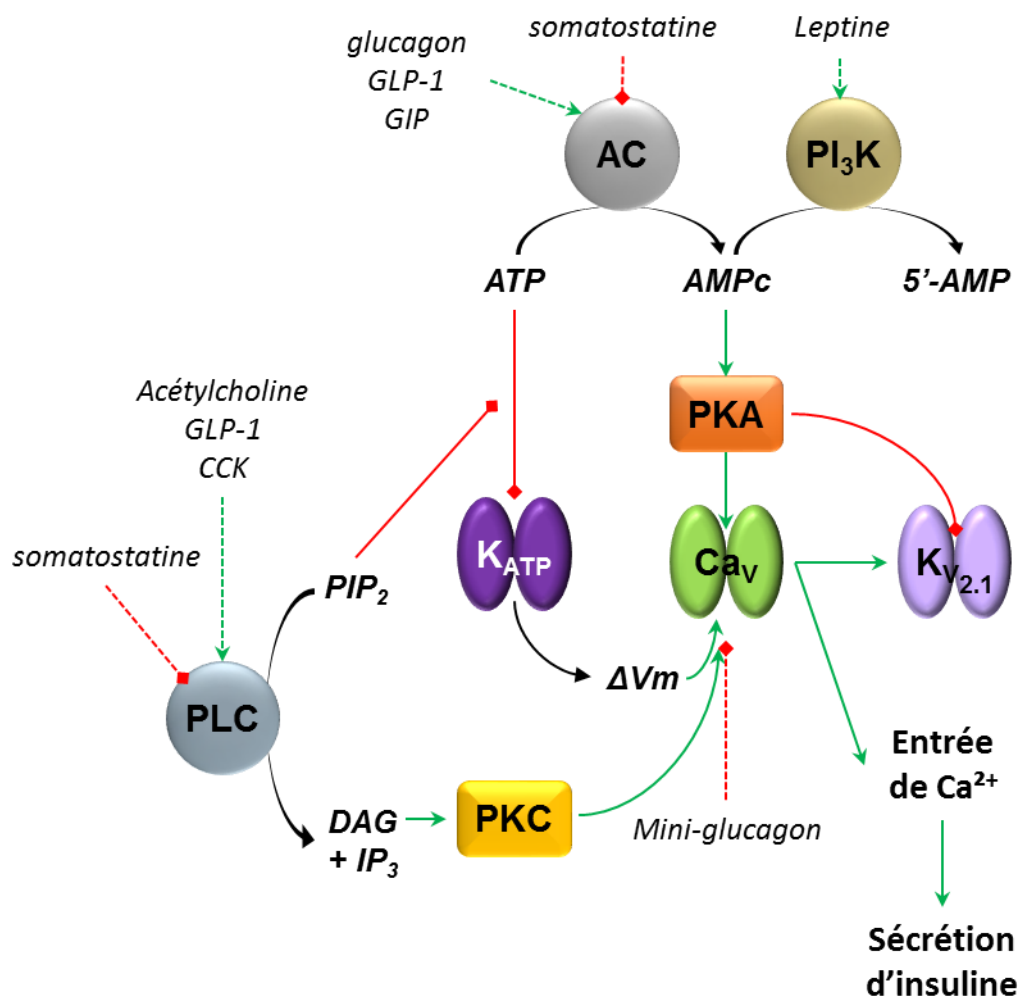
Le mécanisme d'exocytose régulée est basé sur le modèle SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) pour les neurotransmetteurs dans les neurones et les hormones dans les cellules endocrines. Il s'agit de la fusion entre une vésicule de sécrétion et la

membrane plasmique sous l'effet d'un stimulus. Dans la cellule  $\beta$ , l'exocytose d'insuline est déclenchée par le glucose et régulée par des seconds messagers tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'AMPc.

Les vésicules d'exocytose sont adressées au niveau de zones particulières de la membrane plasmique, les radeaux lipidiques, enrichis en cholestérol et sphingolipides (Simons and Ikonen, 1997). Morphologiquement, ces micro-domaines forment des invaginations grâce à l'organisation de la cavéoline (protéine structurale fixant le cholestérol) en cavéole (Rothberg et al., 1992). Ils contiennent la machinerie nécessaire à la fusion des vésicules d'insuline avec la membrane plasmique, le complexe SNARE. Dans la cellule  $\beta$ , ce complexe est constitué de la syntaxine 1 et de SNAP-25 (synaptosomal-associated protein-25) localisés dans la membrane plasmique et de VAMP-2 (vesicle associated membrane protein-2) situé à la surface de la vésicule d'insuline (Martin et al., 1995; Nagamatsu et al., 1996; Regazzi et al., 1995; Sadoul et al., 1995). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux  $\text{Ca}_v$  est couplée à la fusion des vésicules d'insuline avec la membrane plasmique grâce à une famille de protéines, les synaptotagmines, senseurs du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Cette famille compte quinze membres mais seules les synaptotagmines 5, 7, 8 et 9 sont impliquées dans l'exocytose des vésicules d'insuline (Gao et al., 2000; Gut et al., 2001; Iezzi et al., 2004). Sous l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$ , les synaptotagmines interagissent avec le complexe SNARE, ce qui conduit à une forte interaction entre les protéines du complexe SNARE, permettant le rapprochement et la fusion des membranes vésiculaire et plasmique (Zhou et al., 2015). La dissociation du complexe SNARE est permise par l'ATPase NFS (N-éthylmaleimide-sensitive-factor) qui fixe le complexe SNARE grâce à une protéine adaptatrice  $\alpha$ -SNAP ( $\alpha$ -soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein) (Subramaniam et al., 1997). Suite à la fusion, l'hydrolyse d'ATP fournit l'énergie nécessaire au désassemblage du complexe SNARE (Subramaniam et al., 1997).

#### 4) Les effets modulateurs des hormones et des neurotransmetteurs

Les îlots de Langerhans sont innervés par de nombreuses fibres provenant des systèmes nerveux sympathique et parasympathique. En plus des hormones circulantes issues de l'îlot, de l'intestin et du tissu adipeux, les terminaisons nerveuses libèrent de nombreux neurotransmetteurs jouant un rôle majeur dans la régulation fine de la sécrétion d'insuline (Figure 9).



**Légende :** → : activation ◆ : inhibition  
- - - → : activation via un récepteur - - - ◆ : inhibition via un récepteur

**Figure 9 : Modulation de la sécrétion d'insuline par les hormones et les neurotransmetteurs.**

### *α- Les hormones*

**Le glucagon** est libéré par les cellules  $\alpha$  du pancréas. Lorsqu'il est exogène, il stimule la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Turner and McIntyre, 1966) (Figure 9). En revanche, le glucagon endogène n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  proximales (Moens et al., 2002). L'activation de son récepteur, un RCPG<sub>s</sub> (récepteur couplé aux protéines G<sub>s</sub>), conduit à l'activation de l'AC, ce qui augmente la concentration en AMPc dans le cytosol (Jelinek et al., 1993; Kawai et al., 1995; Kuo et al., 1973) (Figure 9). Son précurseur, le pro-glucagon, est exprimé dans les cellules  $\alpha$  du pancréas, les cellules L de l'intestin et le système

nerveux central (Bell et al., 1983). La maturation pancréatique du pro-glucagon génère un petit peptide, le miniglucagon, qui bloque l'activité des canaux  $Ca_v$  et conduit à une réduction de la sécrétion d'insuline (Bell et al., 1983; Dalle et al., 2002; Dalle et al., 1999) (Figure 9).

**La leptine** est une hormone anorexigène produite et libérée par le tissu adipeux. Elle est capable d'inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose grâce à l'activation de la PDE3B (phosphodiesterase 3B), qui hydrolyse l'AMPc en 5'AMP (Zhao et al., 1998) (Figure 9).

Le tube digestif est également à l'origine de trois hormones incrétines impliquées dans la modulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose : **le GLP-1**, **le GIP** (Gastric inhibitory polypeptide) et **la CCK** (cholecystokinine). Seules, ces hormones ne sont pas capables de stimuler la sécrétion d'insuline mais elles ont un effet potentialisateur sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Dupre et al., 1973; Meade et al., 1967; Schmidt et al., 1985; Turner et al., 1974). Le GLP-1 est produit par les cellules L du jéjunum et de l'iléon, le GIP est produit par les cellules K du duodénum et la CCK est sécrétée par la muqueuse du duodénum (Parker et al., 2009; Reimann et al., 2008). L'activation des récepteurs au GLP-1 (GLP-1-R) et au GIP (GIP-R) engendrent l'activation de l'AC et une élévation de la concentration cytosolique en AMPc dans la cellule  $\beta$  (Holz et al., 1995; Thorens, 1992; Usdin et al., 1993; Wheeler et al., 1995) (Figure 9). L'activation du GLP-1-R et du récepteur de la CCK, un RCPG<sub>q</sub>, entraîne la stimulation de la PLC qui clive le PIP<sub>2</sub> en DAG (diacylglycérol) et IP<sub>3</sub>. Ce dernier stimule son récepteur situé dans la membrane du RE, l'IP<sub>3</sub>R et provoque la libération de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol (Dillon et al., 1993; Piiper et al., 1997) (Figure 9).

**La somatostatine**, produite par l'hypothalamus et les cellules delta de l'estomac, de l'intestin et du pancréas, inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose. En interagissant avec ses RCPG<sub>i</sub>, elle stimule les canaux  $K^+$  couplés à des protéines G, ce qui provoque l'hyperpolarisation de la cellule  $\beta$  (Kailey et al., 2012; Ribalet and Eddlestone, 1995) (Figure 9). Elle conduit également à l'inhibition de l'activité des canaux  $Ca_v$  et une réduction de l'influx calcique (Hsu et al., 1991) (Figure 9).

### *b- Les neurotransmetteurs*

La stimulation du système nerveux sympathique provoque l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Kurose et al., 1990; Porte and Williams, 1966). Cet effet passe par l'activation du récepteur  $\alpha$ -adrénergique et la réduction de la concentration intracellulaire d'AMPc (Nakaki et al., 1981; Porte and Williams, 1966). A l'inverse, la stimulation du système

nerveux parasympathique, via le récepteur muscarinique M3, stimule la sécrétion d'insuline (Mei et al., 1981; Nakaki et al., 1981).

## II/ Le stockage de glucose dans les tissus insulino-sensibles

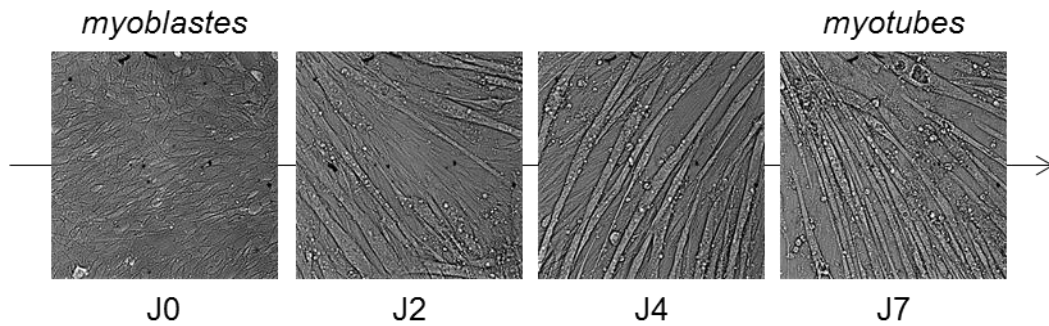
### *A. Les tissus insulino-sensibles et leurs fonctions*

L'insuline est le signal indiquant une augmentation de la glycémie. Dans les cellules insulino-sensibles, le glucose est stocké sous forme de glycogène (muscle et foie), d'acides gras et de triglycérides (tissu adipeux blanc et foie). L'insuline stimule la glycogénogenèse, c'est-à-dire la formation de glycogène à partir du glucose circulant, et la lipogenèse (la synthèse de lipides) (Berthet et al., 1956; Danforth, 1965; Milstein and Hausberger, 1956). A l'inverse, elle inhibe les voies de production de glucose à partir des acides gras (lipolyse) et de glycogène (gluconéogenèse) (Froesch et al., 1965; L'Age et al., 1968).

Ici, on s'intéresse particulièrement à la cellule musculaire squelettique et à l'adipocyte, deux types cellulaires au sein desquels l'insuline stimule le stockage de glucose via un transporteur spécifique, Glut4.

#### 1) La cellule musculaire squelettique

Le système musculo-squelettique représente plus de 50% du poids corporel. Il trouve son origine dans le mésoderme, avec la formation de cellules progénitrices musculaires multipotentes capables de se différencier en myotubes fonctionnels. La myogenèse constitue le processus de différenciation des cellules mésenchymateuses en myoblastes, qui prolifèrent et fusionnent pour former des syncytiums polynucléaires exprimant les protéines musculaires. Ce processus est illustré par la Figure 10 avec la lignée cellulaire C2C12 : sous l'effet d'une privation de sérum, les myoblastes se différencient et fusionnent en myotubes.



**Figure 10 : Différenciation de la lignée musculaire murine C2C12.**

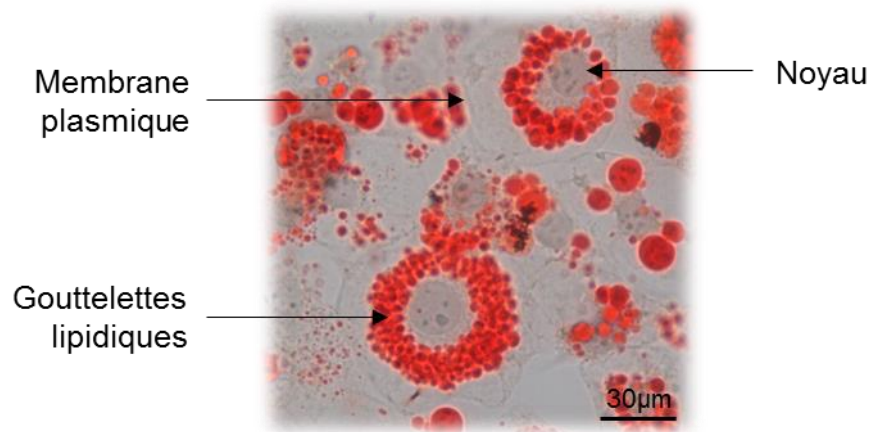
La différenciation musculaire est permise par l'expression de facteurs de transcription spécifiques. Parmi eux, on trouve les facteurs de transcription de type MyoD, de la famille MRF (myogenic regulated factor) : MyoD, Myf5, MRF4 et Myogénine (Montarras et al., 1991). Plus précisément, les facteurs Myf5 et MyoD sont impliqués dans la détermination des myoblastes squelettiques alors que MRF4 et la Myogénine sont des facteurs de différenciation (Tajbakhsh and Buckingham, 2000). Une fois différenciés, les myotubes sont capables de se contracter et d'utiliser le glucose grâce à la présence de protéines spécialisées telles que l'actine, la myosine, la glycogène phosphorylase, Glut4, ...

## 2) L'adipocyte

Tout comme le système musculaire, le tissu adipeux est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. On distingue deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc impliqué dans le stockage d'énergie sous forme de triglycérides et le tissu adipeux brun impliqué dans la thermogénèse.

L'adipogenèse, processus de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (Figure 11) fait intervenir plusieurs facteurs de transcription et implique de nombreux changements :

- La modification de la morphologie des cellules, avec l'apparition de gouttelettes lipidiques ;
- L'acquisition de la sensibilité à l'insuline, qui permet l'entrée du glucose dans la cellule ;
- La capacité de sécrétion d'hormones, les adipocytokines telles que l'adiponectine, la leptine, la résistine, la visfatine, ...



**Figure 11 : Morphologie d'un adipocyte.**

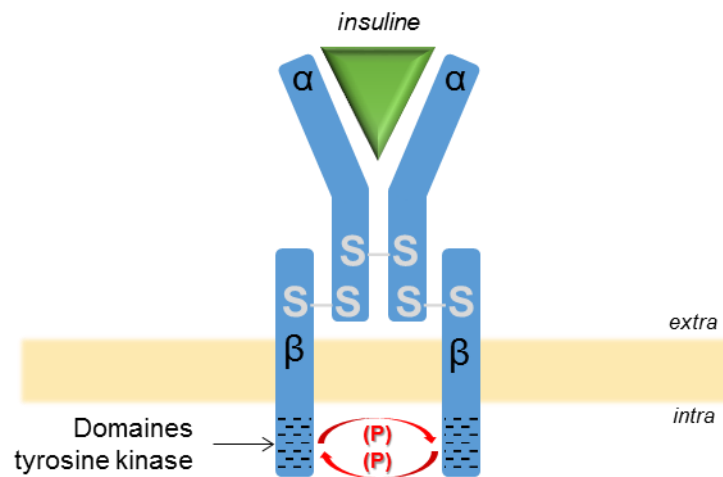
*Les fibroblastes murins 3T3-L1 sont soumis à un protocole de différenciation pendant sept jours. Le marquage Oil-Red permet colorer les vésicules lipidiques, marqueur phénotypique des adipocytes.*

Deux principaux facteurs de transcription sont engagés dans l'adipogenèse : PPAR $\gamma_2$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma $_2$ ) et C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) (Freytag et al., 1994; Tontonoz et al., 1994). En combinaison avec d'autres facteurs de transcription, ils contrôlent l'adipogenèse et induisent l'expression de nombreuses protéines impliquées dans les fonctions de l'adipocyte : la LPL (lipoprotein lipase) hydrolyse les triglycérides en lipoprotéines plasmatiques, la SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1) catalyse la synthèse d'acides gras insaturés et la FAS (fatty acid synthase) catalyse la synthèse d'acides gras, notamment le palmitate (Christy et al., 1989; Student et al., 1980; Vu et al., 1996).

## ***B. L'insuline stimule le stockage de glucose dans les cellules insulino-sensibles***

### **1) Caractéristiques du récepteur de l'insuline**

Le récepteur de l'insuline est un tétramère appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase (Massague et al., 1980; Van Obberghen et al., 1983) (Figure 12). Il est constitué de deux sous-unités  $\alpha$  qui fixent l'insuline et de deux sous-unités  $\beta$  catalytiques (Massague et al., 1980). Ces quatre sous-unités sont reliées entre elles de façon covalente par des ponts disulfure (Massague et al., 1980).



**Figure 12 : Structure du récepteur de l'insuline et activation.**

L'interaction de l'insuline sur son récepteur induit une trans-phosphorylation des sous-unités  $\beta$ , un changement de conformation du récepteur et la stimulation de l'activité tyrosine kinase de ces mêmes sous-unités (Corin and Donner, 1982; Frattali and Pessin, 1993; Van Obberghen et al., 1983) (Figure 12).

Parmi les cibles intracellulaires du récepteur de l'insuline, on trouve les membres de la famille IRS (insulin receptor substrate), c-Cbl et APS (adapter protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains). Les IRS sont des protéines de haute affinité pour le récepteur de l'insuline et comptent de nombreuses tyrosines phosphorylables (Sun et al., 1991). Leur domaine SH2 (src homology 2) sont des sites d'ancrage pour des protéines intracellulaires telles que la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (Sun et al., 1991).

## 2) Les voies de signalisation associées au récepteur de l'insuline

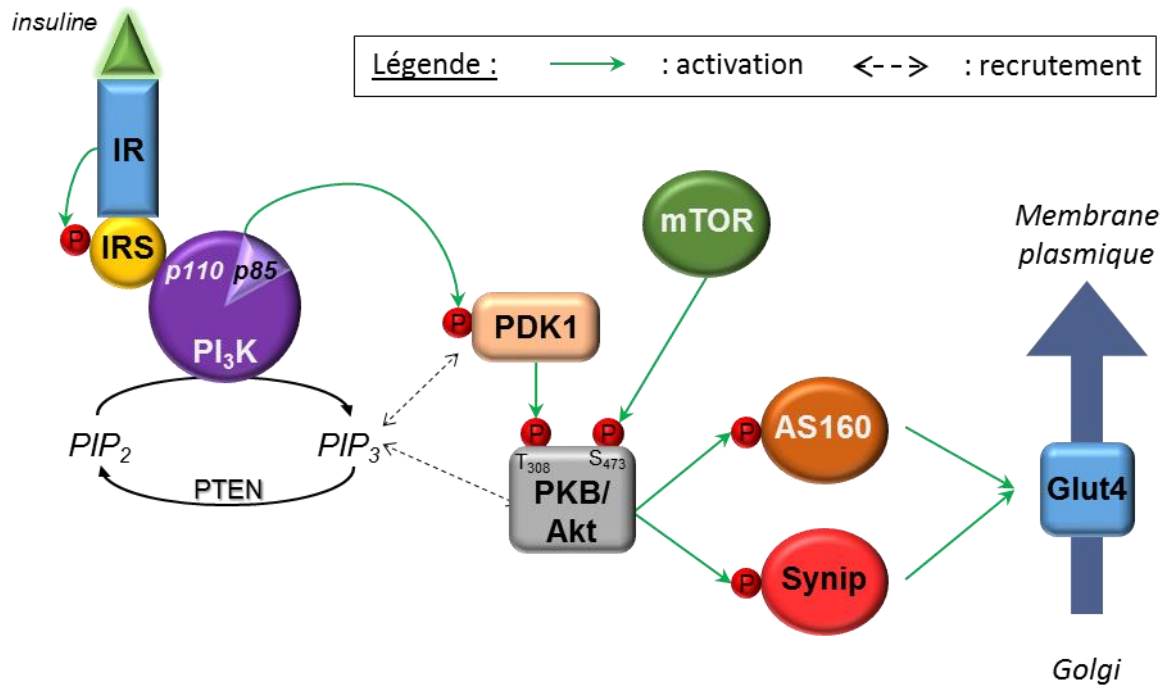
Sous l'effet de l'insuline, la translocation de Glut4 à la membrane plasmique met en jeu principalement deux voies de signalisation distinctes : la voie majoritaire PI3K et la voie minoritaire APS-CAP-c-Cbl.

### *$\alpha$ - La voie de la PI3K*

La PI3K est une enzyme hétérodimérique constituée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110) (Fry et al., 1992). L'interaction entre l'IRS1 phosphorylé

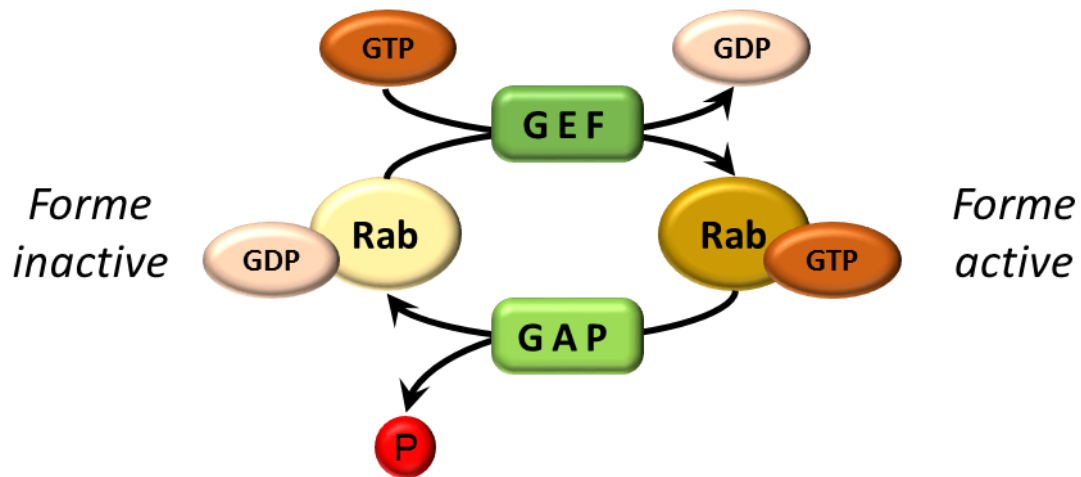


et la sous-unité p85 induit l'adressage membranaire et l'activation de la sous-unité p110 à proximité du PIP<sub>2</sub> (Sun et al., 1991) (Figure 13). La PI3K convertit le PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-triphosphate), site de reconnaissance pour des protéines à domaine PH (pleckstrin homology), telles que les kinases PDK1 (3-phosphoinositide-dependent kinase 1) et PKB/Akt (protein kinase B) (Alessi et al., 1997; Marte and Downward, 1997) (Figure 13).



**Figure 13 : La voie PI3K.**

La sérine/thréonine kinase PKB/Akt appartient à la famille AGC (cAMP dependent, cGMP dependent protein kinase C) et possède deux sites de phosphorylation importants : la thréonine 308 phosphorylée par PDK1 et la sérine 473 phosphorylée par le complexe protéique mTOR (mammalian target of rapamycin) (Sarbasov et al., 2005; Stokoe et al., 1997) (Figure 13).

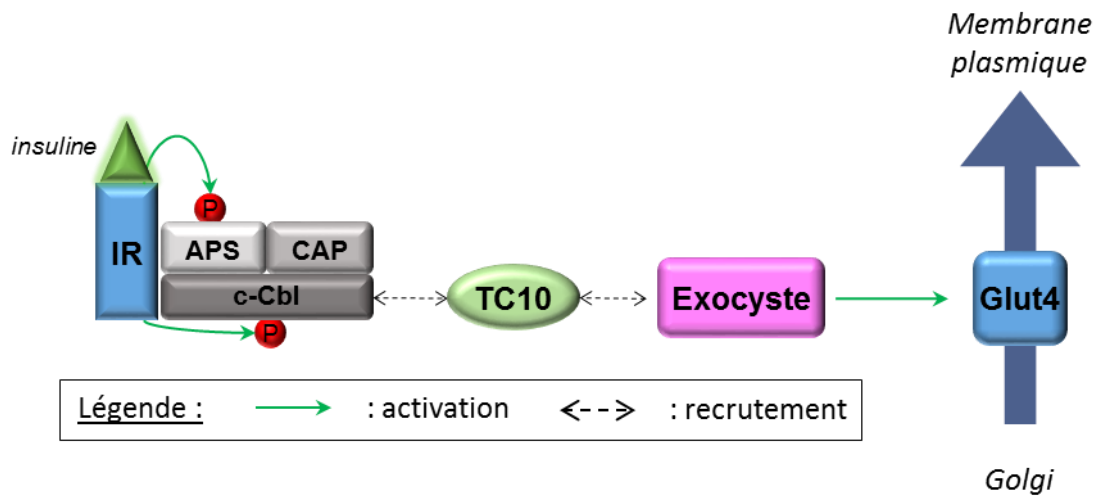


**Figure 14 : Boucle de régulation des petites protéines Rab.**

La protéine AS160 (Akt substrate of 160 kDa) est une des cibles de PKB/Akt. Elle appartient à la famille des Rab GAP (GTPase activating protein), c'est-à-dire qu'elle catalyse l'hydrolyse du GTP d'une protéine Rab activé en GDP (Figure 14). Les Rab participent à de nombreux processus biologiques dont le trafic de protéines vers la membrane plasmique. Dans le cas du transporteur Glut4, AS160 hydrolyse le GTP des petites protéines G Rab 2A, 8A, 10 et 14 (Miinea et al., 2005). A l'état basal, AS160 est non phosphorylé et associé aux vésicules à Glut4 sensibles à l'insuline, sa fonction GAP est active (Larance et al., 2005; Sano et al., 2003a). L'insuline provoque la phosphorylation d'AS160, l'inactivation de sa fonction GAP et sa dissociation des vésicules à Glut4, ce qui conduit au transfert du transporteur à la membrane plasmique (Larance et al., 2005; Sano et al., 2003a).

Il existe d'autres substrats de PKB/Akt, impliqués dans l'exocytose des vésicules contenant Glut4. En effet, Synip interagit avec la Syntaxine 4 du complexe SNARE et empêche la translocation de Glut4 à la membrane plasmique (Min et al., 1999) (Figure 13). L'insuline induit la phosphorylation de Synip et sa dissociation de la syntaxine 4, ce qui favorise la redistribution membranaire de Glut4 (Yamada et al., 2005) (Figure 13).

### *b- La voie du complexe APS-CAP-c-Cbl*



**Figure 15 : La voie APS-CAP-c-Cbl.**

Au niveau des micro-domaines de la membrane plasmique, le récepteur de l'insuline, lorsqu'il est activé, interagit avec la protéine adaptatrice APS et induit sa phosphorylation (Moodie et al., 1999) (Figure 15). APS recrute alors une deuxième protéine adaptatrice CAP (c-Cbl Associated Protein) et c-Cbl, ce qui permet au récepteur de l'insuline d'ajouter un groupement phosphate sur les résidus tyrosine de c-Cbl (Ahn et al., 2004; Ribon and Saltiel, 1997) (Figure 15). Ces phosphorylations successives permettent au récepteur de l'insuline de recruter la petite protéine G TC10, de la famille Rho (Chiang et al., 2001) (Figure 15). Ainsi, TC10 est impliquée à deux niveaux dans la régulation du trafic de Glut4 : cette petite protéine G recrute le complexe protéique Exocyste, ce qui favorise le rapprochement des membranes à fusionner, et elle participe au remodelage du cytosquelette d'actine (Inoue et al., 2003; Murphy et al., 1999; TerBush et al., 1996).

### *c- L'extinction du signal insulinique*

Afin d'éviter l'hypoglycémie, plusieurs mécanismes permettent de stopper le signal insulinique. Le  $\text{PIP}_3$  est déphosphorylé par la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Maehama and Dixon, 1998) (Figure 13). La phosphorylation sur les résidus sérines par des kinases ou l'internalisation puis la dégradation du récepteur de l'insuline permettent également de réduire son activité tyrosine kinase et le signal de l'insuline (Marshall and Olefsky, 1980; Takayama et al., 1988; Tanti et al., 1994).

### 3) L'entrée de glucose dans la cellule insulino-sensible

#### *a- Le transporteur de glucose Glut4*

Glut4 appartient à la famille des transporteurs GLUT qui ont été précédemment détaillés (Figure 3). Il est exprimé dans le cœur, le muscle squelettique, le tissu adipeux et dans les cellules de cancer du sein (Charron et al., 1989; Medina et al., 2003). Il est fortement conservé dans les cellules musculaires squelettiques et les adipocytes. Il possède une caractéristique particulière puisqu'à l'état basal, il est principalement localisé dans le compartiment intracellulaire, alors que sous l'effet de l'insuline, il est redistribué à la membrane plasmique, où il catalyse l'entrée de glucose de façon ATP-indépendante. Son invalidation chez la souris, spécifiquement dans le tissu adipeux, engendre une intolérance au glucose, une hyper-insulinémie et une insulino-résistance musculaire, ce qui met en évidence l'importance de Glut4 dans le développement de l'insulino-résistance périphérique (Abel et al., 2001).

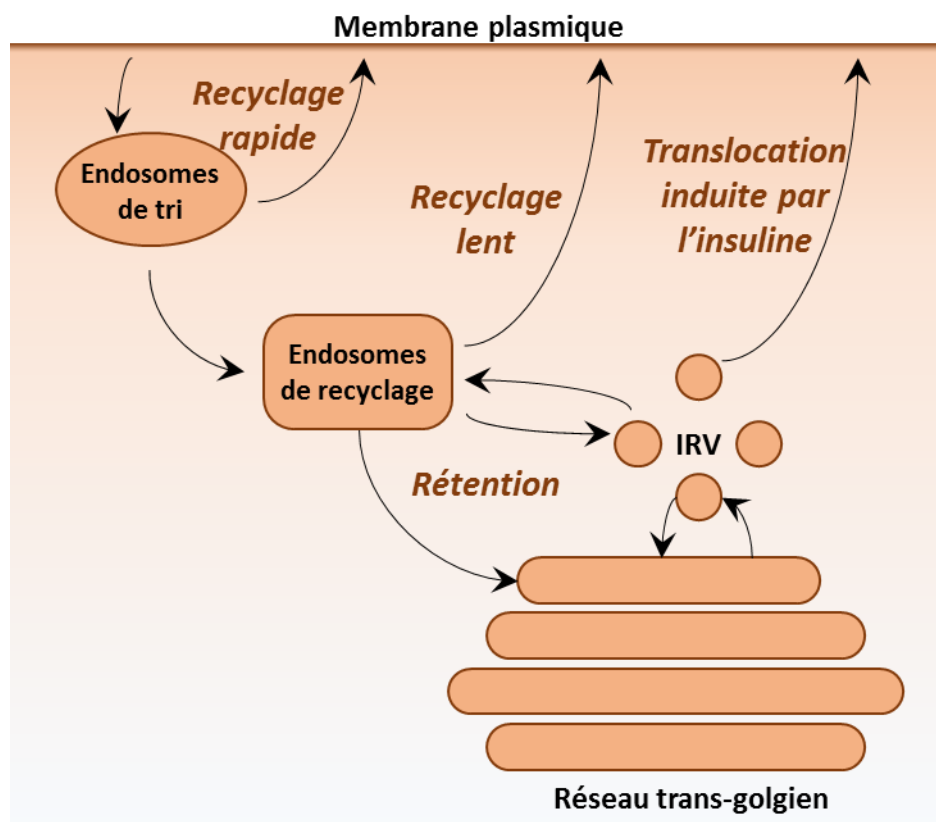
#### *b- La formation des vésicules contenant Glut4 et sensibles à l'insuline*

En l'absence d'insuline, la majorité du transporteur Glut4 se trouve dans le compartiment intracellulaire, plus précisément dans des petites vésicules (50 à 70 nm de diamètre), les endosomes et le réseau trans-golgien (Slot et al., 1991) (Figure 16). Les petites vésicules peuvent être divisées en deux catégories : les vésicules sensibles à l'insuline ou IRV (insulin-responsive vesicles), transférées à la membrane plasmique sous l'effet de l'insuline, et les vésicules de transport intracellulaire, insensibles à l'insuline (Bogan and Kandror, 2010).

Les IRV expriment en plusieurs exemplaires Glut4, IRAP (insulin-regulated aminopeptidase), la sortiline, LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) et VAMP-2 (Cain et al., 1992; Jedrychowski et al., 2010; Keller et al., 1995; Lin et al., 1997). La formation des vésicules a lieu au niveau d'invaginations de membranes intracellulaires donneuses formant des puits de clathrine et nécessite le recrutement de protéines d'intérêt (ici, Glut4, IRAP, la sortiline, LRP1 et VAMP-2) grâce aux protéines adaptatrices GGA (Golgi-localized, Gamma Adaptin ear-containing, ARF-binding) (Li et al., 2007; Li and Kandror, 2005; Watson et al., 2004). A ce jour, seule la sortiline est connue pour interagir avec les autres

protéines des IRV et les protéines adaptatrices GGA (Li et al., 2009; Nielsen et al., 2001; Shi et al., 2008; Shi and Kandror, 2005, 2007). D'autres protéines adaptatrices sont impliquées dans la biogenèse des IRV, telles que ACAP1 (ARF-GAP with coiled-coil ankyrin repeat and PH domain-containing protein 1) et AP1 mais leur fonction précise n'est pas encore élucidée (Gillingham et al., 1999; Li et al., 2007).

*c- Le trafic des vésicules contenant Glut4 et sensibles à l'insuline*



**Figure 16 : Le trafic de Glut4 dans les cellules insulino-sensibles.**  
*D'après (Bogan and Kandror, 2010; Leto and Saltiel, 2012)*

Une fois formées, les IRV sont retenues dans le compartiment intracellulaire des cellules non exposées à l'insuline, grâce à un ou plusieurs motifs de rétention récemment mis en évidence (Martinez-Arca et al., 2000; Talantikite et al., 2016). Cette rétention met en jeu deux mécanismes, un trafic cyclique entre le réseau trans-golgien et les endosomes de recyclage et une rétention mécanique grâce des protéines d'ancrage (Figure 16). En effet, la

protéine TUG (tether containing a UBX domain, for Glut4) interagit avec Glut4, permettant ainsi l'ancrage des IRV dans la cellule (Bogan et al., 2003).

L'insuline provoque une redistribution du transporteur Glut4 et de toutes les protéines présentes dans les IRV à la membrane plasmique, principalement en favorisant l'exocytose des IRV et en inhibant légèrement l'endocytose (Sato et al., 1993; Yang and Holman, 1993). Elle induit également la dissociation de Glut4 et TUG dans les adipocytes et les cellules musculaires (Bogan et al., 2003; Schertzer et al., 2009). Rapidement, les vésicules fusionnées sont réassemblées et internalisées vers les endosomes de tri puis les endosomes de recyclage et le réseau trans-golgien (Bogan and Kandror, 2010).

### III/ Le diabète : définitions, origines et traitements

Le diabète sucré (ou mellitus) est, selon l'OMS, « *une affection chronique due soit à une insuffisance génétique ou acquise de la production d'insuline par le pancréas, soit au fait que cette insuline n'est pas assez active. Cette insuffisance provoque une augmentation de la glycémie [...] qui conduit à son tour à des lésions affectant plusieurs appareils ou systèmes, en particulier les vaisseaux et les nerfs.* »

Les symptômes du diabète sucré sont une soif intense, une polyurie et des troubles de la vision. Ses effets sont multiples : à court terme, il entraîne le développement de complications rétinienues et rénales, pouvant, à long terme et sans traitement efficace, provoquer le décès. Les personnes atteintes de diabètes sont également plus à même de développer des maladies vasculaires.

Selon l'OMS, une personne ayant une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L est considérée diabétique. Pour diagnostiquer un état diabétique, un test de tolérance au glucose par voie orale peut être réalisé en laboratoire. Il s'agit de mesurer la glycémie à jeun et deux heures après l'absorption de glucose (75 g pour un adulte). On parle d'intolérance au glucose si la glycémie post-administration dépasse 1,40 g/L et de diabète si elle excède 2,00 g/L.

Le diabète sucré est divisé en deux catégories :

- Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune. Il est associé à un défaut de sécrétion d'insuline dû à la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas par le système immunitaire ;

- Le diabète de type 2 est une réduction partielle de la sécrétion d'insuline, associée à une insulino-résistance périphérique.

### *A. Le diabète de type 1*

Le diabète de type 1, ou diabète juvénile, est une pathologie métabolique au cours de laquelle le système immunitaire inné détruit les cellules  $\beta$  du pancréas. Il se déclenche généralement dans l'enfance ou l'adolescence, chez des individus ayant une prédisposition génétique et/ou soumis à des facteurs environnementaux particuliers tels qu'une infection virale, l'exposition à des toxines ou un milieu psychosocial défavorable. L'acidose plasmatique est généralement le premier signe de la maladie. La majorité (85-90%) des personnes atteintes de diabète de type 1 possède des marqueurs de destruction immunitaire spécifique de la cellule  $\beta$ , c'est-à-dire des anticorps dirigés contre l'insuline, les cellules  $\beta$  ou la glutamate décarboxylase (GAD) (Bottazzo et al., 1974; Kaufman et al., 1992).

Les personnes atteintes de diabète de type 1 sont totalement dépendantes de l'insuline exogène qu'elles doivent s'injecter, leur organisme étant dans l'incapacité d'en produire. Actuellement, il existe deux thérapies pour aider les patients à contrôler leur glycémie. La première consiste en une injection d'insuline, soit par voie sous-cutanée, soit à l'aide d'une pompe à insuline qui « mime » la sécrétion journalière d'insuline. Dans les cas où la glycémie ne peut pas être contrôlée, la deuxième solution consiste en une transplantation de pancréas ou d'îlots de Langerhans (même si cette dernière n'est encore qu'au stade expérimental).

### *B. Le diabète de type 2*

Le diabète de type 2 est une pathologie métabolique combinant une insulino-résistance périphérique et un dysfonctionnement des cellules  $\beta$ . Il se développe généralement chez les individus âgés d'au moins 40 ans. Il est la combinaison entre une prédisposition génétique et des facteurs sociaux et environnementaux tels qu'une dérégulation hormonale, la sédentarisation, le stress, une alimentation déséquilibrée, la consommation de tabac et/ou d'alcool qui entraînent le développement de l'obésité.

Selon l'OMS, en 2014, 1,9 milliards d'adultes étaient en situation de surpoids, dont 600 millions étaient obèses (Ng et al., 2014). Le tissu adipeux est capable de libérer de nombreuses

adipocytokines qui participent à la régulation de l'homéostasie glucidique (leptine, adiponectine, résistine) et de la réponse inflammatoire (chimiokines, cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires) (Maeda et al., 1996; Stepan et al., 2001; Zhang et al., 1994). L'obésité est caractérisée par une hypertrophie des adipocytes et une modification de leurs profils sécrétoires. En effet, l'inflammation du tissu adipeux obèse induit des taux circulants élevés de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-6 (interleukine-6) et IL-1 $\beta$  (interleukine-1 $\beta$ )) et d'acides gras libres, comme cela a été montré chez la souris et chez l'Homme (Hotamisligil et al., 1993; Visser et al., 1999). Ces cytokines pro-inflammatoires réduisent la sensibilité à l'insuline des tissus cibles et entraînent des dysfonctionnements de la cellule  $\beta$  (Hotamisligil et al., 1993; Jager et al., 2007; Rotter et al., 2003).

En plus des facteurs environnementaux, une prédisposition génétique est en faveur du développement du diabète de type 2. Les données de la littérature mettent en évidence 63 polymorphismes nucléotidiques sur 18 gènes différents impliqués dans le diabète de type 2 (Kaul and Ali, 2016). Parmi eux, on trouve les transporteurs pancréatiques de glucose Glut1 et Glut2 et les deux sous-unités des canaux  $K_{ATP}$ , SUR1 et Kir6.2 (Du et al., 2013; Haghverdizadeh et al., 2014; Kilpelainen et al., 2007; Qin et al., 2013).

Bien qu'il soit indispensable de modifier le mode de vie des personnes atteintes de diabète de type 2 (alimentation équilibrée, pratique d'une activité physique régulière), une large gamme de traitements est actuellement disponible pour traiter cette pathologie :

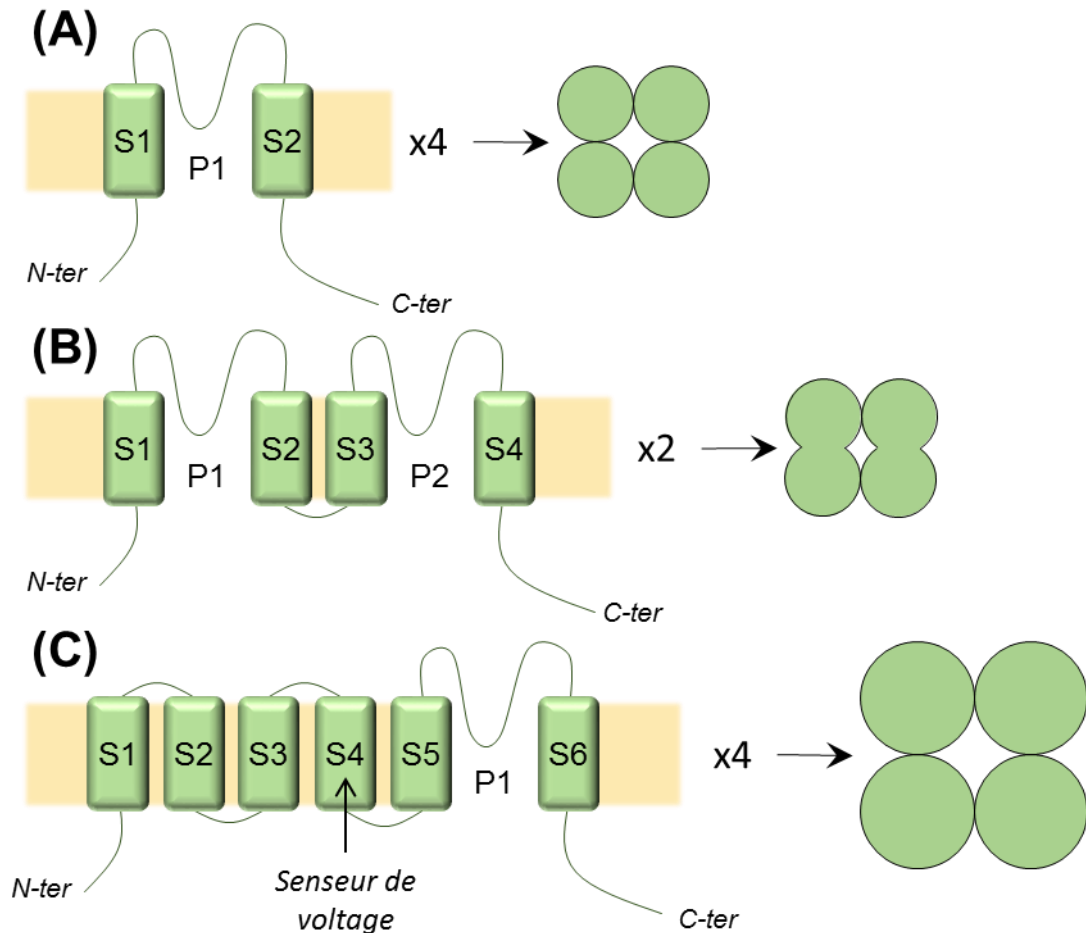
- Les biguanides, comme la metformine, stimulent l'AMPK (AMP-activated protein kinase), une enzyme essentielle au contrôle de l'homéostasie énergétique cellulaire. Son activation conduit à l'inhibition des voies anaboliques (synthèse de lipides, de protéines et de glucose) et à l'activation des voies cataboliques (oxydation des acides gras, stockage de glucose) (Adnitt et al., 1973; Wollen and Bailey, 1988). Il s'agit d'une molécule anti-hyperglycémique qui diminue la résistance à l'insuline des tissus périphériques (Rossetti et al., 1990) ;
- Les sulphonylurées, comme la glibenclamide, se fixent sur la sous-unité SUR1 des canaux  $K_{ATP}$ . Il en résulte la fermeture de ces derniers, une dépolarisation membranaire, l'ouverture des canaux  $Ca_v$  et une augmentation de la sécrétion d'insuline (Basabe et al., 1976; Nelson et al., 1987; Zunkler et al., 1988) ;



- Les inhibiteurs des  $\alpha$ -glucosidases (ex : l'acarbose) retardent l'absorption intestinale de glucose après un repas (Joubert et al., 1986). Ils sont peu efficaces et peu utilisés depuis les années 2000. De plus, ils provoquent la stagnation et la fermentation des sucres dans l'intestin à l'origine des troubles digestifs et de flatulences ;
- Les analogues du GLP-1 (ex : exendine-4) stimulent la sécrétion d'insuline induite par le glucose et réduisent la sécrétion de glucagon et l'appétit (Greig et al., 1999).
- Les gliptines sont des inhibiteurs de la DPP4 (dipeptidyl peptidase-4), l'enzyme de dégradation des hormones incrétines. Ils augmentent le temps de demi-vie du GLP-1, qui est d'environ dix-sept minutes dans le sérum chez l'Homme, ce qui a pour conséquence l'augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Mari et al., 2005; Schjoldager et al., 1989) ;
- Les inhibiteurs du SGLT2 (sodium glucose linked transporter 2), un co-transporteur  $\text{Na}^+$ /glucose rénal, augmentent l'élimination urinaire de glucose, ce qui réduit l'hyperglycémie (Kakinuma et al., 2010) ;
- L'insuline stimule le stockage de glucose dans les tissus insulino-sensibles. Elle est utilisée lorsque le pancréas n'est plus en mesure de couvrir les besoins de l'organisme.

Ces traitements sont efficaces mais provoquent de nombreux effets secondaires indésirables comme l'hypoglycémie et de nombreux troubles digestifs, ce qui oblige les laboratoires pharmaceutiques à identifier d'autres moyens de traiter le diabète de type 2 tout en conservant une qualité de vie des patients optimale.

## Partie 2 : Le canal TREK-1, un canal de fond impliqué dans la sécrétion d'insuline



**Figure 17 : Structures des canaux potassiques.**

(d'après (Petkov, 2012)) (A) Sous-unité  $\alpha$  des canaux  $K_{ATP}$ . (B) Sous-unité  $\alpha$  des canaux  $K_{2P}$ . (C) Sous-unité  $\alpha$  des canaux  $K_V$ .

Les canaux  $K^+$  présents à la membrane plasmique des cellules excitables jouent un rôle majeur dans de nombreux processus biologiques (excitabilité, croissance cellulaire, prolifération, apoptose). Chez les mammifères, ils sont divisés en trois groupes en fonction de leur organisation structurale. La sous-unité  $\alpha$  compte deux, quatre ou six segments transmembranaires et un ou deux domaines pore (P) (Figure 17) :

- Le groupe de canaux  $K_{ATP}$  : la sous-unité  $\alpha$  possède deux domaines transmembranaires et 1 domaine P (Figure 17A) ;

- Le groupe de canaux K2P : la sous-unité  $\alpha$  possède quatre domaines transmembranaires et 2 domaines P (Figure 17B) ;
- Le groupe de canaux  $K_v$  : la sous-unité  $\alpha$  possède six domaines transmembranaires et 1 domaine P (Figure 17C).

Ici, on s'intéressera uniquement au groupe des canaux K2P, et plus particulièrement au canal TREK-1, l'un des éléments clé de ce mémoire.

## I/ Description du canal TREK-1

### *A. La grande famille des canaux potassiques à deux domaines P (K2P)*

La famille des canaux K2P compte seize membres qui ont, chacun, une spécificité d'expression et de propriétés pharmacologiques (sensibilité aux acides gras libres, aux anesthésiques volatiles, au pH, à la tension membranaire, à l'hypoxie, à la chaleur, ...). Ils sont impliqués dans le couplage métabolisme-excitation, la perception de la douleur et de la chaleur, la régulation du potentiel de repos membranaire et du volume cellulaire. Toutes ces caractéristiques font des canaux K2P des cibles importantes à étudier pour le traitement de pathologies telles que l'hypoxie, l'ischémie cérébrale, l'accident vasculaire cérébrale, l'hypertension, la dépression et le diabète.

#### 1) La famille des canaux TWIK (tandem-pore weak inward rectifying $K^+$ channels)

Le canal TWIK-1 est le premier canal K2P identifié à l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire) de Valbonne (Lesage et al., 1996). Chez l'Homme, il est majoritairement exprimé dans le cerveau, notamment au niveau du cervelet, alors que chez la souris, il est exprimé dans le cerveau, les poumons, les reins et le muscle squelettique (Lesage et al., 1997; Medhurst et al., 2001). Le canal TWIK-2, le deuxième membre de la famille TWIK, est exprimé dans de nombreux tissus périphériques, tels que le pancréas, l'utérus, la rate, l'estomac, ... (Medhurst et al., 2001).

## 2) La famille des canaux TASK (tandem-pore acid-sensing K<sup>+</sup> channels)

Le canal TASK-1 est le premier canal identifié de cette famille (Duprat et al., 1997). Chez l'Homme, il est majoritairement exprimé dans le cerveau, le placenta, le pancréas et les poumons (Medhurst et al., 2001). Chez la souris, on le trouve également dans le cœur (Medhurst et al., 2001). Le canal TASK-3 est plus faiblement exprimé que le canal TASK-1, et préférentiellement dans le système nerveux central (Kim et al., 2000; Medhurst et al., 2001; Rajan et al., 2000).

Ces canaux K<sup>+</sup> de fond sont actifs et ouverts à des potentiels de membrane physiologiques. Ils sont très sensibles aux variations de pH : l'acidification du milieu extracellulaire entraîne leur fermeture (Duprat et al., 1997; Kim et al., 2000). Ils sont très peu sensibles aux inhibiteurs des canaux K<sup>+</sup>. La fluoxétine, un antidépresseur largement utilisé dans le traitement de la dépression, inhibe les canaux TASK-1 alors que les anesthésiques volatiles tels que l'halothane les stimulent (Eckert et al., 2011; Patel et al., 1999).

## 3) La famille des canaux TALK (TWIK-related alkaline pH-activated K<sup>+</sup> channels)

Le premier canal cloné de cette famille est le canal TASK-2 (Reyes et al., 1998) qui tire son nom de sa sensibilité au pH extracellulaire, tout comme les canaux TASK. Chez l'Homme et la souris, il est absent du système nerveux central et principalement exprimé dans le foie et les reins (Medhurst et al., 2001; Reyes et al., 1998). Sa forte identité avec les canaux TALK-1 et TALK-2, fortement présents dans le pancréas et sensibles à l'acidification extracellulaire, lui a permis d'appartenir à cette famille (Girard et al., 2001). Au potentiel de repos membranaire, ces canaux sont actifs et ouverts (Kang and Kim, 2004).

## 4) La famille des canaux THIK (tandem-pore halothane-inhibited K<sup>+</sup> channels)

Les canaux THIK-1 et THIK-2 ont été identifiés en 2001 (Girard et al., 2001; Rajan et al., 2001). Chez l'Homme, THIK-1 n'est pas exprimé alors que chez le rat, son expression est ubiquitaire (Girard et al., 2001; Rajan et al., 2001). Le canal THIK-2 est présent chez l'Homme,

dans le cœur, le muscle squelettique et le pancréas (Girard et al., 2001). Chez le rat, il est préférentiellement exprimé dans le cerveau, les poumons, le foie, l'estomac et la rate (Rajan et al., 2001). Seul THIK-1 est activé par l'acide arachidonique (AA) et inhibé par l'halothane (Rajan et al., 2001).

### 5) La famille des canaux TRESK (TWIK-related spinal cord K<sup>+</sup> channels)

Peu d'informations sont connues à propos des canaux K<sup>+</sup> de fond TRESK. Le canal TRESK-1 est uniquement exprimé dans la moelle épinière chez l'Homme (Sano et al., 2003b). Il est inhibé par les inhibiteurs classiques des canaux K<sup>+</sup> (ex : Ba<sup>2+</sup>, lidocaïne, ...) et les acides gras libres insaturés tels que l'AA, et sensible aux variations extrêmes de pH extracellulaire et intracellulaire (Sano et al., 2003b). Le canal TRESK-2 est présent dans de nombreux tissus chez la souris et l'Homme, et inhibé par l'AA (Kang et al., 2004b).

### 6) La famille des canaux TREK (TWIK-related K<sup>+</sup> channels)

Le premier membre de la famille TREK identifié est le canal TREK-1 (Fink et al., 1996). Il est sensible aux ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> extracellulaires et fortement exprimé dans le cerveau, l'estomac et l'intestin chez l'Homme (Fink et al., 1996; Medhurst et al., 2001). La régulation de son activité est très complexe puisqu'elle met en jeu des molécules endogènes (GABA, enzymes, ...), des molécules exogènes (anesthésiques volatiles, acides libres insaturés à chaîne longue) et des états physico-chimiques (température, acidification, hypoxie, pression, ...). L'expression et la régulation du canal TREK-1 seront détaillées dans la suite de cette partie. Le canal TREK-2 possède 65% d'identité avec TREK-1 (Bang et al., 2000). Il est exprimé dans de nombreux tissus chez l'Homme, ainsi que dans le cervelet et le pancréas chez le rat (Bang et al., 2000; Medhurst et al., 2001). Il est activé par l'étirement membranaire, l'acidification et les acides gras insaturés comme l'AA (Bang et al., 2000).

## *B. L'expression du canal TREK-1*

L'expression du canal TREK-1 chez l'Homme et les rongeurs est très bien documentée (Meadows et al., 2000; Talley et al., 2001). Chez la souris, il est très fortement exprimé dans le cerveau embryonnaire et immature (Aller and Wisden, 2008). Dans le système nerveux central adulte, on le retrouve majoritairement dans le cortex préfrontal, le striatum, l'hypothalamus, l'hippocampe, les neurones sérotoninergiques du raphé dorsal et l'amygdale (Aller and Wisden, 2008; Heurteaux et al., 2006; Meadows et al., 2000; Talley et al., 2001). Il est également présent au sein du système nerveux périphérique, comme par exemple, au niveau des neurones sensoriels (Alloui et al., 2006).

L'expression du canal TREK-1 n'est pas exclusive au système nerveux puisqu'on le retrouve dans l'estomac, le petit intestin, les reins, le pancréas, les testicules, l'utérus et la prostate chez l'Homme (Meadows et al., 2000).

## *C. Structure et dimérisation du canal TREK-1*

La structure du canal TREK-1 est commune à tous les canaux K2P (Figure 17B). Il est composé de deux sous-unités  $\alpha$  (Fink et al., 1996). Chaque sous-unité possède deux domaines pores (P), P1 et P2, qui s'arrangent en tandem avec les quatre segments transmembranaires (Fink et al., 1996) (Figure 17B). La boucle extracellulaire située entre le premier segment transmembranaire et le domaine P1 présente une courte hélice  $\alpha$  qui favorise la dimérisation des sous-unités  $\alpha$ , selon une symétrie bilatérale (Fink et al., 1996; Kollwe et al., 2009). Cet arrangement des deux sous-unités  $\alpha$  permet aux deux domaines P1 et aux deux domaines P2 de former le pore du canal, sélectif au  $K^+$  (Kollwe et al., 2009).

## *D. Les partenaires du canal TREK-1*

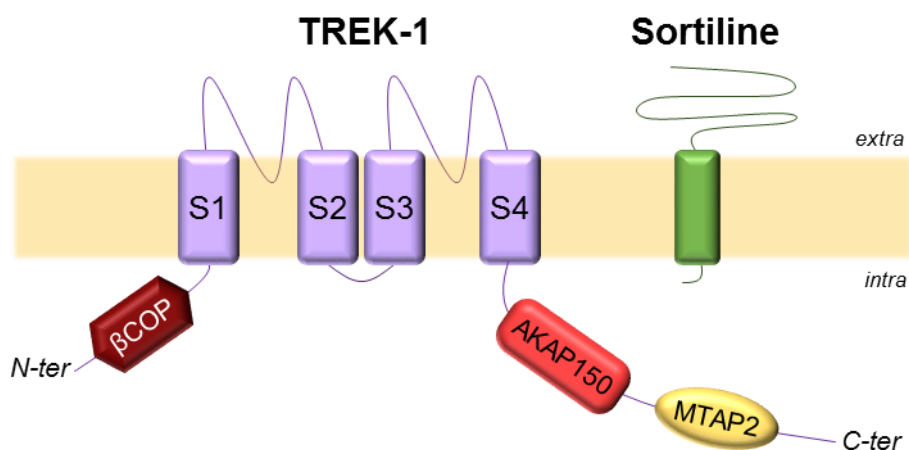
AKAP150 (A-kinase-anchoring protein 150) est une protéine d'échafaudage capable d'interagir avec le canal TREK-1 dans les terminaisons nerveuses (Sandoz et al., 2006) (Figure 18). Leur association rend le canal pleinement actif et insensible à l'AA, à l'étirement membranaire ou à l'acidification extracellulaire (Sandoz et al., 2006).

MTAP2 (microtubule-associated protein 2) est une deuxième protéine d'échafaudage capable d'interagir avec le canal TREK-1 au niveau des épines dendritiques (Sandoz et al.,

2008) (Figure 18). Leur interaction ne modifie pas les propriétés biophysiques du canal mais augmente sa densité à la membrane plasmique grâce à la mise en jeu du cytosquelette et de la tubuline (Sandoz et al., 2008).

La sous-unité  $\beta$  de COP1 (coatmer protein complex 1) est le troisième partenaire du canal TREK-1 (Kim et al., 2010) (Figure 18). Comme pour MAP2, leur interaction ne modifie pas les propriétés biophysiques du canal mais augmente sa densité à la surface cellulaire (Kim et al., 2010).

Le NTSR3 (neurotensin receptor 3), appelé aussi sortiline, est le quatrième partenaire du canal TREK-1 et fera l'objet d'une description détaillée dans la troisième partie de cette introduction (Mazella et al., 2010) (Figure 18). Leur interaction dans le réseau trans-golgien induit une augmentation de l'expression du canal à la membrane plasmique (Mazella et al., 2010).



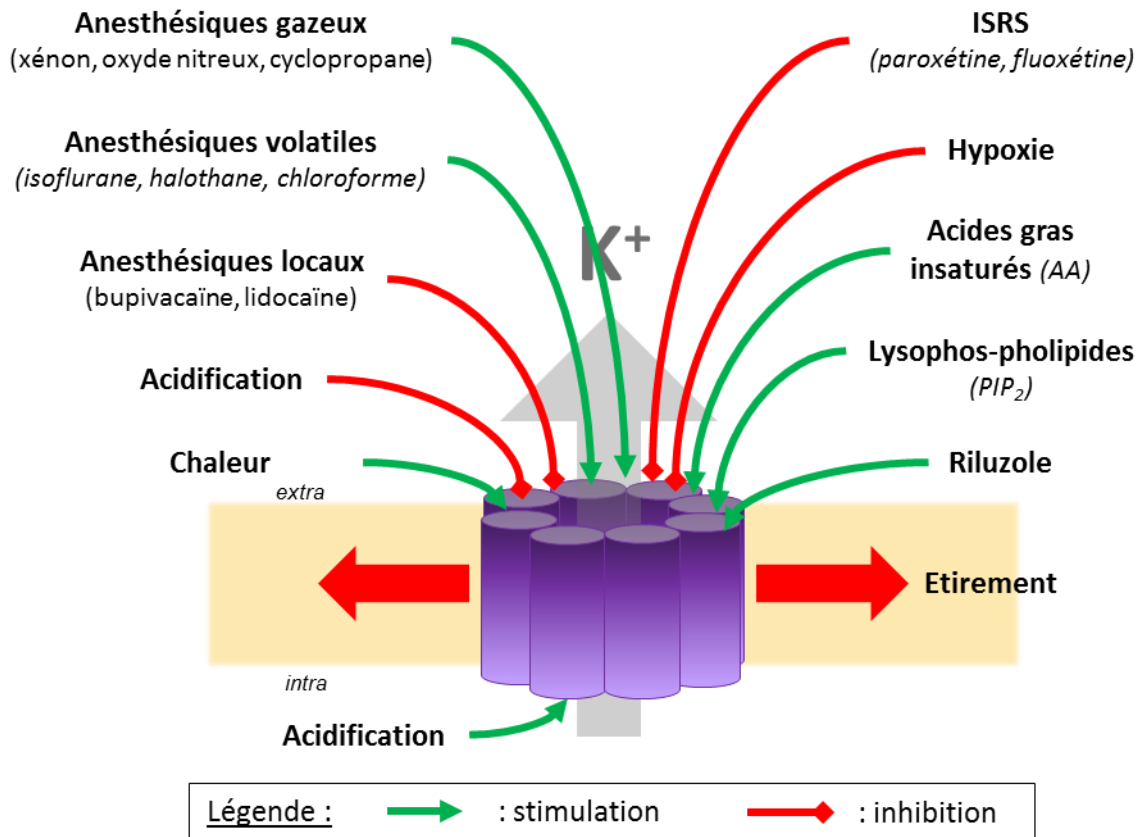
**Figure 18 : Le canal TREK-1 et ses partenaires.**

### *E. Les régulations du canal TREK-1*

Les canaux de la famille TREK, tout comme la majorité des canaux K<sup>2P</sup>, sont relativement insensibles aux bloqueurs classiques des canaux K<sup>+</sup> tels que le tétraéthylammonium.

Lorsque la cellule est au repos, à température ambiante et en conditions non stressantes, les canaux TREK-1 ont une faible probabilité d'ouverture. Leur ouverture est dépendante du potentiel de membrane (Maingret et al., 2002). Ils possèdent des propriétés pharmacologiques uniques qui leur confèrent une importance particulière dans les processus

physiologiques et physiopathologiques, résumées dans la Figure 19. (Maingret et al., 2000a; Maingret et al., 1999, 2000b).



**Figure 19 : Les différentes régulations de l'activité du canal TREK-1.**

### 1) Les propriétés pharmacologiques du canal TREK-1

Le canal TREK-1 est activé par les anesthésiques volatiles tels que l'halothane, l'isoflurane et le chloroforme, à des concentrations cliniques (Patel et al., 1999) (Figure 19). Cet effet passe par l'extrémité C-terminale du canal et provoque une hyperpolarisation de la membrane plasmique (Patel et al., 1999). Les anesthésiques gazeux (xénon, oxyde nitreux, cyclopropane) ont également un effet stimulateur sur le canal, contrairement aux anesthésiques locaux comme la lidocaïne qui l'inhibent (Gruss et al., 2004; Nayak et al., 2009; Punke et al., 2003) (Figure 19). Les souris invalidées pour ce canal (souris TREK-1<sup>-/-</sup>) sont insensibles aux anesthésiques volatiles, ce qui illustre son implication dans **l'anesthésie** (Heurteaux et al., 2004).

Les canaux TREK-1 sont fortement exprimés dans l'hippocampe, zone du cerveau très sensible à l'ischémie et à l'hypoxie. Chez le rat, l'ischémie cérébrale chronique provoque une



surexpression hippocampique des canaux TREK-1 (Xu et al., 2004). Par ailleurs, en conditions hypoxiques, les courants TREK-1 sont inhibés, et insensibles à l'AA et à l'étirement membranaire (Miller et al., 2003) (Figure 19). Le riluzole et les acides gras libres, des agents neuroprotecteurs, sont capables d'activer ces canaux (Duprat et al., 2000; Lauritzen et al., 2000) (Figure 19). De plus, les souris TREK-1<sup>-/-</sup> présentent une hypersensibilité à l'ischémie, ce qui met en évidence le rôle du canal TREK-1 dans **la neuroprotection** (Heurteaux et al., 2004).

Les courants TREK-1 sont également inhibés par les ISRS (inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine), des antidépresseurs très largement utilisés comme la paroxétine et la fluoxétine (plus connue sous son nom commercial, le Prozac®), et par les antipsychotiques tels que la chlorpromazine (Kennard et al., 2005; Sandoz et al., 2011; Thummler et al., 2007) (Figure 19).

## 2) La mécano-sensibilité des canaux TREK-1

Les canaux TREK-1 sont activés par la pression négative (Maingret et al., 1999; Patel et al., 1998) (Figure 19). En effet, le trinitrophénol s'insère dans la membrane cellulaire et crée une courbure convexe, ce qui provoque l'ouverture des canaux TREK-1. A l'inverse, la chlorpromazine et la tétracaïne génèrent une courbure concave, les canaux se ferment (Patel et al., 1998). La mécano-sensibilité des canaux TREK-1 met en jeu le quatrième domaine transmembranaire et l'extrémité C-terminale qui interagit avec les phospholipides membranaires (Chemin et al., 2005; Honore et al., 2002).

## 3) La sensibilité des canaux TREK-1 à l'acidification

En conditions basales, lorsque le pH est physiologique (pH ≈ 7,3), les canaux TREK-1 sont dans un état fermé. L'acidification du milieu intracellulaire provoque leur ouverture et les rend insensibles à l'AA, à la tension membranaire et à la phosphorylation (Honore et al., 2002; Maingret et al., 1999) (Figure 19).

Les courants TREK-1 sont inhibés par l'acidification du milieu extracellulaire (Cohen et al., 2008; Sandoz et al., 2009) (Figure 19).

#### 4) La thermo-sensibilité des canaux TREK-1

L'activité des canaux TREK-1 est modulée par la température. En effet, une augmentation progressive de la température induit leur ouverture (Maingret et al., 2000a) (Figure 19). La gamme de température optimale d'activation se situant entre 30 et 42°C, les canaux TREK-1 contrôlent efficacement le potentiel de membrane des cellules à 37°C, la température corporelle.

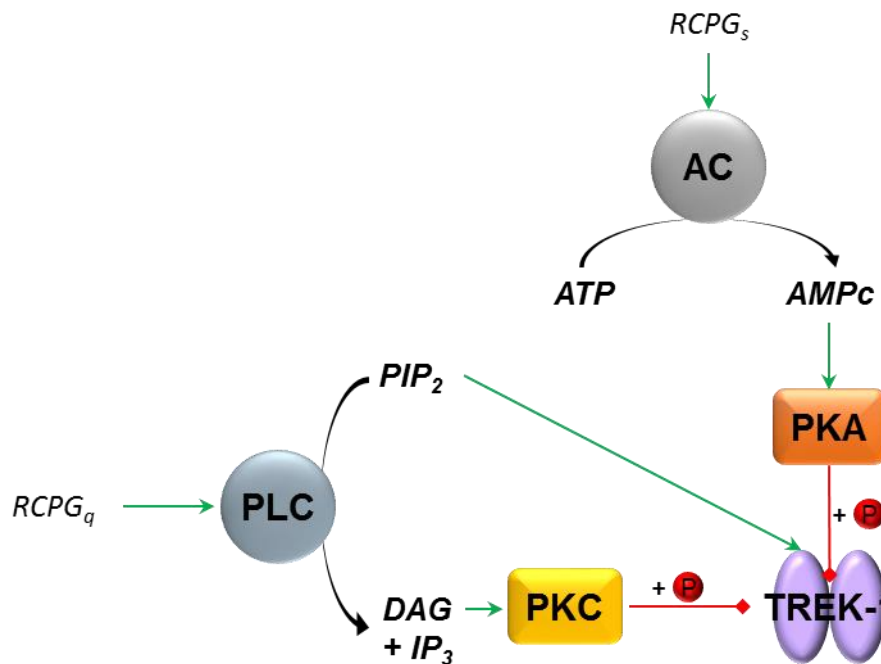
#### 5) La sensibilité des canaux TREK-1 aux acides gras libres insaturés et aux lysophospholipides

L'AA, un acide gras insaturé à chaîne longue, est capable de stimuler de façon réversible les courants TREK-1 (Patel et al., 1998) (Figure 19). Cet effet direct met en jeu sa spécificité structurale car les acides gras saturés ou les dérivés des acides gras insaturés à chaîne longue n'ont pas d'effet sur l'activité du canal (Maingret et al., 2001).

Les lysophospholipides sont également des activateurs des canaux TREK-1 (Chemin et al., 2005; Maingret et al., 2000b) (Figure 19). En effet, le PIP<sub>2</sub>, un phospholipide très présent dans la bicouche lipidique, active l'ouverture des canaux TREK-1 en favorisant l'interaction entre l'extrémité cytoplasmique C-terminale du canal et la membrane plasmique (Lopes et al., 2005; Maingret et al., 2000b; Sandoz et al., 2011) (Figure 19).

#### 6) La sensibilité des canaux TREK-1 aux seconds messagers

Les seconds messagers issus de l'activation des RCPG ont un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité des canaux TREK-1 (Figure 20). Ils stimulent des protéines kinases comme la PKA (proteïn kinase A) ou la PKC (proteïn kinase C) qui phosphorylent ces canaux sur de nombreuses sérines de leur région C-terminale (Fink et al., 1996; Lopes et al., 2005; Patel et al., 1998) (Figure 20). En effet, dans un premier temps, la PKA phosphoryle la sérine 333, ce qui permet la phosphorylation de la sérine 300 par la PKA ou la PKC dans un deuxième temps (Murbartian et al., 2005).



**Figure 20 : Régulation de l'activité des canaux TREK-1 par les seconds messagers.**

Les agonistes des RCPG<sub>s</sub> inhibent les canaux TREK-1 puisque leurs effets passent par la production d'AMPc et l'activation de la PKA (Patel et al., 1998) (Figure 20). Les agonistes des RCPG<sub>q</sub> (par exemple, le récepteur métabotrope 1a du glutamate) inhibent également les courants TREK-1, selon plusieurs mécanismes (Chemin et al., 2003; Lopes et al., 2005; Murbartian et al., 2005) (Figure 20). L'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> en DAG et IP<sub>3</sub> par la PLC réduit la quantité de PIP<sub>2</sub> disponible à la membrane plasmique (Lopes et al., 2005). Le DAG ainsi produit est également capable d'inhiber le canal, grâce à l'activation de la PKC (Chemin et al., 2003) (Figure 20).

## II/ Le canal TREK-1 dans la physiologie et la physiopathologie

Le canal TREK-1 est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques comme l'anesthésie, la neuroprotection, la sensibilité à la chaleur, ... Cette deuxième partie s'intéresse à l'implication du canal TREK-1 dans la perception de la douleur, la dépression et les maladies métaboliques.

## A. La perception de la douleur

Le canal TREK-1 est exprimé dans de nombreux types de neurones sensoriels (Alloui et al., 2006). Chez les souris TREK-1<sup>-/-</sup>, les récepteurs sensoriels à la douleur (nocicepteurs) ont des réponses beaucoup plus importantes sous l'effet des variations de température (Alloui et al., 2006). Ces réponses sont d'autant plus importantes entre 30 et 45°C, gamme de température où le canal TREK-1 est le plus actif (Maingret et al., 2000a). De plus, les souris TREK-1<sup>-/-</sup> sont hypersensibles à la chaleur et présentent une allodynie, c'est-à-dire une douleur déclenchée par un stimulus qui est normalement indolore (Alloui et al., 2006). Cette étude met en évidence le rôle du canal TREK-1 dans **la réponse à la douleur**, ce qui en fait une cible pharmacologique intéressante pour le développement de nouvelles molécules analgésiques.

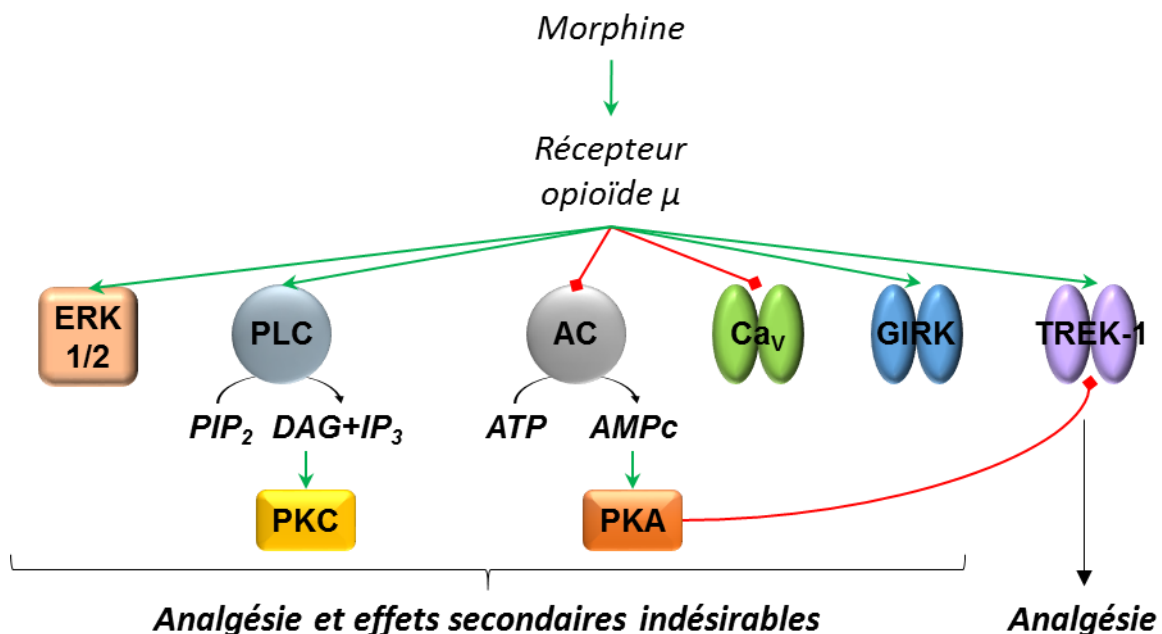


Figure 21 : Voies de signalisation impliquées dans les effets de la morphine.

Par exemple, la morphine est un analgésique puissant mais associé à de nombreux effets secondaires indésirables comme des troubles digestifs, une détresse respiratoire et la dépendance. Le récepteur opioïde de la morphine est un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé aux protéines G<sub>i/o</sub> (Chen et al., 1993) (Figure 21). Son activation par la morphine engendre l'inhibition de l'AC et des canaux Ca<sub>v</sub> et l'activation de la PLC, des canaux K<sup>+</sup> activés par les petites protéines G (GIRK) et de la voie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Chen and Yu, 1994; Fukuda et al., 1996; Piro et al., 1995; Sharma et al.,

1975; Smart et al., 1994) (Figure 21). Une étude récente, datée de 2013 et menée chez la souris, met en évidence l'implication du canal TREK-1 dans les effets analgésiques de la morphine (Devilliers et al., 2013). L'activation des récepteurs opioïdes  $\mu$  par la morphine conduit à l'activation des courants TREK-1 et met en jeu la sérine 333, cible de la PKA, mais n'engendre aucun effet secondaire associé à un traitement morphinique (Devilliers et al., 2013).

## *B. La dépression*

La dépression est un trouble mental caractérisé par une baisse de l'humeur, une faible estime de soi et une perte d'intérêt dans les activités habituellement ressenties comme agréables. Cette pathologie multifactorielle fait intervenir des facteurs environnementaux et génétiques. La théorie des monoamines est aujourd'hui l'hypothèse majeure selon laquelle la diminution des niveaux de sérotonine, de norépinephrine et/ou de dopamine dans le système nerveux central est à l'origine de la dépression. Les antidépresseurs actuels, tels que les ISRS, augmentent la concentration de sérotonine dans la fente synaptique, ce qui favorise sa neurotransmission.

Le canal TREK-1 est impliqué dans **la dérégulation de l'humeur** (Heurteaux et al., 2006). En effet, les souris TREK-1<sup>-/-</sup> se comportent de la même façon que des souris sauvages traitées avec la fluoxétine : elles sont moins résignées dans les tests comportementaux caractéristiques de la dépression chez la souris, elles sont résistantes à la dépression (Heurteaux et al., 2006). Plus précisément, les neurones du raphé dorsal, exprimant la sérotonine et le canal TREK-1, sont beaucoup plus actifs chez les souris TREK-1<sup>-/-</sup> et libèrent davantage de sérotonine que les neurones des souris sauvages (Heurteaux et al., 2006).

Plus récemment, il a été montré que l'expression du canal TREK-1 dans le cortex préfrontal est fortement augmentée en cas de dépression induite chez le rat, et que cet effet est contrecarré par un traitement à la fluoxétine (Chen et al., 2015). De plus, six polymorphismes nucléotidiques du gène *KCNK2* (codant le canal TREK-1) sont impliqués dans les troubles majeurs de l'humeur et l'efficacité des traitements antidépresseurs chez l'Homme (Congiu et al., 2015).

Ces données mettent en avant le rôle majeur du canal TREK-1 dans **les troubles de l'humeur**.

## C. Diabète et pathologies métaboliques

Actuellement, une seule publication montre un lien indirect entre le canal TREK-1 et le diabète (Garry et al., 2007). En effet, chez les souris TREK-1<sup>-/-</sup>, la vasodilatation induite par la pression locale est considérablement réduite, ce qui est l'une des conséquences du diabète de type 2 (Garry et al., 2007).

De façon plus générale, seulement quelques études ont montré l'implication des canaux K2P dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose et le développement de diabètes.

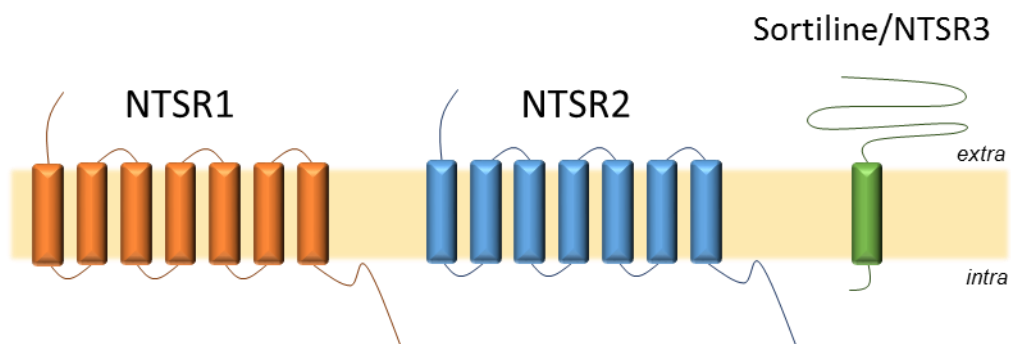
Les canaux TALK-1 sont les canaux K2P les plus abondamment exprimés dans la cellule  $\beta$  (Ku et al., 2012). Ils sont codés par le gène *KCNK16*, qui possède un polymorphisme impliqué dans la susceptibilité au diabète de type 2 (Cho et al., 2012; Sakai et al., 2013). Récemment, il a été montré que ces canaux régulent l'excitabilité de la cellule  $\beta$  (Vierra et al., 2015). En effet, l'inactivation génétique de ces canaux provoque une dépolarisation membranaire de la cellule  $\beta$ , ainsi que l'augmentation de l'influx calcique et de la deuxième phase de sécrétion d'insuline (Vierra et al., 2015). De plus, les souris TALK-1<sup>-/-</sup> sont plus résistantes à un régime enrichi en gras (Vierra et al., 2015).

Les canaux TASK-1 sont fortement exprimés dans les îlots de Langerhans chez l'Homme et la souris, et plus particulièrement à la membrane plasmique des cellules  $\beta$  (Dadi et al., 2014). L'inhibition des courants TASK-1 augmente la sécrétion d'insuline induite par le glucose, en favorisant la dépolarisation membranaire et l'influx calcique (Dadi et al., 2014).

Le canal TREK-2 a été identifié dans les cellules  $\beta$ , et plus particulièrement dans la lignée insulino-sécrétrice MIN6 (Kang et al., 2004a). Des courants de type TREK-1 ont également été mis en évidence par l'équipe du Dr. Mazella dans la lignée cellulaire  $\beta$ -TC3 (Mazella et al., 2010). **Identifier le rôle des canaux TREK-1 dans la sécrétion d'insuline est l'un des objectifs de ce mémoire.**

## Partie 3 : La sortiline, une protéine aux multiples fonctions

La neurotensine est un neuropeptide de treize acides aminés, initialement isolé de l'hypothalamus puis de l'intestin bovin (Carraway and Leeman, 1973; Kitabgi et al., 1976). Dans le système nerveux central, elle module la transmission dopaminergique, l'analgésie indépendante du naloxone et la sécrétion hormonale hypophysaire, et inhibe la prise alimentaire (Kalivas et al., 1985; Luttinger et al., 1982; Makino et al., 1978; Parolaro et al., 1983). Au niveau périphérique, elle régule la tension artérielle, la sécrétion d'acides gastriques et la réponse pro-inflammatoire (Andersson et al., 1976; Castagliuolo et al., 1999; Kitabgi et al., 1976; Osumi et al., 1978). La neurotensine est également capable de contrôler l'absorption intestinale des nutriments : libérée après un repas riche en gras, elle facilite l'absorption des lipides et augmente la sécrétion de sels biliaires (Gui and Carraway, 2001; Gui et al., 2000). Chez le rat, l'injection de neurotensine provoque une hypo-insulinémie associée à une hyperglycémie (Brown and Vale, 1976). Plus précisément, cette hormone stimule la sécrétion d'insuline à bas glucose et la réduit à haut glucose (Beraud-Dufour et al., 2009; Dolais-Kitabgi et al., 1979).



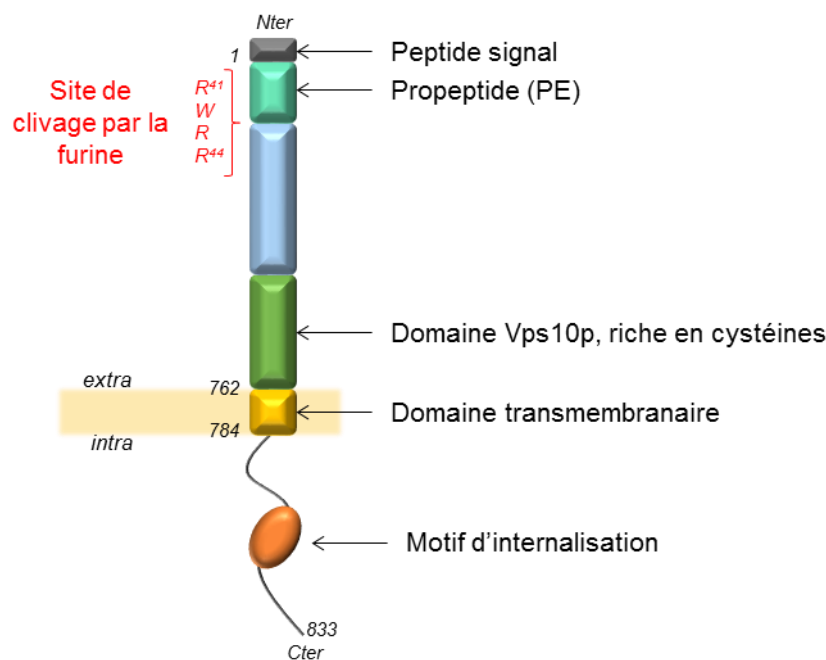
**Figure 22 : Structure des récepteurs de la neurotensine.**

Les effets de la neurotensine sont médiés par trois récepteurs : NTSR1, NTSR2 et la sortiline (ou NTSR3), tous les trois exprimés dans les îlots de Langerhans murins et les lignées de cellules  $\beta$  (Figure 22) (Beraud-Dufour et al., 2009; Coppola et al., 2008). Les récepteurs NTSR1 et NTSR2 appartiennent à la grande famille des RCPG (Chalon et al., 1996; Mazella et al., 1996; Tanaka et al., 1990). La sortiline, quant à elle, est un récepteur de tri ayant un seul et unique domaine transmembranaire (Mazella et al., 1989; Mazella et al., 1998). Dans la

cellule  $\beta$ , la neurotensine a un effet protecteur contre les agents cytotoxiques, grâce au complexe NTSR2/sortiline qui active la voie PI3K (Beraud-Dufour et al., 2009; Coppola et al., 2008). Dans ce cas, la fonction de la sortiline semble être l'adressage du NTSR2 à la membrane plasmique, comme cela a déjà été montré pour NTSR1 dans les cellules HT29 ou pour le canal TREK-1 dans les neurones (Martin et al., 2002; Mazella et al., 2010). Cependant, on ne peut pas exclure l'activation d'une ou plusieurs voies de signalisation par la sortiline, que ce soit dans les cellules  $\beta$  ou dans toute cellule qui l'exprime. C'est pourquoi cette troisième partie s'intéresse tout particulièrement à la sortiline, à sa structure, à ses propriétés pharmacologiques et ses fonctions biologiques.

## I/ La sortiline : structure, expression, maturation et trafic

### A. La structure de la sortiline



**Figure 23 : Structure de la sortiline.**

La sortiline est un récepteur de haute affinité ( $K_D \approx 0,3$  nM) pour la neurotensine, de 833 acides aminés (Mazella et al., 1989; Mazella et al., 1998). Elle a été identifiée pour la première fois en 1997, en tant que partenaire de la protéine RAP (receptor-associated protein) (Petersen et al., 1997). La sortiline appartient à la famille Vps10p des récepteurs de type I, avec les récepteurs SorLA et SorCS1-3 (Hermey et al., 1999; Jacobsen et al., 1996). En effet,



les membres de cette famille sont caractérisés par un seul domaine transmembranaire encadré d'un domaine extracellulaire riche en cystéines comparable à celui de la protéine vacuolaire de tri Vps10p de la levure et d'une courte extrémité intracellulaire impliquée dans son internalisation (Mazella et al., 1998; Petersen et al., 1997) (Figure 23). Une autre caractéristique de cette famille de récepteurs est l'existence d'un site de clivage par la protéine convertase furine à l'extrémité N-terminale du domaine Vps10p (Hermeijer et al., 1999; Hosaka et al., 1991; Mazella et al., 1998; Petersen et al., 1997) (Figure 23).

### ***B. Identification de la sortiline : trois approches pour une même protéine***

*(Première approche)* Lors de l'identification des partenaires de la RAP, une glycoprotéine endoplasmique de 100 kDa intervenant dans le trafic des récepteurs aux LDL (low density lipoprotein) a été mise en évidence (Petersen et al., 1997; Tauris et al., 1998). Elle est capable d'interagir avec l'extrémité C-terminale de la RAP (Gliemann et al., 1994; Petersen et al., 1997; Tauris et al., 1998; Williams et al., 1992). Cette glycoprotéine a été identifiée, purifiée et clonée grâce notamment à son homologie avec le domaine Vps10p de la levure : il s'agit de la **sortiline** (Petersen et al., 1997; Tauris et al., 1998).

*(Deuxième approche)* Les protéines présentes dans les vésicules contenant le transporteur de glucose Glut4 ont été identifiées chez le rat. Parmi elles, les auteurs ont identifié une glycoprotéine de 110 kDa ayant une forte identité avec la **sortiline** humaine (Lin et al., 1997). Pour la première fois, ils ont montré que la sortiline est un composant majeur des vésicules à Glut4 (Lin et al., 1997).

*(Troisième approche)* En utilisant un analogue de la neurotensine, photoréactif et radioactif, plusieurs récepteurs de la neurotensine ont été identifiés, dont une protéine de 100 kDa (Mazella et al., 1988). Cette protéine est capable de fixer la neurotensine avec une haute affinité et possède des propriétés pharmacologiques similaires aux récepteurs membranaires de la neurotensine NTSR1 et NTSR2, d'où son appellation NTSR3 (Mazella et al., 1988). NTSR3 a ensuite été purifié à partir de cerveau murin et humain et identifié dans les neurones où il est impliqué dans l'internalisation de la neurotensine : il sera par la suite appelé **sortiline** (Chabry et al., 1993; Mazella et al., 1989; Zsuzsger et al., 1994).

### *C. Distributions tissulaires et cellulaires de la sortiline*

La sortiline est très largement exprimée dans le système nerveux central, en particulier dans l'hippocampe, le gyrus denté et le cortex cérébral (Hermans-Borgmeyer et al., 1999). Elle est également présente dans la moelle épinière, le muscle squelettique, les testicules, le cœur, le placenta, le pancréas, la prostate et le petit intestin (Petersen et al., 1997).

Dans la cellule, la sortiline est très peu présente à la membrane plasmique (entre 5 et 10 % seulement), la majorité de la protéine se trouvant dans les compartiments intracellulaires (vésicules et réseau trans-golgien) (Morris et al., 1998).

### *D. La maturation de la sortiline*

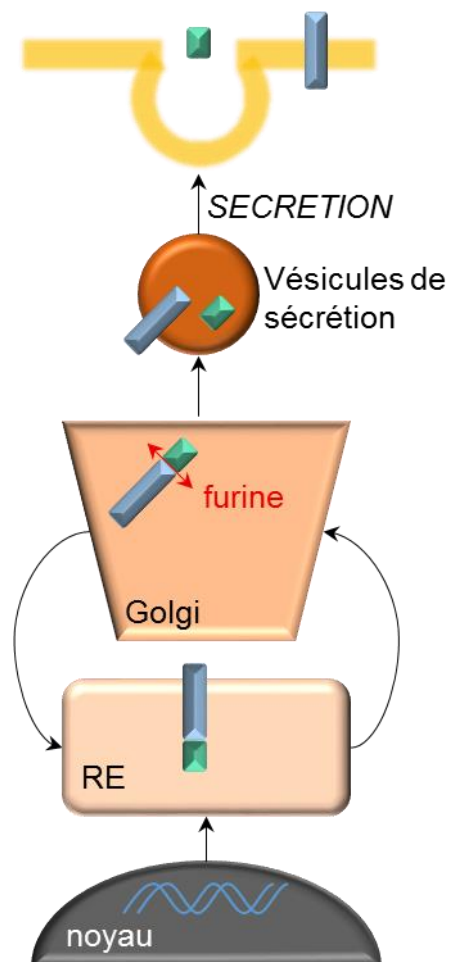


Figure 24 : La maturation de la sortiline.

Le domaine extracellulaire Vps10p de la sortiline est précédé de la séquence R<sup>41</sup>WRR<sup>44</sup> : c'est le site de clivage pour la protéine convertase furine (Petersen et al., 1997) (Figure 23). La sortiline est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la pro-sortiline, qui est converti en une forme mature par l'action de la furine dans le compartiment golgien précoce (Hermeijer et al., 1999; Mazella et al., 1998; Munck Petersen et al., 1999; Petersen et al., 1997) (Figure 24). Ce clivage conduit à la libération d'un produit de maturation de 44 acides aminés, le propeptide (PE) (Munck Petersen et al., 1999) (Figure 24). Aucune interaction ligand-sortiline n'est possible tant que la sortiline est sous forme immature (Munck Petersen et al., 1999). L'étape de maturation est donc un processus indispensable à l'acquisition de l'activité fonctionnelle de la sortiline (Munck Petersen et al., 1999).

## II/ Les fonctions cellulaires et physiopathologiques de la sortiline

### A. Les fonctions cellulaires de la sortiline

#### 1) Récepteur/corécepteur de plusieurs ligands

La sortiline est impliquée dans le **métabolisme des lipides**. Son premier partenaire identifié, la RAP, est une protéine chaperonne spécialisée dans le repliement et le trafic des récepteurs aux LDL (LDLR) (Li et al., 2002; Petersen et al., 1997). Située dans le RE et l'appareil de Golgi, la RAP prévient une interaction ligand-LDLR trop précoce (Herz et al., 1991). Cette localisation intracellulaire est permise grâce à son interaction avec la sortiline (Tauris et al., 1998). La sortiline est également associée à la LPL, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides (Nielsen et al., 1999). L'interaction de ces deux protéines à la surface cellulaire permet l'endocytose et la dégradation de la LPL (Nielsen et al., 1999).

La sortiline est l'un des **récepteurs de la neurotensine** (Mazella et al., 1988; Mazella et al., 1998). Malgré le fait qu'elle soit peu présente à la membrane plasmique, elle internalise efficacement son ligand, tout en maintenant son niveau d'expression membranaire constant (Navarro et al., 2001). En fonction de sa localisation cellulaire, la neurotensine interagit avec une forme plus ou moins glycosylée de la sortiline : une forme de haut poids moléculaire lors du processus d'endocytose et une forme de poids moléculaire plus faible lors du trafic dans le

compartiment golgien (Morinville et al., 2004). L'interaction entre la neurotensine et la sortiline stimule l'internalisation du complexe récepteur-ligand vers le réseau trans-golgien, et ce, dans plusieurs types cellulaires tels que les lignées COS-7 et HT29 (Morinville et al., 2004; Navarro et al., 2001). La sortiline peut former un hétérodimère avec NTSR1 ou NTSR2, la fixation de la neurotensine sur l'un de ces deux RCPG induisant l'activation d'une voie de signalisation spécifique (Beraud-Dufour et al., 2009; Martin et al., 2002). Le PE est également capable de se fixer sur la sortiline avec une affinité d'environ 5 nM, dont les conséquences biologiques seront détaillées dans la quatrième partie de cette introduction (Munck Petersen et al., 1999).

La sortiline est également impliquée dans la **survie et la différenciation des neurones**, en interagissant avec les neurotrophines (BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor)) et leurs précurseurs (pro-BDNF, pro-NGF) (Nykjaer et al., 2004; Teng et al., 2005).

Plus récemment, la sortiline joue un rôle dans la **réponse pro-inflammatoire**. En effet, elle est un récepteur de haute affinité pour deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-6 et l'INF- $\gamma$  (Mortensen et al., 2014). Son absence dans les cellules immunitaires est associée à une réduction de la sécrétion de ces deux cytokines, ce qui suggère l'implication de la sortiline dans le trafic de ces cytokines pro-inflammatoires (Mortensen et al., 2014; Yabe-Wada et al., 2016).

## 2) L'adressage des protéines vers le lysosome ou la membrane plasmique

### *$\alpha$ - Le lysosome, la voie de dégradation*

La sortiline présente des similarités structurales avec des récepteurs impliqués dans le tri et le transport intracellulaires de protéines. En effet, son extrémité cytoplasmique possède un domaine comparable au domaine Vps10p du récepteur de tri de la carboxypeptidase Y de la levure (Marcusson et al., 1994). La sortiline présente également des séquences impliquées dans l'interaction avec des protéines adaptatrices, l'endocytose, l'adressage baso-latéral et le trafic Golgi-endosomes (Nielsen et al., 2001). La sortiline est majoritairement présente dans les compartiments intracellulaires et co-localise avec le CI-MPR (cation-independent mannose

6-phosphate receptor), un récepteur impliqué dans le trafic des protéines vers le lysosome (Petersen et al., 1997).

De nombreuses études ont montré l'implication de la sortiline dans l'adressage des protéines vers la voie lysosomale, telles que les protéines SAP (sphingolipid activator protein), la sphingomyélinase acide, les cathépsines D et H et la LPL (Canuel et al., 2008; Lefrancois et al., 2002; Ni and Morales, 2006; Nielsen et al., 1999).

### *b- La membrane plasmique, l'adressage à la surface cellulaire*

Comme évoqué précédemment, la sortiline interagit avec le canal TREK-1 dans les neurones corticaux de souris et participe à son adressage vers la membrane plasmique (Mazella et al., 2010).

Dans les adipocytes, la sortiline est un composant majeur des IRV (Lin et al., 1997). Son expression est nécessaire et suffisante à la translocation de Glut4 à la membrane plasmique en réponse à l'insuline (Shi and Kandror, 2005). Cependant, bien qu'elles soient concomitantes, l'augmentation de l'expression membranaire de la sortiline est bien inférieure à celle de Glut4 (un facteur 1,7 pour la sortiline contre un facteur 14 pour Glut4) (Morris et al., 1998).

## *B. Les fonctions physiopathologiques de la sortiline*

### *1) Les maladies neurodégénératives*

**La maladie d'Alzheimer** est une pathologie neurodégénérative qui entraîne une perte progressive et irréversible des fonctions mentales, notamment de la mémoire. Elle est associée à un dépôt de plaques amyloïde- $\beta$ , peptide toxique pour le cerveau (Goedert, 1987). L'APOE (apolipoprotein E) est une protéine qui séquestre l'amyloïde- $\beta$  dans les cellules (Wisniewski et al., 1993). La sortiline a pour fonction l'internalisation et l'adressage de l'APOE vers le lysosome, ce qui conduit à sa dégradation et à la réduction de la quantité de plaques toxiques (Carlo et al., 2013). Il a également été mis en évidence un variant génétique de la sortiline associé à un risque de développer la maladie d'Alzheimer (Andersson et al., 2016). A

contrario, l'expression cérébrale de la sortiline est plus élevée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, grâce à l'effet stimulateur de l'amyloïde- $\beta$  (Saadipour et al., 2013).

**La maladie de Parkinson** est une maladie neurologique chronique qui se traduit par une destruction des neurones dopaminergiques de la substance noire, localisée à la base du cerveau, conduisant à des troubles moteurs. Associé à la sortiline, le récepteur p75<sup>NTR</sup> (p75 neurotrophin receptor) contrôle la mort neuronale (Nykjaer et al., 2004). La présence du complexe p75<sup>NTR</sup>/sortiline dans les neurones dopaminergiques suggère l'implication de la sortiline dans la destruction neuronale et le développement de la maladie de Parkinson (Chen et al., 2008). Récemment, il a été montré que l'expression neuronale de la sortiline permet de contrecarrer les mauvais repliements protéiques engendrés lors du développement de la maladie de Parkinson (Dhungel et al., 2015).

Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation positive entre l'expression de la sortiline et **la dépression** : chez des personnes dépressives, l'expression de la sortiline dans le sérum (forme soluble) et dans les lymphocytes (forme membranaire) est plus élevée que chez des individus sains (Buttenschon et al., 2015; Zhou et al., 2013). De plus, les traitements antidépresseurs contrecarrent cette augmentation (Belzeaux et al., 2010; Stelzhammer et al., 2013). Le rôle de la sortiline dans la dépression est complexe et associé aux neurotrophines : l'invalidation de la sortiline chez la souris (souris NTSR3<sup>-/-</sup>) engendre un phénotype anxieux, l'injection des précurseurs des neurotrophines provoquant un phénotype dépressif (Ruan et al., 2016).

## 2) Les maladies métaboliques

Plusieurs études d'association génétique pangénomique ont établi un lien entre le gène *SORT1*, codant la sortiline, les niveaux plasmatiques de cholestérol et le risque d'infarctus du myocarde chez l'Homme (Kathiresan et al., 2008; Muendlein et al., 2009; Musunuru et al., 2010; Willer et al., 2008). La sortiline participe donc au **métabolisme lipidique** mais son rôle exact n'est pas encore défini. En effet, une première étude de 2010 a montré que l'invalidation de la sortiline spécifiquement dans le foie est associée à une augmentation du niveau circulant de cholestérol (Musunuru et al., 2010). Les auteurs ont donc suggéré un rôle protecteur de la sortiline contre l'hypercholestérolémie, facteur de risque des maladies cardiovasculaires (Musunuru et al., 2010). Cependant, deux études ont, par la suite,

montré une diminution de cholestérol plasmatique chez les souris NTSR3<sup>-/-</sup> (Kjolby et al., 2010; Strong et al., 2012).

La sortiline est également impliquée dans les **maladies cardiovasculaires**, en stimulant l'athérosclérose. Il s'agit d'une perte d'élasticité des artères provoquée par l'accumulation de corps gras dans leurs parois. Les souris NTSR3<sup>-/-</sup> présentent une atténuation de ce phénotype (Mortensen et al., 2014; Patel et al., 2015). Deux fonctions de la sortiline peuvent en être à l'origine : le contrôle de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et/ou la potentialisation de l'entrée de LDL dans les macrophages (Mortensen et al., 2014; Patel et al., 2015).

Enfin, la sortiline intervient dans le contrôle de **l'homéostasie glucidique** et le développement de l'obésité puisque sa présence est nécessaire et suffisante à la biogenèse des IRV et à l'acquisition de la sensibilité à l'insuline des adipocytes et des cellules musculaires squelettiques (Ariga et al., 2008; Huang et al., 2013; Shi and Kandror, 2005, 2007). Par ailleurs, la sortiline semble jouer un rôle dans la prise de poids. En effet, les souris NTSR3<sup>-/-</sup> disponibles au laboratoire présentent une répartition des masses grasses différentes des souris sauvages (données personnelles). De plus, elles sont protégées d'un phénotype obèse induit par un régime hyper-lipidique et contre la stéatose hépatique (Rabinowich et al., 2015). Enfin, plusieurs études mettent en évidence une diminution de l'expression de la sortiline dans les tissus insulino-sensibles de patients et de souris obèses et diabétiques (Kaddai et al., 2009; Li et al., 2015; Tsuchiya et al., 2010). **L'un des objectifs de ce mémoire est donc de caractériser l'implication de la sortiline dans le développement du diabète et de l'obésité associé à un phénotype inflammatoire.**

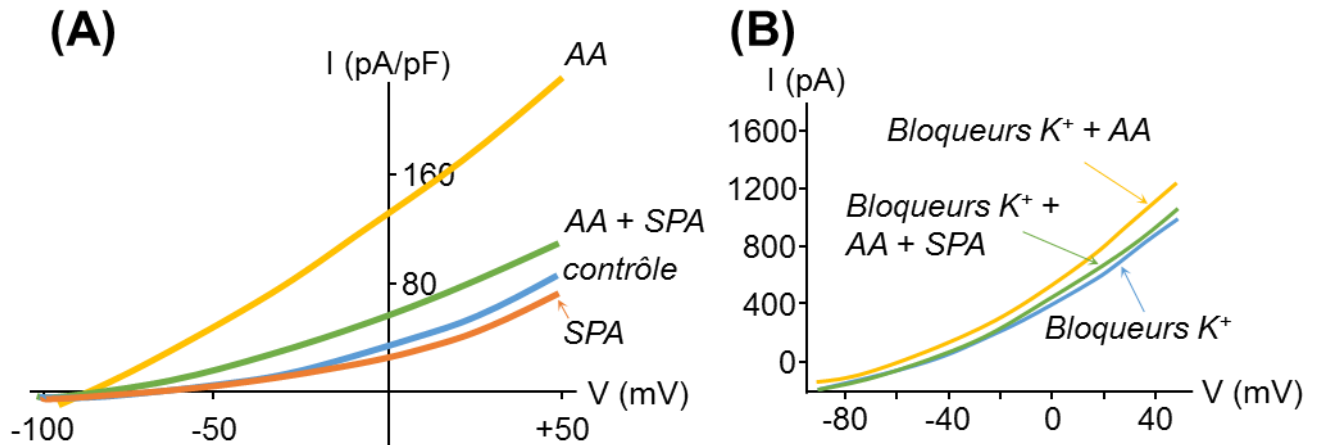






## II/ Les fonctions physiologiques de la spadine

### A. La spadine, un inhibiteur des courants TREK-1



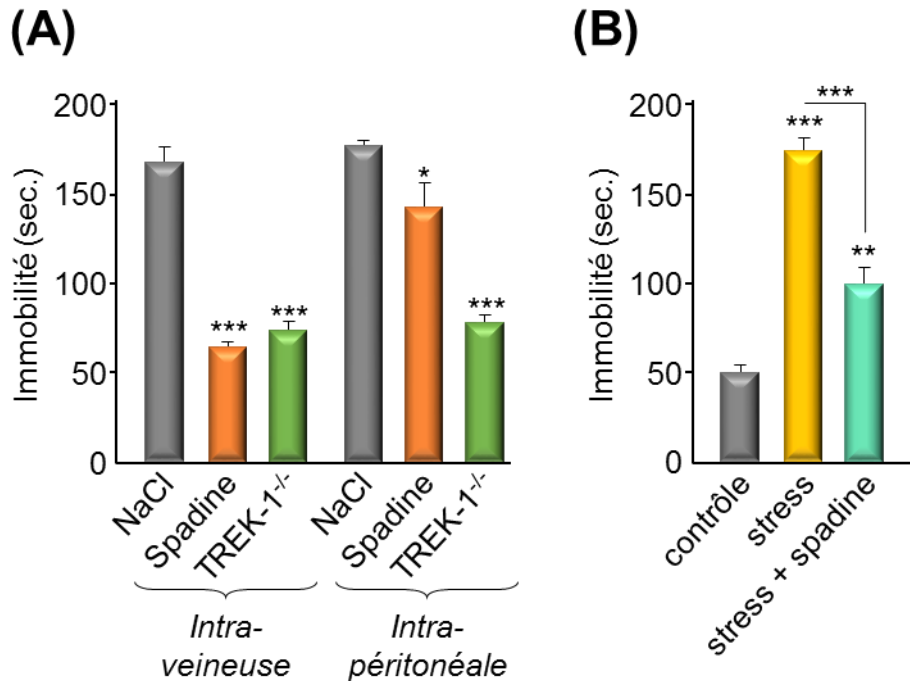
**Figure 28 : La spadine inhibe les courants TREK-1 induit par l'acide arachidonique (AA) (d'après (Mazella et al., 2010)).**

(A) Les cellules COS-7 ont été transfectées avec le canal TREK-1. Les courants sur cellules entières ont été mesurées en présence de bloqueurs des canaux  $K^+$ . Les cellules ont été maintenues à  $-80\text{mV}$  puis soumises à une gamme de voltage allant de  $-100$  à  $+50\text{mV}$ , en présence d'acide arachidonique (AA,  $10\mu\text{M}$ ) et/ou de spadine ( $100\text{nM}$ ). (B) Les courants natifs des neurones pyramidaux de la zone CA3 ont été mesurés sur des tranches d'hippocampes de souris sauvages en présence de bloqueurs des canaux  $K^+$ , supplémentés en AA ( $10\mu\text{M}$ ) et/ou spadine ( $1\mu\text{M}$ ).

La spadine, comme le PE, se fixe sur le canal TREK-1 avec une affinité d'environ  $10\text{ nM}$  (Mazella et al., 2010). Cette interaction engendre une réduction spécifique des courants TREK-1 induits par l'AA (Mazella et al., 2010) (Figure 28). Les courants produits par l'hétérodimère TREK-1/TREK-2 sont également inhibés par la spadine, les autres canaux  $K^+$  étant insensibles à la spadine (Lengyel et al., 2016; Moha Ou Maati et al., 2012).

### B. L'effet antidépresseur de la spadine

Le test de la nage forcée (FST, forced swimming test) est largement utilisé chez les rongeurs afin de quantifier l'efficacité de molécules antidépressives. Il s'agit de mesurer le comportement de résignation, une composante de l'état dépressif, d'un individu placé dans l'eau, sans possibilité d'en sortir.



**Figure 29 : Effet de la spadine sur la résignation des rongeurs.**

(A) Quantification du temps d'immobilité des souris TREK-1<sup>-/-</sup> et des souris sauvages traitées avec la spadine (contrôle = NaCl), lors du test de la nage forcée (FST, forced swimming test) (d'après (Mazella et al., 2010)). (B) Quantification du temps d'immobilité des rats soumis à un stress moyen chronique et traités ou non avec la spadine, lors du test de la nage forcée (FST) (d'après (Ye et al., 2015)).

Des souris sauvages injectées avec la spadine pendant quatre jours consécutifs présentent le même comportement de résignation que les souris TREK-1<sup>-/-</sup>, elles sont résistantes à la dépression (Mazella et al., 2010) (Figure 29A). Des résultats similaires ont été observés chez des rats soumis à un stress moyen chronique : l'injection de spadine induit une réponse antidépressive en diminuant l'état de résignation des rats stressés (Ye et al., 2015) (Figure 29B).

Cet effet antidépresseur de la spadine passe par l'inhibition du canal TREK-1 et provoque des modifications au niveau du cerveau. En effet, chez la souris, la spadine stimule la neurogenèse et la phosphorylation hippocampique de CREB (cAMP response element binding protein), deux marqueurs d'un traitement aux ISRS (Mazella et al., 2010). Plus précisément, la spadine augmente l'expression du BDNF dans le cortex préfrontal et l'hippocampe, caractéristique d'un traitement antidépresseur (Devader et al., 2015). Au niveau de l'hippocampe, la spadine stimule également l'expression de PSD-95 (postsynaptic

density protein-95) et de la synapsine, deux marqueurs synaptiques (Devader et al., 2015). Par ailleurs, la spadine ne présente pas d'effet secondaire indésirable : elle n'affecte pas le rôle de TREK-1 dans la perception de la douleur, l'épilepsie ou l'ischémie, ne provoque pas de problème cardiaque (pression systolique ou rythme cardiaque modifiés), et ne modifie pas la prise alimentaire et la glycémie des souris à jeun (Moha Ou Maati et al., 2012). Son action étant plus rapide et plus efficace que la fluoxétine (Prozac<sup>®</sup>), l'ensemble de ces résultats font de la spadine une nouvelle molécule d'intérêt pour traiter la dépression. Grâce à ses propriétés inhibitrices des canaux TREK-1 présents dans les cellules  $\beta$  et son interaction avec la sortiline, la spadine présente un nouvel intérêt pour l'équipe. **L'un des objectifs de ce mémoire est donc d'identifier le rôle de la spadine sur l'homéostasie glucidique, en particulier sur les cellules  $\beta$  et insulino-sensibles.**

# Objectifs

---

En 2012, mon équipe d'accueil, dirigée par le Dr. Jean Mazella, a publié une hypothèse selon laquelle le PE interviendrait dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Figure 30) : sous l'effet du glucose, l'insuline libérée par les cellules  $\beta$  du pancréas stimule la translocation de Glut4 à la membrane plasmique des cellules insulino-sensibles, ce qui provoquerait la libération du PE dans la circulation périphérique. Ce PE pourrait alors agir de façon autocrine sur les cellules insulino-sensibles et moduler l'entrée de glucose et/ou de façon paracrine sur les cellules  $\beta$  et moduler la libération d'insuline.

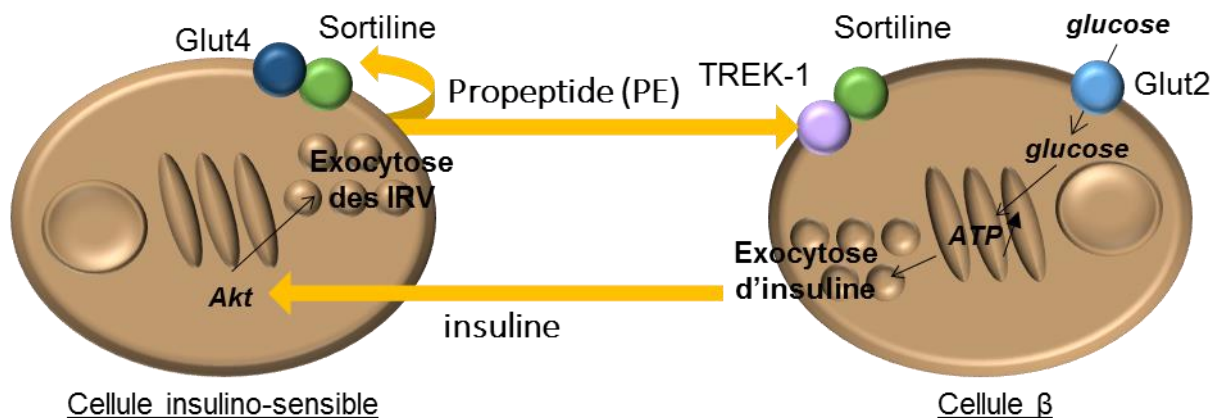


Figure 30 : Rôle hypothétique du PE dans l'homéostasie glucidique (d'après (Mazella et al., 2012))

Selon cette hypothèse, mon sujet de thèse est basé sur l'étude des effets de la spadine (en tant qu'analogue du PE) sur le contrôle de l'homéostasie glucidique et comporte deux parties :

1. Déterminer les effets de la spadine sur la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Article 1)
  - a. Caractériser l'expression du canal TREK-1 *in vivo* et *in vitro*
  - b. *In vitro*, sur la lignée  $\beta$  pancréatique Min6, étudier les effets de la spadine sur :
    - Le potentiel de membrane
    - Les variations de calcium intracellulaire
    - La libération d'insuline

- c. *In vivo*, étudier les effets de la spadine sur le contrôle de la glycémie et de l'insulinémie
- 2. Identifier les mécanismes de production et de libération du PE et étudier les effets de la spadine sur la lignée adipocytaire 3T3-L1 (Article 2)
  - a. Mesurer la production de PE par les adipocytes 3T3-L1
    - Lors du processus de différenciation
    - En conditions d'insulino-résistances (TNF $\alpha$ , dexaméthasone)
  - b. Identifier les sécrétagogues du PE
  - c. Etudier l'effet de la spadine sur :
    - L'entrée de glucose induite ou non par l'insuline
    - L'activation des voies de signalisation (Akt, AMPK et ERK)

# Résultats

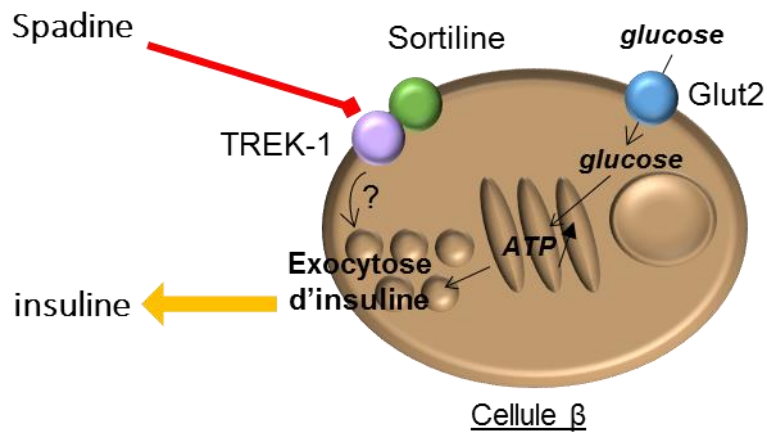
---

## Partie 1 : Etude des effets de la spadine sur la sécrétion d'insuline

### Introduction

Seulement deux canaux K2P ont été étudiés pour leur implication dans la sécrétion d'insuline. Le **canal TALK-1** est le canal K2P le plus exprimé de la cellule  $\beta$  chez la souris et l'Homme, et est associé au risque de développer un diabète de type 2 (Vierra et al., 2015). Les souris TALK-1<sup>-/-</sup> présentent une sécrétion d'insuline en réponse au glucose plus élevée que celle de souris sauvages, et ont une meilleure tolérance à un régime enrichi en gras (Vierra et al., 2015). Chez l'Homme et la souris, l'inhibition des **courants TASK-1** localisés dans les îlots de Langerhans isolés provoque une dépolarisation membranaire ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique (Dadi et al., 2014). Chez la souris, l'inactivation des canaux TASK-1 spécifiquement dans les cellules  $\beta$  conduit à une augmentation de l'influx calcique et de la sécrétion d'insuline induits par le glucose, ainsi à qu'une meilleure tolérance au glucose (Dadi et al., 2014).

Une seule étude, réalisée par l'équipe, met en évidence la présence de courants TREK-1 dans la lignée  $\beta$  pancréatique  $\beta$ -TC3, grâce à l'outil découvert par le laboratoire, la spadine (Mazella et al., 2010). En effet, les courants TREK-1 activés par l'AA sont inhibés par la spadine (Mazella et al., 2010). L'équipe a également montré la présence de la sortiline, l'un des partenaires des canaux TREK-1, dans les îlots de Langerhans murins et deux lignées de cellules  $\beta$ , les cellules  $\beta$ -TC3 et Ins-1E (Beraud-Dufour et al., 2009; Coppola et al., 2008; Mazella et al., 2010). Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à l'implication des canaux TREK-1 dans la physiologie des cellules  $\beta$  du pancréas et aux effets de la spadine sur la sécrétion de l'insuline.



**Figure 31 : La spadine pourrait moduler la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  grâce à un effet sur le canal TREK-1.**

En reprenant l'hypothèse postulée par l'équipe en 2012 (Figure 31), l'objectif de ce premier travail est d'abord de **caractériser l'expression du canal TREK-1 dans les cellules  $\beta$  du pancréas et dans la lignée  $\beta$  pancréatique Min6**. Par la suite, il convient d'**étudier le rôle du canal TREK-1 dans la sécrétion d'insuline**. La spadine a été utilisée comme inhibiteur des courants TREK-1 activés par l'AA. Les conséquences d'un tel traitement sur le potentiel de membrane, les flux calciques et la sécrétion d'insuline induite par le KCl ont été analysées.



## Résultats

### Potential of calcium influx and insulin secretion in pancreatic beta cell by the specific TREK-1 blocker Spadin

---

Hivelin Céline<sup>1,2\*</sup>, Béraud-Dufour Sophie<sup>1,2\*</sup>, Devader Christelle<sup>1,2</sup>, Abderrahmani Amar<sup>3</sup>, Moreno Sébastien<sup>1,2\*</sup>, Moha ou Maati Hamid<sup>4</sup>, Djillani Alaeddine<sup>1,2</sup>, Heurteaux Catherine<sup>1,2</sup>, Borsotto Marc<sup>1,2</sup>, Mazella Jean<sup>1,2</sup> and Coppola Thierry<sup>1,2#</sup>.

<sup>1</sup>: CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, 660 route des Lucioles, F-06560 Valbonne, France.

<sup>2</sup>: Université de Nice Sophia Antipolis, F-06560 France.

<sup>3</sup>: Université Lille 2, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR 8199, EGID, F-59000 Lille, France.

<sup>4</sup>: Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), Département de Physiologie, CNRS/INSERM UMR 5203, Université de Montpellier, Montpellier France

\*: These two authors contributed equally to the work

#: To whom correspondence should be addressed: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR 7275, Université de Nice Sophia Antipolis, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. Tel.: +33 4 93957765; Fax: +33 4 93957708. E-mail: coppola@ipmc.cnrs.fr.

## Abstract

Inhibition of the potassium channel TREK-1 by spadin is currently thought as a promising therapeutic target for the treatment of human depression. Since these channels are expressed in pancreatic beta cells, we investigated their role in the control of insulin secretion and glucose homeostasis. In this study, we confirmed the presence of TREK-1 channels in the insulin-secreting MIN6-B1 beta cell line and in mouse islets. We found that spadin inhibited arachidonic acid-activated TREK-1 currents and potentiated insulin secretion induced by depolarizing chloride potassium. This potentiating effect was associated with some changes in the cell membrane potential. Indeed, inhibition of TREK-1 channels by spadin shifted the resting potential towards more depolarizing potential ( $\Delta V_m \approx 13\text{mV}$ ) and increased the intracellular calcium concentration. In mice, spadin improved glucose tolerance, likely by increasing the plasma insulin level induced by glucose, which is consistent with its secretagogue effect on insulin secretion observed *in vitro*. This work identifies spadin as a novel player for the control of insulin secretion and glucose homeostasis.

*Keywords:* TREK-1 channels, insulin secretion, spadin.

## Introduction

Insulin secretion induced by pancreatic beta cells is critical for glucose homeostasis. Currently, the insulin secretagogue, glibenclamide (glib), and the glucagon like-peptide 1 (GLP1) mimetic, exendin4 (ex4), two treatments for diabetes, are efficient but have a lot of side effects (hypoglycaemia, digestive troubles, etc...) [1, 2]. For these reasons, development of new therapeutic strategies improving the beta cell function may be a key factor in the treatment of diabetes. Glucose-induced insulin secretion relies on potassium ( $K^+$ ) current-dependent plasma membrane depolarization [3, 4]. Indeed, high glucose concentration causes the closure of ATP-sensitive  $K^+$  channels, preventing  $K^+$  efflux and then, the depolarization of beta cells [5-7]. As a consequence, the voltage-dependent calcium channels open, allowing calcium influx involved in the exocytosis of insulin-containing granules [8].

Cell membrane depolarization is also regulated by other  $K^+$  channels that are the mechano- and temperature-sensitive, including two pore domain (K2P) channels, such as TREK-1, TREK-2 and TRAAK [9-11]. TREK-1, the first mechano-activated  $K^+$  channel to be

identified [12], is activated by polyunsaturated fatty acids and volatile anesthetics [10, 11]. TREK-1 is efficiently inhibited by intracellular increase of cAMP level and protein kinase A (PKA) activation, that leads to the phosphorylation of the serine 333 in the cytoplasmic terminal region of the channel [13, 14]. This inhibitory effect is also observed after agonist stimulation of the  $\beta$ -adrenergic receptors, known to increase intracellular cAMP concentration [15]. Incretin hormones, like gastric inhibitory polypeptide (GIP), GLP1 and ex4, activate PKA by increasing the intracellular cAMP level, which can lead to the phosphorylation of key proteins and the potentiation of glucose-induced insulin exocytosis [16, 17].

Recently, we identified a peptide named spadin (SPA), which is a partial sequence of the propeptide released from the maturation of sortilin, as a new class of highly effective and fast acting antidepressant (AD). Sortilin is a class 1 receptor involved in the sorting of several membrane proteins, including TREK-1 channels [18]. The AD action of SPA is triggered through the inhibition of the TREK-1 channel activity. We previously observed that TREK-1 was expressed in the pancreatic beta cell line  $\beta$ -TC3 [18]. The aim of this work was to study the role of TREK-1 channels and its selective blocker SPA in the regulation of insulin secretion.

## Materials and Methods

### Animals for *in vivo* experiments

All experiments were performed according to policies on the care and use of laboratory animals of European Community Legislation. The local Ethics Committee approved the experiments (protocol number 00893.02). For at least one week before experiment, C57Bl/6J male mice (8 to 10 weeks old, 24-28g) were bred under standard conditions, on a 12 h light-dark cycle, a temperature of  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  and a humidity of 60-70%, and with food and water available *ad libitum*.

### Cell culture

Mouse insulin-secreting MIN6-B1 cells (passages 35-45) were cultured at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ , in DMEM containing 15% foetal calf serum (FCS), 1mM sodium pyruvate, 2mM glutamate, 50mM 2-mercaptoethanol, 100units/mL penicillin, and 100mg/mL streptomycin. For Fura-2AM experiments, cells were plated at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/mL, onto 25-mm poly-D-Lysine-coated glass coverslips. For the

electrophysiological experiments MIN6-B1 cells were plated at a density of 20,000 cells/35-mm dishes. Cell membrane potentials were recorded on MIN6-B1 cells after 2-6 days of culture.

### **Electrophysiological experiments**

MIN6-B1 cells were incubated 45min with a solution of K<sup>+</sup> blockers (10mM tetraethyl ammonium, 3mM 4-aminopyridine, 50nM charybdotoxin, 100nM apamin and 10mM glibenclamide).

I-V curves and membrane potentials of MIN6-B1 cells were recorded 45min after incubation in basal conditions (control), in the presence of arachidonic acid (AA, 10mM) and/or SPA (10<sup>-6</sup>M), or in the presence of glib (10<sup>-6</sup>M). Membrane potentials of MIN6-B1 cells were recorded 45min in the presence of 2mM glucose (alone) or 20mM glucose supplemented with SPA (10<sup>-7</sup>M) or ex4 (10<sup>-7</sup>M).

After the incubation periods (2\*45min), cells were patched and membrane potentials were immediately measured using the whole cell patch clamp technique [19]. Each membrane potential was evaluated using a RK 400 patch clamp amplifier (Axon Instrument, USA), low-pass filtered at 3 kHz and digitized at 10 kHz using a 12-bit analog-to-digital converter digidata (1322 series, Axon Instrument, USA). Patch clamp pipettes were pulled using vertical puller (PC-10, Narishige) from borosilicate glass capillaries and had a resistance of 3-5 MΩ. The bath solution contained 150mM NaCl, 5mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub> and 10mM HEPES/NaOH, pH 7.4. The pipette solution contained 155mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA and 10mM HEPES/KOH, pH 7.2. All experiments were performed at room temperature. Data acquisition was carried out using the commercial software and hardware pClamp 8.2. Values of membrane potentials are expressed in mV, as mean ± standard error of the mean (SEM).

### **Measurement of cytosolic calcium**

The cytosolic calcium was measured using the Fura-2AM loading protocol, as previously described [20]. Loaded cells were visualized under an inverted epi-fluorescence microscope (AxioObserver, Carl Zeiss, France) using a Fluor 40x/1.3 oil immersion objective. The intracellular Fura-2AM was sequentially excited at 340 and 380nm with a Xenon lamp through a high-speed multi-filter wheel. For each excitation wavelength, the fluorescence emission was discriminated by a same 400 LP dichroic mirror and a 510/40 bandpass filter. Fluorescence images were acquired every 10sec on an EMCCD camera (Cascade 512, Roper Scientific, Evry, France). Calcium images analysis were made using MetaMorph and Metafluor

software (Universal Imaging). Fura-2AM fluorescence intensities were expressed as changes relative to the initial fluorescence ratio (F340/380).

### **Islets preparation**

Mouse islets were isolated by hand-picking after collagenase digestion of pancreas, as previously described [21], and were maintained overnight in DMEM containing 10% FCS, 10mM HEPES pH 7.4, 1mM sodium pyruvate, 100units/mL penicillin, and 100mg/mL streptomycin, 50 $\mu$ M 2-mercaptoethanol and 11mM glucose.

### **Measurement of insulin secretion and cellular content**

For insulin secretion and cellular concentrations, MIN6-B1 cells ( $5 \times 10^5$  cells per well) or isolated pancreatic islets (20 islets per well) were incubated 45min in the absence or in the presence of SPA ( $10^{-7}$ M) at 37°C in control conditions (2.8mM glucose and 5mM KCl) or in stimulating conditions (30mM KCl). The level of insulin was measured using an ELISA-kit (Merckodia), as already described [22].

### **Immunocytochemistry**

MIN6-B1 cells were plated on poly-D-Lysine-coated glass coverslips. Cells were pre-incubated for 10min in Phosphate-Buffered Saline (PBS) and then fixed for 20min with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature. Coverslips were rinsed twice with PBS and incubated with 50mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 10min, to quench excess of free aldehyde groups. After incubation for 20min in PBS containing 3% horse serum (HS) and 0.1% Triton X100, cells were incubated with a rabbit polyclonal anti-TREK-1 (1/200, Millipore) or a mouse monoclonal anti-chromogranin (1/400, Santacruz) for 2h at room temperature in PBS containing 0.5% HS and 0.1% Triton-X100. Cells were rinsed three times in PBS and incubated for 45min at room temperature with a Texas-Red-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1/400, Invitrogen) or a FITC-conjugated donkey anti-mouse antibody (1/400, Invitrogen) in PBS containing 0.5% HS and 0.1% Triton-X100. After two washes with PBS and one with water, coverslips were mounted on glass slides with mowiol for confocal microscopy imaging. Immunofluorescence of confocal images was analysed using ImageJ 1.4.3.67 software (W.S. Rasband, National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### **Intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTTs)**

Mice were fasted overnight (16h) before the IPGTT, with water available *ad libitum*. Twenty minutes before the beginning of the IPGTT, 100 $\mu$ L of NaCl (0.9%) or SPA (10<sup>-5</sup>M) were *i.v.* injected. Glucose injection (1g/kg glucose) was performed into the peritoneal cavity of 6 to 8 mice for each experimental group. Blood samples (100 $\mu$ l) were collected from the tail vein, before SPA or NaCl injections (basal glycaemia), and at 10, 20, 30, 60, 90 and 120min after glucose injection. Insulin levels were measured using an ELISA-kit, as previously described [22].

### **Statistical Analysis**

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical significance was evaluated with Student t-test, performed using GraphPad Prism software.

## **Results**

### **SPA modulates insulin secretion by MIN6-B1 cells**

Previous studies indicate the presence of sortilin in mouse islets and in  $\beta$ -TC3 cells. Interestingly, TREK-1 channels are also expressed in  $\beta$ -TC3 cells [18, 23]. First, we investigated whether TREK-1 channel is also expressed in our models (mouse islets and MIN6-B1 cells), using immunocytochemical and immunohistological approaches. As shown in Figure 1, TREK-1 is indeed expressed in mouse islets (Fig. 1A), visualized by insulin immunoreactivity staining, and in the insulin-producing MIN6-B1 cells (Fig. 1B), mostly at the plasma membrane (arrows).

The expression of both TREK-1 channels and sortilin in beta cells and in mouse islets prompted us to investigate the role of the propeptide-related peptide SPA on insulin secretion. Under basal conditions (5mM KCl and 2.8mM glucose), SPA (10<sup>-7</sup>M, 45min) did not modify the level of secreted insulin neither in isolated mouse islets nor in MIN6-B1 cells (Fig. 2). In contrast, SPA potentiated KCl-induced insulin secretion, both in mouse islets (from 19.2  $\pm$  0.72 $\mu$ g/L to 27.47  $\pm$  0.35 $\mu$ g/L,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2A) and in MIN6-B1 cells (from 297.5  $\pm$  2.92 $\mu$ g/L to 427.7  $\pm$  20.58 $\mu$ g/L,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2B).

### **SPA controls the resting membrane potential of MIN6-B1 cells.**

The resting membrane potential of neuronal cells is known to be maintained by TREK-1 channels, on which SPA exerted a potent effect [24]. Therefore, we postulated that these channels could act as modulators of beta cell excitability. To answer this question, we studied the effects of SPA on K<sup>+</sup> currents recorded in MIN6-B1 cells using the whole cell patch clamp technique. As shown in Fig. 3A, TREK-1 channel activity in MIN6-B1 cells was stimulated by AA (10 $\mu$ M) and SPA (10<sup>-6</sup>M) inhibited AA-activated TREK-1 currents. The effect of SPA is summarized in Fig. 3B. A difference of membrane potential is observed between SPA-treated cells and control cells. Thus, the membrane potential is shifted towards more depolarized potential in SPA-treated cells ( $\Delta V_m = 12.6 \pm 2.02\text{mV}$ ,  $n=15$ ,  $p<0.001$ ). As a control, we observed that the K<sub>ATP</sub> channel blocker, glib, has a similar effect on the membrane potential than SPA ( $p<0.001$ ) (Fig. 3B).

We have also tested the effect of high glucose concentration on membrane potential. MIN6-B1 cells treated with 2mM glucose have a membrane potential of  $-60.00 \pm 1.0\text{mV}$ . We observed a strong and robust depolarization when MIN6-B1 cells were incubated in presence of 20mM glucose ( $V_{m(G20)} = -48.71 \pm 2.38\text{mV}$ ) (Fig. 3C). Interestingly, SPA effects were additive to those observed with 20mM glucose ( $V_{m(G20+SPA)} = -32.00 \pm 1.83\text{mV}$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 3C left). A similar additive effect was observed with the GLP1 receptor agonist ex4 (10<sup>-7</sup>M) in the presence of 20mM ( $V_{m(G20+ex4)} = -37.60 \pm 2.50\text{mV}$ ,  $p<0.05$ ).

### **Effect of SPA on intracellular calcium concentration**

As previously described in INS-1E beta cells [20], SPA (10<sup>-7</sup>M) induced a calcium influx in MIN6-B1 cells (Fig. 4A), which did not return to the basal level ( $0.46 \pm 0.01$ ) after washing it out ( $0.69 \pm 0.032$ , after SPA treatment). Since SPA has an effect on insulin release, this compound might act as an incretin hormone, known to activate the PKA signalling pathway. To test this, we compared the effects of ex4 with those of SPA (Fig. 4B-4C). SPA, as well as ex4, induced an increase of calcium influx (Fig. 4B). Interestingly, the rise of calcium concentration was similar when SPA was incubated in the presence or in the absence of ex4 (Fig. 4C). In order to determine a role of the intracellular cAMP concentration on the amplitude of SPA action, we tested the effect of various concentrations of the cAMP long-acting analogue, 8-Br-cAMP. At low concentration (5mM), this analogue slightly increased calcium influx, which was enhanced by SPA (10<sup>-7</sup>M) (Fig. 4D); whereas, a higher concentration of this latter (50mM) induced a strong and rapid increase of cytosolic calcium, which was insensitive to SPA

(Fig. 4E). These results are agreement with an activation of PKA signalling pathway induced by SPA.

To confirm this, we tested the effect of H89, a PKA activity inhibitor, on SPA- and ex4-increased calcium influx. As expected, ex4-increased calcium influx was inhibited by H89 inhibitor; whereas SPA-increased calcium was insensitive to it (Fig. 4F). This shows that SPA-induced calcium influx is independent of the PKA signalling pathway.

### **Administration of SPA improves glucose tolerance in mice.**

To define the role of SPA on regulation of glycaemia, we made an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) on mice injected with SPA ( $10^{-5}$ M) or with a saline (0.9% NaCl) solution. In saline-injected mice, we observed a classical glycaemic response (Fig. 5A, black dots). The blood glucose concentration increased in the first 30min, with a maximum of  $404.1 \pm 16.32$ mg/dL (n=9), and returned to the basal level after 120min (Fig. 5A, black dots). In SPA-injected mice, the glucose response has a similar profile to saline-injected mice (Fig 5A, black squares). However, the maximal blood glucose concentration at 30min ( $332.6 \pm 31.26$ mg/dL, n=7) is almost 10 times smaller than that of saline-injected mice ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5A, black squares). Moreover, the glycaemia of SPA-injected mice ( $229,3 \pm 20,55$ mg/dL) remained statistically lower than saline-injected mice at 60min ( $314,8 \pm 26,04$ mg/dL) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5A). Finally, the area under the curve (AUC) is decreased approximately by 28% in the SPA condition, compared to saline (Sal) condition (Fig. 5B,  $p < 0.05$ ). This data suggests that SPA may improve glucose tolerance, which may be due to an increase of insulin release in the blood.

To test this hypothesis, we measured both blood glucose and insulin levels in SPA- and saline-injected mice, at time 0 (t0) and 20min after glucose injection (t20) (Fig. 5C-5D). We confirmed that SPA significantly decreased glycaemia at t20 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5C). We also showed that SPA increased glucose-induced insulin secretion in serum, but not significantly (from  $0.21 \pm 0.037$ µg/L to  $0.37 \pm 0.15$ µg/L) ( $p = 0.32$ ) (Fig.5D).

## **Discussion**

The absence of available efficient and harmless treatments for diabetes leads pharmaceutical companies to develop new and safer drugs [25]. Initially, SPA, a TREK-1 channel blocker, was developed to treat mood disorders. One major advantage of SPA is its absence of toxicity and long-lasting central side effects [26, 27]. Since SPA prevents the



inhibiting TREK-1 channel effect in pancreatic  $\beta$ -TC3 cells [18], we hypothesize that this compound may regulate insulin secretion, and could be a good candidate in the treatment of diabetes. For these reasons, we investigated the role of SPA in the glucose homeostasis to confirm that this compound does not display any undesirable peripheral action [26]. In this work, we show that SPA play a role in the regulation of glucose homeostasis.

In some instance, pancreatic islets can be compared to neurons. Indeed, beta cells secrete insulin after stimulation-induced membrane depolarization. This secretion process is controlled by the ATP-sensitive  $K^+$  channels, which are targets for the treatment of type 2 diabetes. The background two-pore  $K^+$  channel, TREK-1, could also be a key target for regulation of the membrane potential. Indeed, in neurons, TREK-1 channels control the signalling of 5-HT and GABA, and SPA, as a new TREK-1 channel blocker, improves brain functions [24, 28]. Here, we show that TREK-1 channels are expressed in endocrine pancreas (Fig. 1), and SPA potentiates KCl-stimulated insulin secretion both in mouse islets and in MIN6-B1 cells (Fig. 2). Using the MIN6-B1 beta cell line, we observed that SPA induces a membrane depolarization, similar to glib and ex4 (Fig. 3). We also showed that SPA increases intracellular calcium concentration (Fig. 4), which might facilitate insulin secretion. Since SPA increases KCl-induced insulin secretion, we hypothesized that this peptide could act as an incretin hormone, by increasing the intracellular cAMP concentration or by inhibiting TREK-1 channel activity. We observed that SPA effects are not additive to those of ex4, which suggests that both peptides act through the same signalling pathway. However, ex4-induced calcium influx is inhibited by the PKA activity inhibitor H89; whereas SPA-induced calcium influx is not. These results indicate that SPA action is not mediated by PKA, and is likely due to the inhibition of TREK-1 channel activity.

Finally, we observed that SPA improves glucose tolerance, since the blood glucose level in SPA-injected mice is always lower than in saline-injected mice. Moreover, SPA increases glucose-induced insulin secretion, but not significantly. This last result might be due to a more complex physiological regulation, involving an integrated system, and/or a more rapidly SPA degradation.

In conclusion, this work shows for the first time a potential role of TREK-1 channels in beta cell function. SPA-inhibited TREK-1 currents could improve beta cell function *in vivo* and therefore could be a promising therapeutic strategy for improving insulin secretion in diabetes.

## Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, a grant from the Société Francophone du Diabète (SFD 2011) to T.C and a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-SAMA-0002) to JM. Amar Abderrahmani is supported by “European Genomic Institute for Diabetes” (E.G.I.D., ANR-10-LABX-46), European Commission, the Regional Council Nord Pas de Calais and the European Regional Development Fund.

## Figure legends

### **Figure 1: TREK-1 channels are present in insulin-expressing cells**

(A) Immunohistochemistry of isolated mouse pancreatic islets, labelling with antibodies anti-TREK-1 channels (1/400) and anti-insulin (1/1000), as described in Materials and Methods. (B) Immunocytochemistry of MIN6-B1 cells, labelling with primary antibodies anti-chromogranin A (for secretory granules labelling) and anti-TREK-1 channels, as described in Materials and Methods, and DAPI for nucleus labelling. Merged image is shown on the right panel. Arrows indicated the plasma membrane labelling obtained with the TREK-1 antibody.

### **Figure 2: SPA effects on insulin secretion in isolated mouse islets and MIN6-B1 cells.**

(A) Isolated mouse islets were incubated at low (5mM) or high (30mM) KCl concentrations, in the presence (+) or in the absence (-) of SPA ( $10^{-7}$ M) for 45min. (B) MIN6-B1 cells were incubated at low (5mM) or high (30mM) KCl concentrations, in the presence (+) or in the absence (-) of SPA ( $10^{-7}$ M) for 45min. The insulin concentration was normalized as the ratio of secreted insulin/intracellular insulin, and expressed in  $\mu\text{g/L}$ . Each value is the mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### **Figure 3: SPA effects on the TREK-1 channel activity, in MIN6-B1 cells.**

(A) Whole-cell currents were measured in MIN6-B1 cells in presence of  $\text{K}^+$  blocker solution, as described in Materials and Methods. MIN6-B1 cells were clamped at -80mV and voltage changes were applied by ramp from -100 to +50mV. Native currents were recorded 1h after incubation in control conditions (grey line) or after stimulation of TREK-1 currents by 10mM of arachidonic acid (AA) (dark grey line) and/or in the presence of  $10^{-6}$ M SPA (dark line).

(B) Membrane potentials were obtained in the control conditions and in the presence of SPA ( $10^{-6}\text{M}$ ) or glib ( $10\mu\text{M}$ ). The difference of membrane potential between SPA-treated cells and control cells was  $\Delta V_m = V_{m(\text{Control})} - V_{m(\text{SPA})} = 12.6 \pm 2.02\text{mV}$  ( $n=15$ ) ( $***p<0.001$ ).

(C) MIN6-B1 cells incubated with 2mM glucose (white bar), or with 20mM glucose in the absence (black bar) or in the presence of SPA ( $10^{-7}\text{M}$ , medium grey bar) or ex4 ( $10^{-7}\text{M}$ , light grey bar). The difference of membrane potential between low glucose (G2) concentration-treated cells and high glucose (G20) concentration-treated cells was  $\Delta V_m = V_{m(\text{G2})} - V_{m(\text{G20})} = 11.26 \pm 1.91\text{mV}$  ( $n=7$ ). At 20 mM glucose, the difference of membrane potential between ex4-treated cells and untreated cells was  $\Delta V_m = V_{m(\text{G20+ex4})} - V_{m(\text{G20})} = 11.11 \pm 3.53\text{mV}$  ( $n=5$ ). At 20 mM glucose, the difference of membrane potential between SPA-treated cells and untreated cells was  $\Delta V_m = V_{m(\text{G20+SPA})} - V_{m(\text{G20})} = 16.71 \pm 3.48\text{mV}$  ( $n=4$ ,  $*p<0.05$ ,  $***p<0.001$ )

#### Figure 4: SPA effects on cytosolic calcium variations

Intracellular calcium concentrations were measured using the Fura-2AM in MIN6-B1 cells. (A) At low glucose concentration (5mM), SPA ( $10^{-7}\text{M}$ ) induced an increase of cytosolic calcium concentration ( $n=18$ ). (B) MIN6-B1 cells were successively stimulated with KCl (25mM), ex4 ( $10^{-7}\text{M}$ ), SPA ( $10^{-7}\text{M}$ ), ex4 and glucose (20mM) ( $n=17$ ). (C) MIN6-B1 cells were stimulated with SPA ( $10^{-7}\text{M}$ ), in the absence or in the presence of ex4 ( $10^{-7}\text{M}$ ) ( $n=49$ ). (D) MIN6-B1 cells were incubated with a low concentration of 8-Br-cAMP (5mM), in the absence or in the presence of SPA ( $10^{-7}\text{M}$ ) ( $n=48$ ). (E) MIN6-B1 cells were incubated with a high concentration of 8-Br-cAMP (50mM), in the absence or in the presence of SPA ( $10^{-7}\text{M}$ ) ( $n=12$ ). (F) MIN6-B1 cells were incubated with SPA ( $10^{-7}\text{M}$ ) or ex4 ( $10^{-7}\text{M}$ ), in the absence or in the presence of H89 inhibitor ( $1\mu\text{M}$ ), a PKA activity inhibitor ( $n=38$ ). Calcium profiles are representative from 3 independent experiments, represents the number of cells.

#### Figure 5: Effects of SPA on glycaemic response during IPGTT in mice

(A) Mice were *i.v.* injected with NaCl (saline, black dots,  $n=9$ ) or SPA ( $10^{-5}\text{M}$ , black squares,  $n=7$ ). Glycaemia was measured between 0 and 120 minutes after glucose injection. (B) The area under the curve (AUC) was calculated using Prism software from the mean of all independent IPGTT graph. (C) Glycaemia of SPA- or NaCl-injected mice ( $n=7-8$ , respectively) was measured from blood samples collected at time 0 ( $t_0$ ) and 20min ( $t_{20}$ ) after *i.p.* glucose injection. (D) Plasma insulin concentration of SPA- or NaCl-injected mice ( $n=7-8$ , respectively)

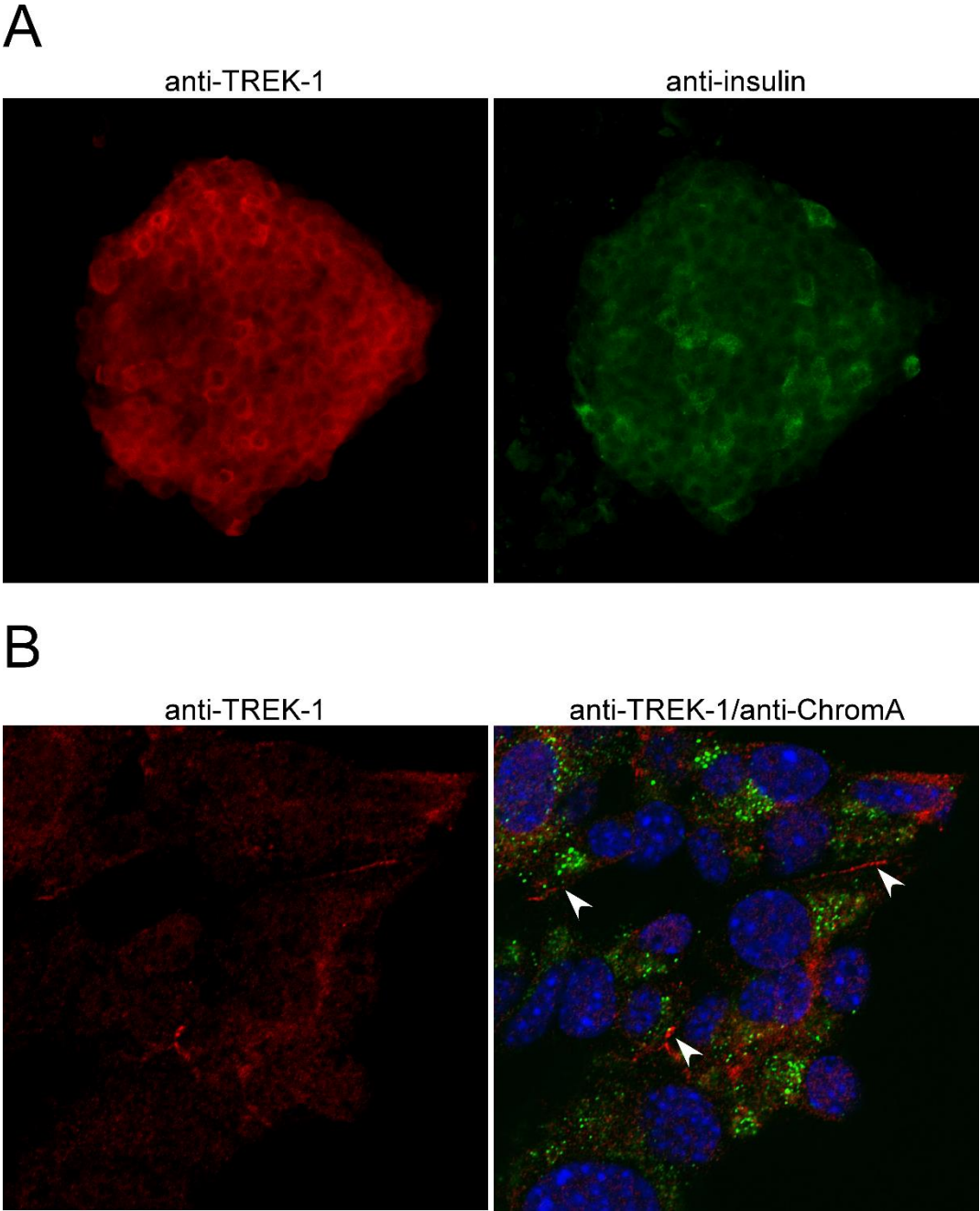
was measured from the same blood sample described above, at time 0 (t0), 20min (t20) after *i.p.* glucose injection (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

## References

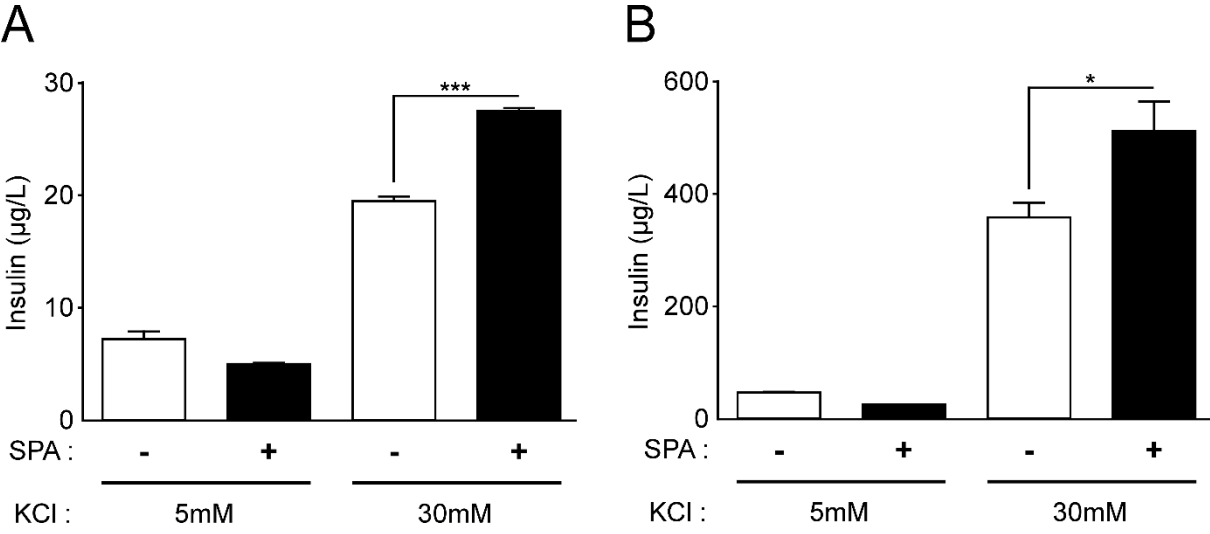
1. Deacon, C.F. and H.E. Lebovitz, *Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas*. *Diabetes Obes Metab*, 2016. **18**(4): p. 333-47.
2. Cantini, G., E. Mannucci, and M. Luconi, *Perspectives in GLP-1 Research: New Targets, New Receptors*. *Trends Endocrinol Metab*, 2016. **27**(6): p. 427-38.
3. Felix-Martinez, G.J. and J.R. Godinez-Fernandez, *Mathematical models of electrical activity of the pancreatic beta-cell: a physiological review*. *Islets*, 2014. **6**(3): p. e949195.
4. Nichols, C.G. and M.S. Remedi, *The diabetic beta-cell: hyperstimulated vs. hyperexcited*. *Diabetes Obes Metab*, 2012. **14 Suppl 3**: p. 129-35.
5. Prentki, M., K. Tornheim, and B.E. Corkey, *Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion*. *Diabetologia*, 1997. **40 Suppl 2**: p. S32-41.
6. McTaggart, J.S., R.H. Clark, and F.M. Ashcroft, *The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet*. *J Physiol*, 2010. **588**(Pt 17): p. 3201-9.
7. Koster, J.C., M.A. Permutt, and C.G. Nichols, *Diabetes and insulin secretion: the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (KATP) connection*. *Diabetes*, 2005. **54**(11): p. 3065-72.
8. Yang, S.N., et al., *Ionic mechanisms in pancreatic beta cell signaling*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(21): p. 4149-77.
9. Kang, D., C. Choe, and D. Kim, *Thermosensitivity of the two-pore domain K<sup>+</sup> channels TREK-2 and TRAAK*. *J Physiol*, 2005. **564**(Pt 1): p. 103-16.
10. Patel, A.J., et al., *A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel*. *EMBO J*, 1998. **17**(15): p. 4283-90.
11. Patel, A.J., et al., *Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels*. *Nat Neurosci*, 1999. **2**(5): p. 422-6.
12. Maingret, F., et al., *Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(38): p. 26691-6.
13. Murbartian, J., et al., *Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(34): p.30175-84.
14. Chemin, J., et al., *Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels*. *EMBO J*, 2003. **22**(20): p. 5403-11.
15. Terrenoire, C., et al., *A TREK-1-like potassium channel in atrial cells inhibited by betaadrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics*. *Circ Res*, 2001. **89**(4): p. 336-42.
16. Shibasaki, T., et al., *Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion*. *Diabetes Obes Metab*, 2014. **16 Suppl 1**: p. 118-25.

17. Yang, H. and L. Yang, *Targeting cAMP/PKA pathway for glycemic control and type 2 diabetes therapy*. J Mol Endocrinol, 2016. **57**(2): p. R93-R108.
18. Mazella, J., et al., *Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design*. PLoS Biol, 2010. **8**(4): p. e1000355.
19. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
20. Beraud-Dufour, S., et al., *Neurotensin is a regulator of insulin secretion in pancreatic betacells*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1681-8.
21. Sutton, R., et al., *Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase*. Transplantation, 1986. **42**(6): p. 689-91.
22. Coppola, T., et al., *Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(6): p. 1906-15.
23. Beraud-Dufour, S., et al., *Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(12): p. 2398-402.
24. Devader, C., et al., *In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant Spadin*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(10): p. 2604-17.
25. Edwards, P.J. and C. Sturino, *Managing the liabilities arising from structural alerts: a safe philosophy for medicinal chemists*. Curr Med Chem, 2011. **18**(20): p. 3116-35.
26. Moha Ou Maati, H., et al., *Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects*. Neuropharmacology, 2012. **62**(1): p. 278-88.
27. Veyssiere, J., et al., *Retroinverso analogs of Spadin display increased antidepressant effects*. Psychopharmacology (Berl), 2015. **232**(3): p. 561-74.
28. Sandoz, G., et al., *Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA(B) signaling*. Neuron, 2012. **74**(6): p. 1005-14.

**Figure 1:**

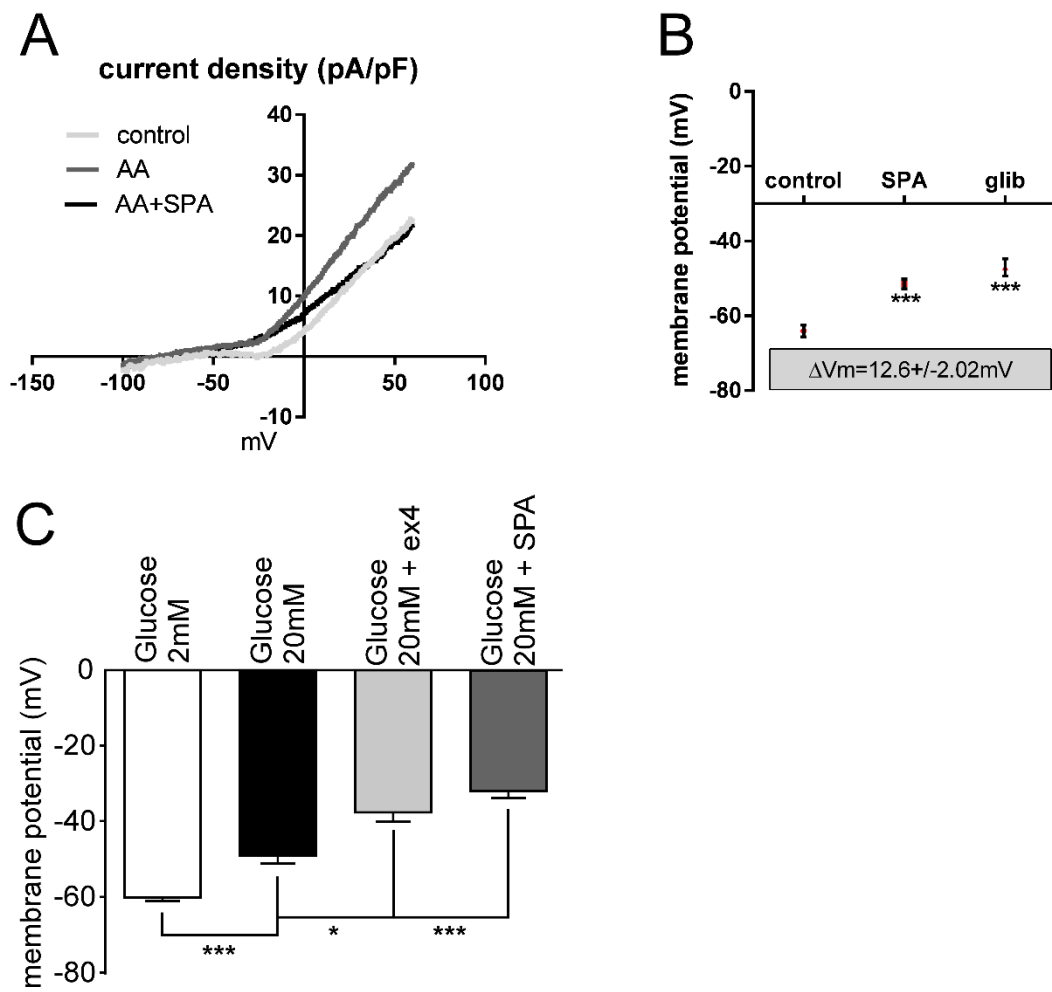


**Figure 2:**

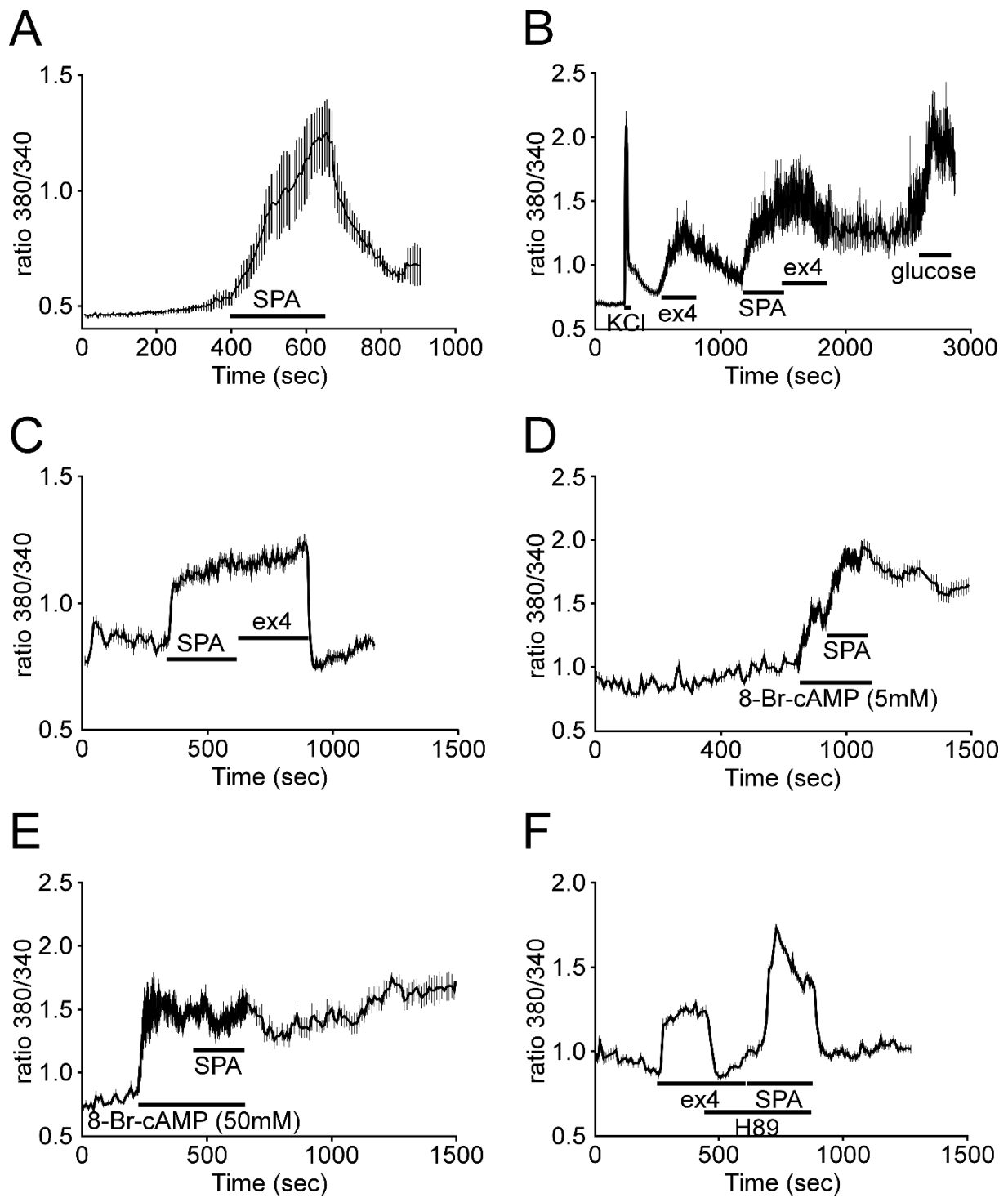




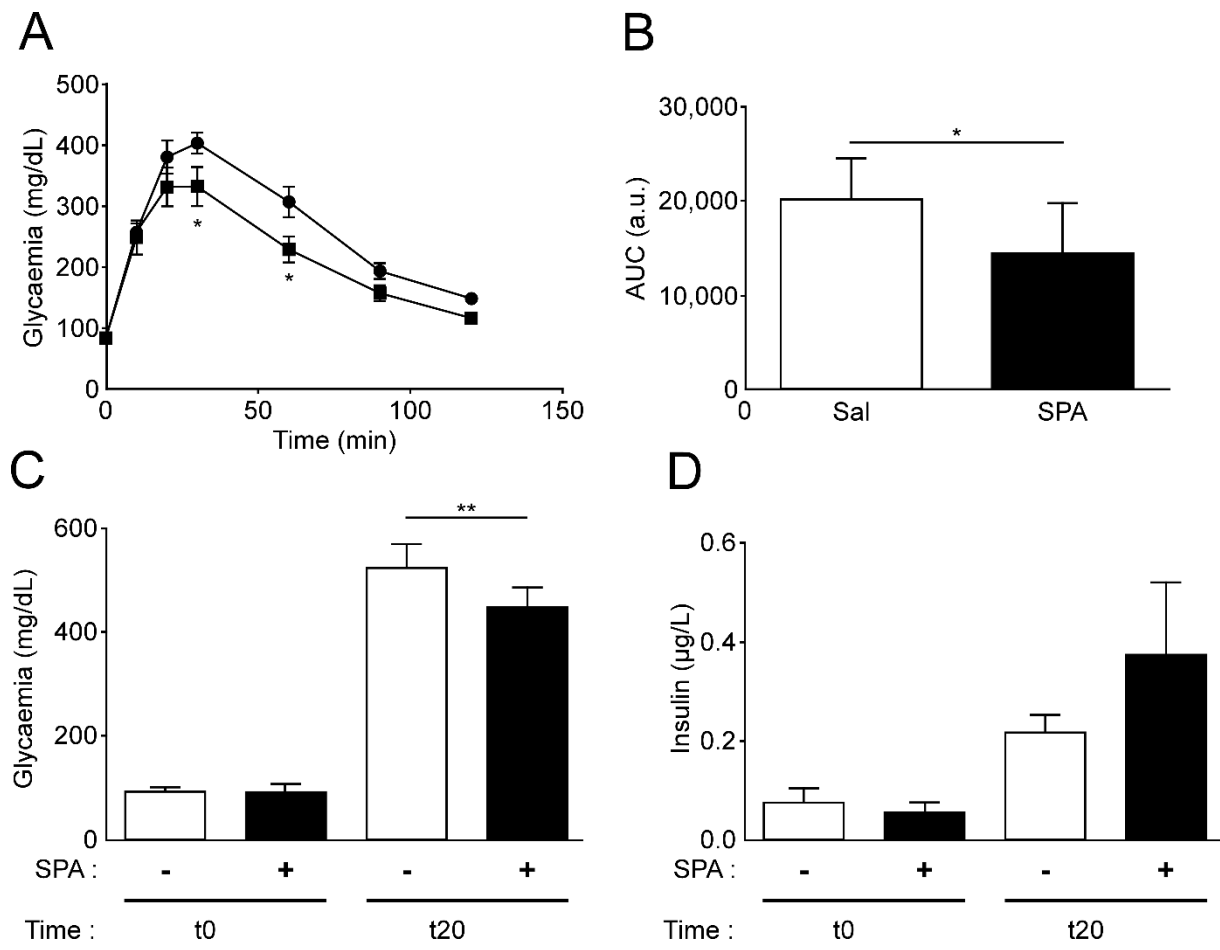
**Figure 3:**



**Figure 4:**

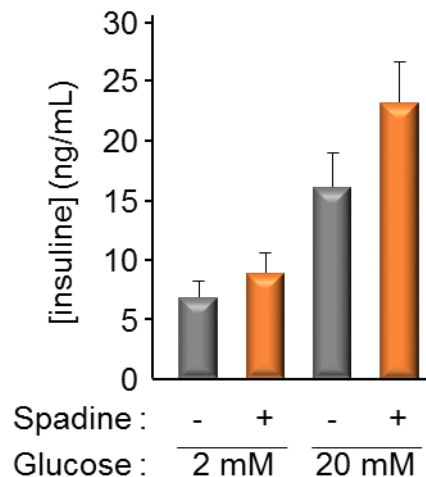


**Figure 5:**



## Discussion

Cette étude illustre pour la première fois l'implication du canal TREK-1 dans le fonctionnement de la cellule  $\beta$ . En effet, ce canal est exprimé dans les ilots de Langerhans de souris et dans les cellules Min6 (*figure 1 de l'article*). La spadine, l'inhibiteur des courants TREK-1, induit une dépolarisation membranaire des cellules Min6, que ce soit à bas ou haut glucose, stimule l'influx calcique indépendamment de la PKA et potentialise la sécrétion d'insuline induite par le KCl (*respectivement figures 3, 4 et 2 de l'article*). *In vivo*, l'injection de spadine chez des souris améliore la tolérance au glucose, ce qui semble associé à une augmentation de l'insuline circulante (non significatif) (*figure 5 de l'article*). Ces résultats, bien que prometteurs, nécessitent des études complémentaires afin de confirmer l'implication des canaux TREK-1 dans la sécrétion d'insuline et décrire les mécanismes sous-jacents.



**Figure 32 : Effet de la spadine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose des cellules Min6.**

Les cellules Min6 sont incubées en conditions basale ([glucose] = 2 mM) ou stimulante ([glucose] = 20 mM), en l'absence (-) ou en présence (+) de spadine ( $10^{-7}$  M) pendant 45 minutes. La concentration d'insuline libérée est mesurée à l'aide du kit ELISA Ultrasensible Mercodia et normalisée par la quantité totale de protéines. Chaque valeur est représentée par sa moyenne +/- SEM, n = 3.

**Dans un premier temps**, il est nécessaire de montrer que la spadine potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose de façon significative. En effet, la stimulation au KCl induit une dépolarisation forcée de la membrane plasmique des cellules Min6, conduisant à l'exocytose des vésicules situées juste sous la membrane plasmique. Dans ce cas, la sécrétion d'insuline est monophasique. Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire sur les

cellules insulino-sécrétrices Min6 suggère que la spadine potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Figure 32).

**Dans un deuxième temps**, il faut valider l'hypothèse selon laquelle le canal TREK-1 est la seule cible de la spadine dans les cellules  $\beta$  du pancréas. En effet, la spadine n'a pas d'effet sur les autres canaux K<sub>2</sub>P (Moha Ou Maati et al., 2012). En revanche, la sortiline est exprimée dans les ilots de Langerhans murins et les lignées de cellules  $\beta$  (Beraud-Dufour et al., 2009; Coppola et al., 2008; Mazella et al., 2010). On ne peut donc pas exclure un effet de la spadine sur la sortiline seule ou associée à l'un de ses partenaires, comme c'est le cas dans les cellules  $\beta$ -TC3 (Beraud-Dufour et al., 2009). Pour le confirmer, l'institut dispose des deux modèles de souris invalidées pour le canal TREK-1 (TREK-1<sup>-/-</sup>) ou pour la sortiline (NTSR3<sup>-/-</sup>). La réalisation d'un test de tolérance au glucose sur ces souris, injectées ou non avec la spadine, permettra d'identifier la ou les cible(s) de la spadine. *In vitro*, l'utilisation de petits ARN interférents dirigés contre la sortiline ou contre le canal TREK-1 permettra également de quantifier l'impact de l'invalidation génétique de ces deux protéines sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans la lignée  $\beta$  pancréatique Min6.

**Dans un troisième temps**, la compréhension des mécanismes moléculaires est une étape clé dans l'étude des effets de la spadine sur la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ . L'étude présentée ici montre que l'exendine-4, un analogue du GLP-1-R, et la spadine induisent une dépolarisation membranaire des cellules Min6 en présence de glucose, ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique (*respectivement figures 3C et 4A-C de l'article*). De plus, seul l'effet de l'exendine-4 est sensible au H89, un inhibiteur de l'activité de la PKA (*figures 4F de l'article*). Enfin, l'influx calcique induit par la spadine est lié de la concentration en AMPc : l'effet de la spadine est faible si la concentration en AMPc est élevée, et inversement (*figures D-E de l'article*) (Figure 33). D'après les informations obtenues dans la littérature, la phosphorylation du canal TREK-1 par la PKA (elle-même activée par l'augmentation de la concentration en AMPc) provoque sa fermeture (Murbartian et al., 2005). L'exendine-4 est un peptide synthétique qui mime les effets des hormones incrélines : il provoque une augmentation de la concentration en AMPc dans la cellule  $\beta$  et l'entrée de Ca<sup>2+</sup>, ce qui potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Goke et al., 1993; Kang et al., 2001) (Figure 9, Figure 33). L'exendine-4 et la spadine ont donc les mêmes effets sur le potentiel de membrane, l'influx calcique et la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ , mais les voies de signalisation mises en jeu sont différentes. Les effets de l'exendine-4 pourraient passer par la

phosphorylation du canal TREK-1 grâce à l'activation de la PKA, alors que ceux de la spadine seraient liés à un blocage mécanique du pore ou à un changement de conformation du canal, tel que cela est illustré dans la Figure 33.

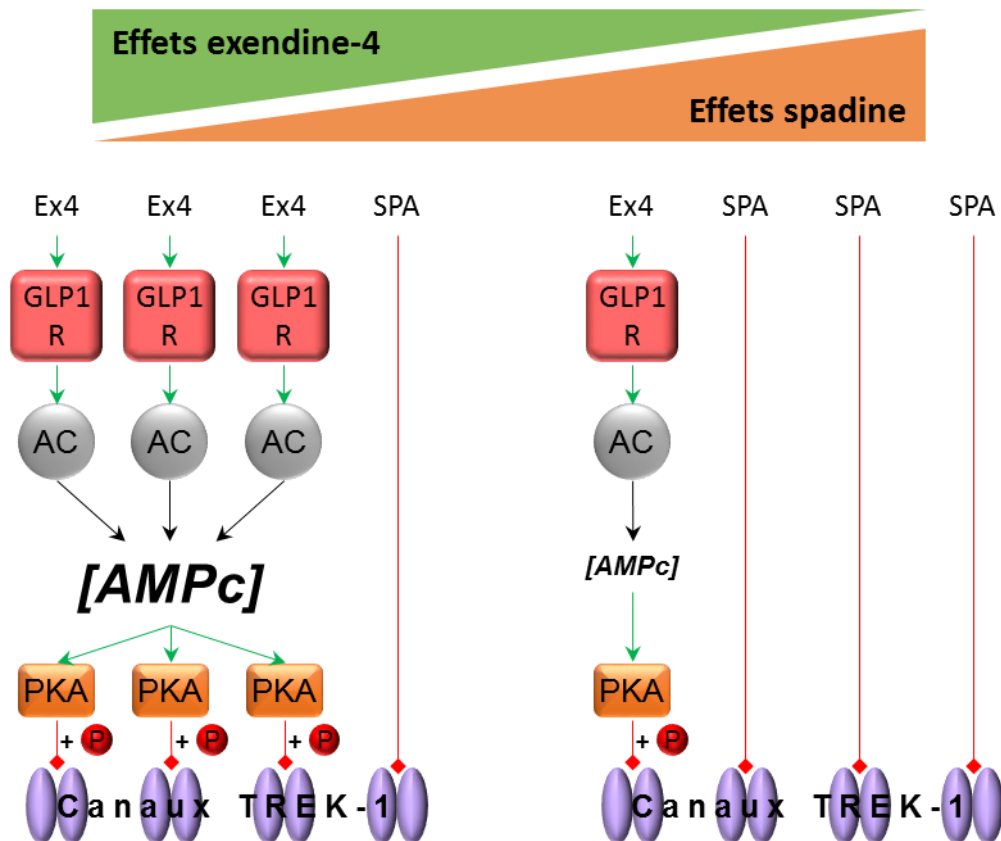


Figure 33 : Les effets de l'exendine-4 (Ex4) et de la spadine (SPA) sur l'activité des canaux TREK-1.

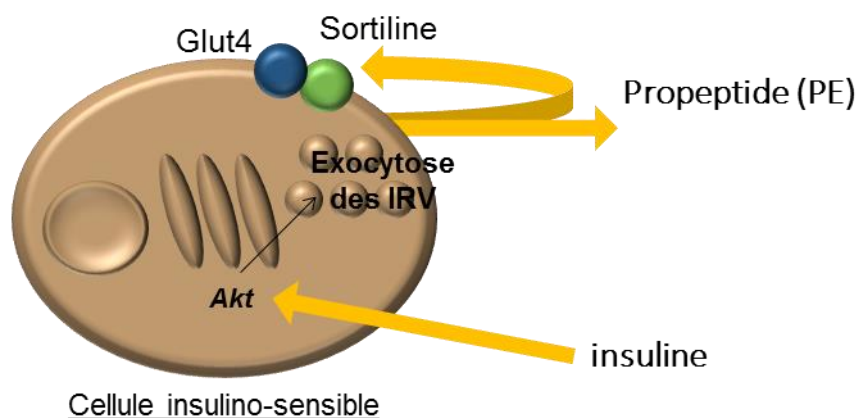
La stimulation de cellules, co-transfectées avec le canal myc-TREK-1 et le GLP-1-R, avec l'exendine-4 ou la spadine, suivie d'une immunoprécipitation du canal TREK-1 tagué et de la révélation des sérines phosphorylées, permettraient de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'exendine-4 induit la phosphorylation du canal TREK-1, contrairement à la spadine. Le laboratoire dispose également de plusieurs mutants du canal TREK-1, constitutivement phosphorylés (la sérine est remplacée par l'aspartate (D)) ou non phosphorylables (la sérine est remplacée par l'alanine (A)) sur les sérines 300 et 333. L'étude des effets de la spadine sur ces mutants pourraient apporter des informations quant au mécanisme moléculaire engendré par la spadine. Les mutants S300D et S333D qui miment la phosphorylation sont en conformation fermée et ne devraient pas être affectés par la spadine. A l'inverse, les courants engendrés par les mutants non phosphorylables, en conformation ouverte, devraient être affectés par la spadine, mais pas par l'exendine-4.

En résumé, cet article illustre pour la première fois **l'implication potentielle du canal TREK-1 dans la sécrétion d'insuline** par les cellules  $\beta$ , ainsi que **les effets de la spadine**. Ces résultats nécessitent des analyses complémentaires afin de montrer que le canal TREK-1 est la seule cible de la spadine et d'identifier les mécanismes moléculaires qui en découlent. Dans ces circonstances, la spadine pourrait devenir un nouveau traitement du diabète de type 2, en tant que peptide synthétique qui, telle une hormone incrétine, potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

## Partie 2 : Etude des mécanismes de production et de libération du PE, et des effets de la spadine sur le modèle adipocytaire

### Introduction

La sortiline est fortement exprimée dans les tissus insulino-sensibles tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc (Lin et al., 1997). Son expression dans les adipocytes et les cellules musculaires squelettiques est fortement stimulée au cours du processus de différenciation, puisqu'elle contribue à elle seule à la biogenèse des IRV et à l'acquisition de la sensibilité à l'insuline (Ariga et al., 2008; Morris et al., 1998; Shi and Kandror, 2005). De plus, sous l'effet de l'insuline, la sortiline est transférée à la membrane plasmique en même temps que Glut4 (Lin et al., 1997; Morris et al., 1998). Compte tenu de ces données bibliographiques, l'équipe a émis l'hypothèse selon laquelle le transfert de la sortiline à la membrane plasmique est associé à la libération du PE dans le milieu extracellulaire (Figure 34). Le PE ainsi libéré pourrait agir de façon autocrine en interagissant avec la sortiline et/ou de façon paracrine sur les tissus cibles exprimant la sortiline, le canal TREK-1 ou un autre récepteur encore non-identifié (Figure 34).



**Figure 34 : Sous l'effet de l'insuline, les cellules insulino-sensibles pourraient libérer le PE dans la circulation.**

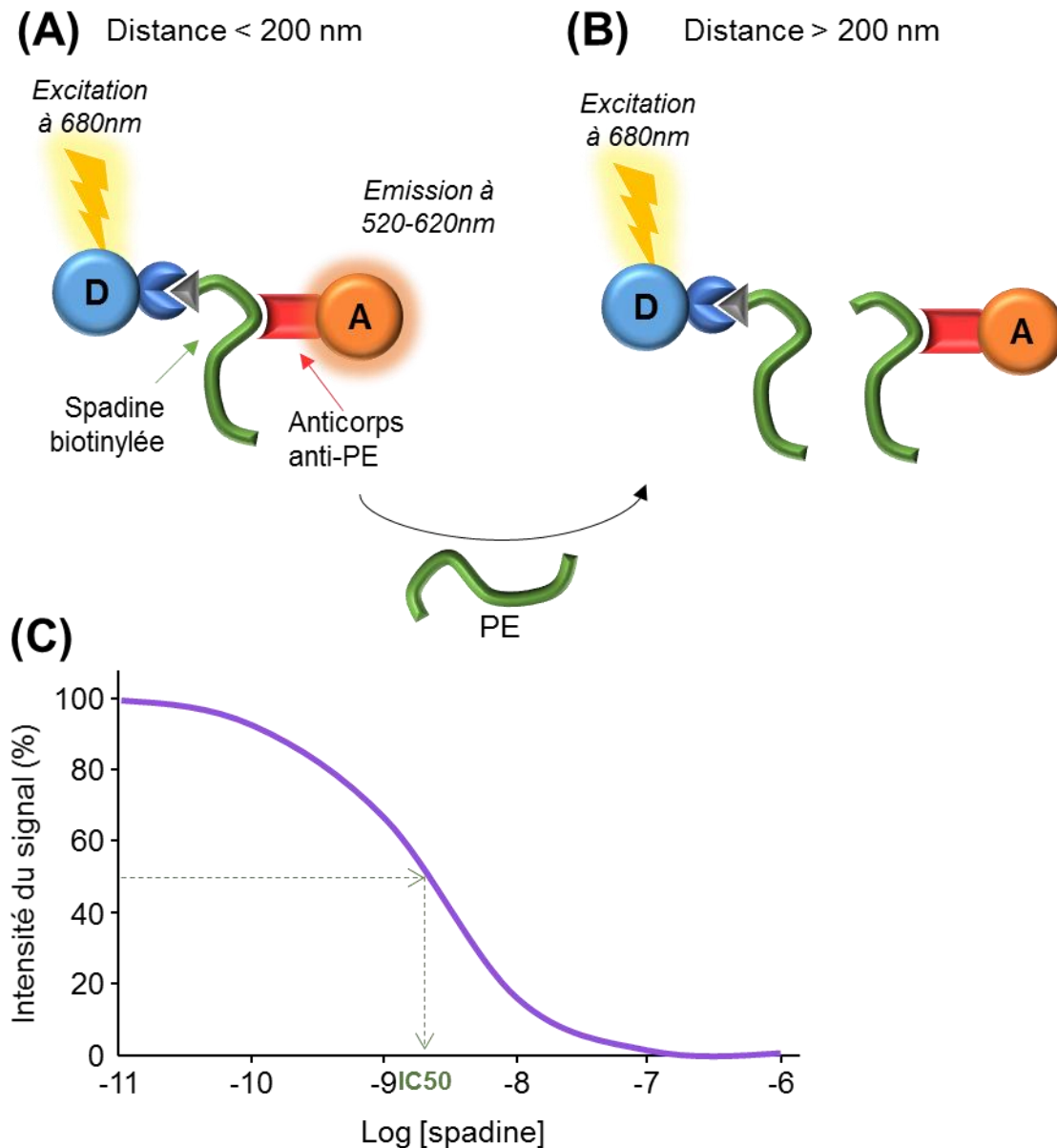
Le premier objectif de cet article est de **caractériser les mécanismes de production et de libération du PE** au sein de la lignée adipocytaire 3T3-L1, lors de l'adipogenèse et soumise à des conditions inflammatoires et d'insulino-résistances. Le deuxième objectif consiste à



**identifier les effets de son analogue synthétique, la spadine, sur le stockage de glucose, la fonction principale des adipocytes.**

## Matériels et méthodes : le dosage Alphascreen™

La concentration en PE présent dans les échantillons est quantifiée par une technique de dosage originale, mise au point par l'équipe et basée sur la **technologie AlphaScreen™** développée par la société Perkin Elmer (Mazella et al., 2010). Le principe de ce système, détaillé ci-dessous, est basé sur la transmission d'un signal lumineux entre une bille donneuse et une bille acceptrice distantes de moins de 200 nm (Figure 35).



**Figure 35 : Principe du dosage du PE selon la technique Alphascreen™.**  
(A) En l'absence de PE dans l'échantillon, le signal est transmis entre la bille donneuse (D) et la bille acceptrice (A). (B) Le PE présent dans l'échantillon entre en compétition avec la spadine biotinylée pour l'anticorps anti-PE. (C) Courbe étalon représentant le pourcentage d'intensité du signal en fonction du logarithme de la concentration en spadine. IC50 ≈ 2,3nM.

L'anticorps dirigé contre le PE (il reconnaît également la spadine avec la même affinité) est couplé à une bille acceptrice (A) (Figure 35). La bille donneuse (D) est couplée à la streptavidine (Figure 35). Cette technique est basée sur la compétition entre la spadine biotinylée et le PE présent dans l'échantillon. Lorsque l'échantillon est dépourvu de PE, l'anticorps reconnaît uniquement la spadine biotinylée, la distance entre les deux billes est inférieure à 200 nm, l'intensité du signal est maximale (Figure 35A). Lorsque l'échantillon contient du PE, la compétition de ce dernier avec la spadine biotinylée pour l'anticorps induit un éloignement des deux billes et une perte de signal (Figure 35B). Grâce à une courbe étalon, nous pouvons déterminer la concentration en PE de l'échantillon à partir de l'intensité du signal (Figure 35C).

### **Sortilin-derived propeptide regulation during adipocyte differentiation and inflammation**

---

Hivelin Céline<sup>1</sup>, Mazella Jean<sup>2</sup> and Coppola Thierry<sup>3#</sup>

<sup>1</sup>: Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France

<sup>2</sup>: Université Côte d'Azur, CNRS, IPMC, France

<sup>3</sup>: Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France

#: To whom correspondence should be addressed: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR 7275, Université de Nice Sophia Antipolis, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne, France. Tel.: +33 4 93957765; Fax: +33 4 93957708. E-mail: coppola@ipmc.cnrs.fr.

Key words: **sortilin, adipocyte, inflammation, insulin resistance, spadin.**

## ABSTRACT

Sortilin, a type 1 receptor, is involved in the trafficking of membrane proteins, including the glucose transporter Glut4, and is expressed in white adipose tissue. The maturation of sortilin leads to the release of the propeptide (PE), a ligand of sortilin. Recently, we have identified a shorter analogue of PE, spadin, which is a potent antidepressant in mice. In this study, we investigated whether the expression of sortilin was correlated with the production of PE during adipocyte differentiation, insulin resistance and inflammation, and then, the effect of spadin on the adipocyte function. We found that sortilin, PE and VAMP2, a specific marker of Glut4-containing vesicles, are co-localized in 3T3-L1 adipocytes. We also showed a correlation between the production of PE and the sortilin expression during adipogenesis, TNF $\alpha$ -induced inflammation and dexamethasone-induced insulin resistance. Finally, spadin had no effect on glucose uptake and insulin-activated signalling pathways. This study indicates that, in adipocytes, *i*) there is a positive correlation between sortilin expression and PE production, and *ii*) the antidepressant spadin has no side effect on glucose storage.

## INTRODUCTION

Sortilin is a 95 kDa type-1 membrane protein [1], synthesized as a precursor protein (called prosortilin) in the endoplasmic reticulum [2]. In late Golgi compartments and in post-Golgi vesicles, the prosortilin is converted by furin in sortilin (the mature form), allowing the release of a 44-amino acid propeptide (PE) [1; 2]. PE binds to the mature sortilin with high affinity (~5 nM) [2]. Sortilin is localized 10% at the plasma membrane and 90% in intracellular compartments, which confers it multiple and complex functions [3]. Sortilin is involved in the trafficking of several proteins to lysosomes [4] or to the plasma membrane, such as the glucose transporter Glut4 and the two-pore-domain potassium channel, TREK-1 [5; 6]. Recently, genome-wide association studies have associated sortilin with a risk factor for hypercholesterolemia and myocardial infarction [7]. Other studies also suggest a role of sortilin in glucose homeostasis, and therefore, in metabolic diseases such as diabetes and obesity. Indeed, sortilin is crucial for the formation and the insulin sensitivity of Glut4-containing vesicles in adipocytes [3; 5; 8-9].

The sortilin maturation occurs in Golgi apparatus, suggesting that the PE might be released outside the cells after constitutive and/or stimuli-induced fusion of vesicles with the plasma membrane. Evidence suggest that the sortilin expression and the PE production might be regulated at the transcriptional and post-translational levels. Indeed, metabolic pathologies such as inflammation, insulin resistance and obesity down-regulate the sortilin expression [10-12]. For example, obesity is associated with a decrease of sortilin mRNA in human liver [11] and with an increase of sortilin degradation in mouse liver [12]. In adipocytes and in skeletal muscle, obese mice and humans have a down-regulation of sortilin at the mRNA and protein levels, probably due to the effect of the pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  [10].

Despite all these studies, nothing is known about the production and the release of PE. This point is an important issue, especially since we have measured relatively high concentration of circulating PE in mouse [6] and human blood (in press). In the latter study, we have correlated the level of circulating PE to a depressive pathological state, in human. The first aim of this work was to study the regulation of PE expression, its release and its physiological function. Since spadin, a shorter analogue of PE, is a fast acting antidepressant in preclinical development phase, the second objective of this work is to determine the existence of adverse side effect. In this study, we investigated whether the expression of sortilin was correlated with the production of PE during adipocyte differentiation, insulin resistance and inflammation, as well as the effect of spadin on the adipocyte physiology (glucose uptake and insulin-activated signalling pathways). We showed that, in 3T3-L1 adipocytes, the PE production is correlated to the sortilin expression during adipogenesis and inflammation, and spadin did not induce glucose storage.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Mouse 3T3-L1 pre-adipocytes were purchased from American Type Culture Collection (Molsheim, France). 3T3-L1 cells were cultured in DMEM high glucose containing 10% calf serum, 100units/mL penicillin and 100 $\mu$ g/mL streptomycin at 37°C under a humidified condition of 95% O $_2$  and 5% CO $_2$ . For differentiation, pre-adipocytes were plated at a confluence of 8,000cells/cm $^2$ . Two days after confluence, differentiation was started using the following medium (DMEM high glucose containing 10% foetal bovine serum (FBS), 100units/mL penicillin, 100 $\mu$ g/mL streptomycin, 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine

(IBMX), 0.25 $\mu$ M dexamethasone, 0.4 $\mu$ M insulin and 2 $\mu$ M rosiglitazone). At day 2 of differentiation, cells were cultured in maintenance medium (DMEM high glucose containing 10% FBS, 100units/mL penicillin, 100 $\mu$ g/mL streptomycin and 0.4 $\mu$ M insulin). This medium was changed every 48 hours. 3T3-L1 adipocytes were used at the 7th day of differentiation.

### **Membrane protein preparation**

Membrane proteins from 3T3-L1 cells were recovered during differentiation at day 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14. To study the effects of TNF $\alpha$  and dexamethasone on protein expression, differentiated 3T3-L1 cells (7 days) were incubated for 24, 48 and 72h with 20ng/ml of TNF $\alpha$  (Peprotech, Neuilly sur Seine, France) (vehicle = BSA 0.1%) or 1 $\mu$ M of dexamethasone (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) (vehicle = absolute ethanol). Cells were lysed with a Tris-EDTA (TE) buffer (10mM Tris pH 6.8, 1mM EDTA), sonicated and then centrifuged at 12,000g for 15min at 4°C. The supernatant was collected to measure the PE concentration. The pellet was re-suspended in an appropriate volume of TE in order to measure the protein concentration by Bradford assay. 40 $\mu$ g of proteins were solubilized in the following buffer (65mM Tris HCl pH 6.8, 0.25mM EDTA, 1% SDS, 0.025% bromophenol blue, 6% glycerol and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol) and heated 5min at 95°C.

### **Western Blot analysis**

Western blots were performed according to the method previously described [13]. All the antibodies were diluted at 1:1000 and were purchased from Santa Cruz (Heidelberg, Germany), except for the anti-phospho-Ampk (1:1000, Ozyme, St Quentin Yvelines, France), the mouse monoclonal anti-sortilin (1:1000, BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France) and the mouse monoclonal anti- $\beta$ -Actin (1:5000, Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Proteins were detected using Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Chemicals Millipore, Nottingham, United Kingdom) on a Fusion-FX7 imager (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France). Quantification of protein level was done using ImageJ software (version 1.50i; Wayne Rasband, Washington DC, USA) after normalization with control proteins.

### **PE production and secretion assay**

The PE concentration produced during differentiation of 3T3-L1 cells, after TNF $\alpha$  or dexamethasone treatments, or released after insulin stimulation, was quantified using the AlphaScreen technology, a bead-based proximity assay, as previously described [6]. Measures

were performed on soluble proteins cell fraction, leaving apart insoluble proteins: this procedure allowed a discrimination of the mature and the uncleaved forms of PE.

### **Immunocytochemistry**

3T3-L1 cells were treated using the protocol previously described [13]. Cells were immunostained with either a mouse monoclonal anti-VAMP2 (1:2000, Synaptic System, Goettingen, Germany), or a rabbit monoclonal anti-sortilin (1:200, Millipore, Molsheim, France) or a rabbit polyclonal anti-Glut4 (1:100, Millipore, Molsheim, France). Secondary antibodies were used as following: donkey anti-rabbit Alexa594 antibody (1:2000, Invitrogen, Carlsbad, USA), donkey anti-mouse Alexa488 antibody (1:2000, Invitrogen, Carlsbad, USA). Confocal images were generated using the LSM780 microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

### **2-Deoxy-D-glucose uptake**

3T3-L1 adipocytes were incubated 24 to 72h with TNF $\alpha$  (20ng/mL) or 24h with dexamethasone (100nM or 1 $\mu$ M) and then starved 24h in FBS. Cells were washed twice and incubated 30min in a glucose-free buffer (140mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM MgSO $_4$ , 1mM CaCl $_2$ , 20mM HEPES/NaOH pH 7.4). For the steady state incorporation, cells were incubated at various times with insulin (10nM) or spadin (10nM) in the absence of glucose. Two min before the end of incubation, glucose uptake was induced by adding deoxy-D-glucose, 2-[1, 2- $^3$ H(N)] (1 $\mu$ Ci/mL, Perkin Elmer, France). The reaction was stopped by 5 washes using a glucose-free ice-cold PBS buffer. For the kinetic incorporation, cells were incubated 5, 15 or 30min with the following buffer (5mM glucose, 1 $\mu$ Ci/mL deoxy-D-glucose, 2-[1, 2- $^3$ H(N)]) and 10nM of insulin or spadin or both. The reaction was stopped as above, in the presence of 10mM glucose. Cells were then solubilized in a lysis buffer (1% triton X100, 140mM NaCl and 20mM HEPES pH 7.4). The incorporated radioactivity was measured using liquid scintillation and quantified as the ratio of  $^3$ H/total protein. The ratio was expressed as the fold increase compared to the control conditions (untreated cells, TNF $\alpha$  (-), Dex. (-)).

### **Real-Time quantitative RT-PCR analysis**

Total RNAs from 3T3-L1 cells were isolated using the phenol-chloroform extraction method [14], with the TRI Reagent buffer (Sigma Aldrich, France), according to the manufacturer's instructions. RNA was purified with the Turbo DNase kit (Invitrogen, France). First strand cDNA was then synthesized from 2 $\mu$ g total RNA using the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR assays (duplicate for each condition) were performed



in 96-wells plate on a Light Cycler 480. Primers sequences were detailed in **Table 1**. The Ct value of each interest gene was normalized to the average of the Ct of the reference genes (18S RNA,  $\beta$ actin and Tbp):  $\Delta Ct = Ct_{\text{goi}} - Ct_{\text{ref}}$ , with  $Ct_{\text{ref}} = (Ct_{\text{ref1}} \times Ct_{\text{ref2}})^*(1/2)$ , goi = gene of interest and ref = reference gene.  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  experimental condition –  $\Delta Ct$  control condition. Values were expressed as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  normalized with undifferentiated cells or the vehicle treatment as control.

**Table 1: Primers used in real-time PCR assays**

	ACCESSION N°	FORWARD	REVERSE	EFFICACY
<b>18S RNA</b>	NR_003278	5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3'	5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3'	2.035
<b><math>\beta</math>actin</b>	NM_007393	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	5'-CCTTCTGACCCATTCCCACC-3'	1.966
<b>Ntsr3</b>	NM_001271599	5'-CGGATATCACGACGACTCAG-3'	5'-GAGCCTCAGGGAGTGTAGGA-3'	1.967
<b>Tbp</b>	NM_013684	5'-ACCCTTCACCAATGACTCCTATG-3'	5'-ATGATGACTGCAGCAAATCGC-3'	1.973

### Signalling experiments

To study the insulin and spadin signalling pathways, 3T3-L1 adipocytes were starved 24h in FBS and then incubated for various times at 37°C in an EARL's buffer (25mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl, 5mM KCl, 1.8mM MgCl<sub>2</sub> and 3.6mM CaCl<sub>2</sub>) containing 10nM insulin or spadin. Cells were washed twice with an ice-cold PBS buffer and then lysed in the following buffer (30mM Tris HCl pH 6.8, 0.5mM EDTA, 2% SDS, 0.05% bromophenol blue, 12% glycerol and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol). Samples were then subjected to western blot.

### Data analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from two to seven independent experiments. Statistical significance was calculated with R commander software (version 3.2.0), from median values obtained using the non-parametric Kruskal–Wallis test, except in two cases. P values corresponding to variations of PE concentrations during 3T3-L1 differentiation were determined using ANOVA, followed by Tukey HSD post hoc test. Normality for all groups was verified using the Shapiro-Wilk normality test. According to the Levene variance test, variances were homogenous for all groups (F=0.95; P=0.48). P values corresponding to the variations of PE level during TNF $\alpha$  or dexamethasone treatment were determined using the Mann-Whitney test.

## RESULTS

### Expression of PE and sortilin during the 3T3-L1 differentiation into adipocytes

We first investigated the expression of sortilin and PE in non-differentiated 3T3-L1 cells and during their differentiation into adipocytes. During the adipogenesis, the increase of the sortilin mRNA level appeared biphasic, with a first peak at the 4<sup>th</sup> day (by 24-fold compared to day 0;  $p=0.0352$ ), followed by a decrease at day 6 and then a significantly increase during differentiation up to day 14 (by 28-fold compared to day 0;  $p=0.00253$ ) (Figure 1A). At the protein level, the expression of sortilin was correlated with the level of produced soluble PE (Figure 1B). The expression of sortilin strongly increased between day 0 and day 4 (by 86-fold) to reach a plateau value, maintained all along the differentiation process (Figure 1B, black line). Similarly, the level of PE strongly increased by 3.8-fold between day 0 and day 4 ( $p<0.001$  at day 4), and then recovered a lower plateau value up to day 14 of differentiation (a 2-fold increase compared to day 0) (Figure 1B, red line).

Figure 1C shows that sortilin and PE are co-localized with VAMP2, a marker of Glut4-containing vesicles [15], in permeabilized 3T3-L1 adipocytes. Specifically, these molecules were all co-localized in the Golgi apparatus (Figure 1C, white arrows). The sortilin immunoreactivity was also present at the plasma membrane (Figure 1C, blue arrows), unlike the PE staining.

### Effect of TNF $\alpha$ and dexamethasone on PE and sortilin expression in 3T3-L1 adipocytes

To investigate the correlation between sortilin expression and the production of PE, we tested the effects of TNF $\alpha$  treatment, a pro-inflammatory cytokine, previously described to down-regulate sortilin mRNA and protein expression in 3T3-L1 adipocytes [10], and dexamethasone treatment, which inhibits the insulin-stimulated Glut4 translocation to the plasma membrane and the glucose transport [16].

The expression of sortilin was inhibited by 30% and 38% after 48 and 72h of TNF $\alpha$  treatment, respectively ( $p=0.035$  and  $p=0.0096$ , respectively) (Figure 2A). These results confirmed that TNF $\alpha$  treatment induced a strong down-regulation of sortilin expression at both mRNA (data not shown) and protein levels [10]. Interestingly, TNF $\alpha$  treatment also decreased the PE production from  $0.321 \pm 0.051$  to  $0.135 \pm 0.053\mu\text{M}$  after 72h incubation ( $p=0.018$ ) (Figure 2B). In these conditions, TNF $\alpha$  treatment strongly decreased the insulin-induced glucose uptake by approximately a factor 2 after 48h and 72h incubation ( $p=0.02$  at 48h) (Figure

2C). These results indicate that the TNF $\alpha$ -induced decrease of sortilin expression is correlated with the decrease of produced PE.

By contrast, dexamethasone treatment did not modify neither the sortilin expression (Figure 2D), nor the production of PE (Figure 2E), although we controlled that it inhibited the insulin-induced glucose uptake (Figure 2E). These results show that dexamethasone-induced insulin resistance is not sufficient to modify the sortilin expression and the PE production.

### **Effect of insulin on the release of PE**

Sortilin is expressed in adipocytes and is strongly involved in the insulin-induced translocation of Glut4 to the plasma membrane [5]. 3T3-L1 adipocytes were stimulated with increased concentrations of insulin for various times but such treatments did not modify the release of PE (Figure 3A).

### **Effect of spadin on glucose uptake and intracellular signalling pathways in 3T3-L1 adipocytes**

Spadin did not induce glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes (Figure 3B, red full squares). Furthermore, insulin-induced glucose uptake was not modified by spadin (Figure 3B, full red circles). Similar results were obtained at the steady state glucose uptake: unlike insulin, spadin did not induce glucose storage (Figure 3C).

Finally, spadin (Figure 4, grey bars) did not active Akt (Figure 4A), Erk1/2 (Figure 4B) and Ampk (Figure 4C), three insulin-activated kinases involved in the Glut4 translocation to the plasma membrane (Figure 4, black bars). Taken together, these results indicate that spadin has no effect on 3T3-L1 adipocytes.

## **DISCUSSION**

In this work, we show that sortilin expression and PE production are simultaneously increased during adipogenesis (Figure 1A-B). These results are in agreement with the role of sortilin in the formation and the insulin sensitivity of Glut4-containing vesicles [3; 8]. Moreover, in mature adipocytes, we observed that sortilin and PE are co-localized with VAMP2, a specific marker of Glut4-containing vesicles, in the Golgi apparatus (Figure 1C).

We investigated the effect of TNF $\alpha$  treatment on the PE level and confirmed the decrease of sortilin upon TNF $\alpha$  stimulation, as well as the reduction of the production of PE

(Figure 2A-B). Despite the fact that PE is measurable in mouse and human serum [6], the mechanisms of release in the blood circulation remain unknown. According to our results, the decrease of PE level in 3T3-L1 adipocytes is only associated with TNF $\alpha$ -induced inflammation and insulin resistance but not with dexamethasone-induced insulin resistance. This suggests that circulating PE level might be a predictor of insulin resistance only in association with inflammation.

In physiological conditions, insulin induces the transduction of Akt signalling, leading to the translocation of Glut4 to the plasma membrane and to the glucose storage into adipocytes [17]. Under these conditions, the translocation should be associated with the release of PE outside the cells [18]. Unfortunately, we show that insulin do not activate the release of PE (Figure 3A), suggesting that the regulation of the circulating PE, if existing, do not result from the insulin-induced translocation of sortilin to the plasma membrane. Spadin is a new class of highly effective and fast acting antidepressant, by inhibiting a potassium channel, TREK-1 [6; 19]. Obesity can increase the risk of depression, and depression is predictive of developing obesity [20]. Interestingly, personal results suggest that PE concentration in the blood may be associated to mood disorders, such as depression, and that spadin may modulate insulin secretion. So, we hypothesized that PE level might be a missing link between metabolism and mood.

The functional activity of spadin in the brain [21] prompt us to investigate its activity in peripheral targets where sortilin is expressed. We showed that spadin has no effect neither on basal glucose uptake, nor on insulin-induced glucose uptake (Figure 3). Moreover, spadin is unable to activate insulin-activated signalling pathways involved in glucose uptake, such as Akt, Erk or Ampk (Figure 4). Taken together, these results indicate that spadin does not play any role in adipocytes expressing sortilin, probably due to the absence of TREK-1 channels in these cells.

In conclusion, this work demonstrates that, *in vitro*, the production of PE is correlated with the expression of sortilin during adipogenesis and TNF $\alpha$ -induced inflammation. It also shows that spadin, a potent antidepressant in preclinical development phase, has no side effects on glucose storage in adipocytes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, a grant from the Société Francophone du Diabète (SFD 2011) to T.C and a grant from the Agence National de la Recherche (ANR-13-SAMA-0002) to JM. We thank Dr F. Brau from the imaging core facility and Dr S. Béraud-Dufour for scientific advice. The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- [1] C.M. Petersen, M.S. Nielsen, A. Nykjaer, L. Jacobsen, N. Tommerup, H.H. Rasmussen, H. Roigaard, J. Gliemann, P. Madsen, and S.K. Moestrup, Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 272 (1997) 3599-605.
- [2] C. Munck Petersen, M.S. Nielsen, C. Jacobsen, J. Tauris, L. Jacobsen, J. Gliemann, S.K. Moestrup, and P. Madsen, Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 18 (1999) 595-604.
- [3] N.J. Morris, S.A. Ross, W.S. Lane, S.K. Moestrup, C.M. Petersen, S.R. Keller, and G.E. Lienhard, Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 273 (1998) 3582-7.
- [4] S. Lefrancois, J. Zeng, A.J. Hassan, M. Canuel, and C.R. Morales, The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* 22 (2003) 6430-7.
- [5] B.Z. Lin, P.F. Pilch, and K.V. Kandror, Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 272 (1997) 24145-7.
- [6] J. Mazella, O. Petrault, G. Lucas, E. Deval, S. Beraud-Dufour, C. Gandin, M. El-Yacoubi, C. Widmann, A. Guyon, E. Chevet, S. Taouji, G. Conductier, A. Corinus, T. Coppola, G. Gobbi, J.L. Nahon, C. Heurteaux, and M. Borsotto, Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol* 8 (2010) e1000355.
- [7] V. Schmidt, and T.E. Willnow, Protein sorting gone wrong--VPS10P domain receptors in cardiovascular and metabolic diseases. *Atherosclerosis* 245 (2016) 194-9.
- [8] J. Shi, and K.V. Kandror, Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev Cell* 9 (2005) 99-108.
- [9] G. Huang, D. Buckler-Pena, T. Nauta, M. Singh, A. Asmar, J. Shi, J.Y. Kim, and K.V. Kandror, Insulin responsiveness of glucose transporter 4 in 3T3-L1 cells depends on the presence of sortilin. *Mol Biol Cell* 24 (2013) 3115-22.
- [10] V. Kaddai, J. Jager, T. Gonzalez, R. Najem-Lendom, S. Bonnafous, A. Tran, Y. Le Marchand-Brustel, P. Gual, J.F. Tanti, and M. Cormont, Involvement of TNF-alpha in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* 52 (2009) 932-40.
- [11] L. Bi, J.Y. Chiang, W.X. Ding, W. Dunn, B. Roberts, and T. Li, Saturated fatty acids activate ERK signaling to downregulate hepatic sortilin 1 in obese and diabetic mice. *J Lipid Res* 54 (2013) 2754-62.
- [12] J. Li, D.J. Matye, and T. Li, Insulin resistance induces posttranslational hepatic sortilin 1 degradation in mice. *J Biol Chem* 290 (2015) 11526-36.
- [13] S. Beraud-Dufour, T. Coppola, F. Massa, and J. Mazella, Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 41 (2009) 2398-402.
- [14] P. Chomczynski, and N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1987) 156-9.

- [15] V.K. Randhawa, P.J. Bilan, Z.A. Khayat, N. Daneman, Z. Liu, T. Ramlal, A. Volchuk, X.R. Peng, T. Coppola, R. Regazzi, W.S. Trimble, and A. Klip, VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol Biol Cell* 11 (2000) 2403-17.
- [16] H. Sakoda, T. Ogihara, M. Anai, M. Funaki, K. Inukai, H. Katagiri, Y. Fukushima, Y. Onishi, H. Ono, M. Fujishiro, M. Kikuchi, Y. Oka, and T. Asano, Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes* 49 (2000) 1700-8.
- [17] J.F. Tanti, S. Grillo, T. Gremeaux, P.J. Coffey, E. Van Obberghen, and Y. Le Marchand-Brustel, Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138 (1997) 2005-10.
- [18] J. Mazella, S. Beraud-Dufour, C. Devader, F. Massa, and T. Coppola, Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3 (2012) 143.
- [19] C. Heurteaux, G. Lucas, N. Guy, M. El Yacoubi, S. Thummler, X.D. Peng, F. Noble, N. Blondeau, C. Widmann, M. Borsotto, G. Gobbi, J.M. Vaugeois, G. Debonnel, and M. Lazdunski, Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9 (2006) 1134-41.
- [20] C. Hryhorczuk, S. Sharma, and S.E. Fulton, Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Neurosci* 7 (2013) 177.
- [21] C. Devader, A. Khayachi, J. Veyssiere, H. Moha Ou Maati, M. Roulot, S. Moreno, M. Borsotto, S. Martin, C. Heurteaux, and J. Mazella, In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant spadin. *Br J Pharmacol* 172 (2015) 2604-17.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1:** Correlation between the concentration of produced PE and sortilin expression during the differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes.

(A) Quantitative mRNA expression of sortilin as a function of adipocytes differentiation, determined after normalization using  $\beta$ -Actin, Gapdh and Tbp expression. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of fold increase compared to undifferentiated cells (day 0) (n=4, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). (B) Quantification of sortilin (black line) and PE (red line) expression determined using Western blot analyses and AlphaScreen, respectively (upper curves). Representative immunoblots for sortilin are shown under the curves. Sortilin protein levels were normalized using total Erk2 (tErk) antibodies and expressed as mean  $\pm$  SEM of fold stimulation compared to undifferentiated cells (day 0) (n=5, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). (C) Co-localization of Glut4, sortilin, and PE with VAMP2 in 3T3-L1 adipocytes. Confocal images of 3T3-L1 adipocytes labelled with antibodies directed against either sortilin or Glut4 or PE and with anti-VAMP2 antibodies as described in Methods. The merged images were shown in right panels. Arrows indicated the colocalization of VAMP2 with both proteins and PE in the Golgi apparatus (white arrows) and plasma membrane (blue arrows).

**FIGURE 2:** TNF $\alpha$ , but not dexamethasone, inhibits sortilin expression in 3T3-L1 adipocytes.

(A) Quantification of sortilin protein expression in 3T3-L1 adipocytes incubated in the absence (-) or in the presence (+) of TNF $\alpha$  (20ng/mL) for 24, 48 and 72h, determined using Western blot analyses (upper curves). Representative immunoblots for sortilin is shown under the curves. Sortilin protein level was normalized using  $\beta$ -Actin and expressed as mean  $\pm$  SEM of fold stimulation compared to untreated cells (TNF $\alpha$  (-)) (n=5, \*p<0.05; \*\*p<0.01). (B) Bars show the concentration of produced PE in 3T3-L1 adipocytes after a treatment with TNF $\alpha$  (+) or not (-) during 24, 48 or 72h (n=5, \*p<0.05). (C) Bars show the fold increase in insulin-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with TNF $\alpha$  (20ng/mL) during 48 and 72h, compared to unstimulated cells (TNF $\alpha$  (-) and insulin (-)) (n=7, \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001). (D) Quantification of sortilin protein expression in 3T3-L1 adipocytes incubated in the absence (-) or in the presence (+) of dexamethasone (Dex., 1 $\mu$ M) for 24, 48 and 72h, determined using Western blot analyses (upper curves). Representative immunoblots for sortilin are shown under the curves. Sortilin protein level was normalized using  $\beta$ -Actin and expressed as mean  $\pm$  SEM of fold stimulation compared to untreated cells (Dex. (-)) (n=6). (E) Bars show the concentration



of produced PE in 3T3-L1 adipocytes after a treatment with dexamethasone (+) or not (-) during 24, 48 or 72h (n=6). (F) Bars show the fold increase in insulin-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with dexamethasone (0.1 or 1 $\mu$ M) during 24h compared to unstimulated cells (dexamethasone (-) and insulin (-)) (n=7, \*p<0.05; \*\*\*\*p<0.0001).

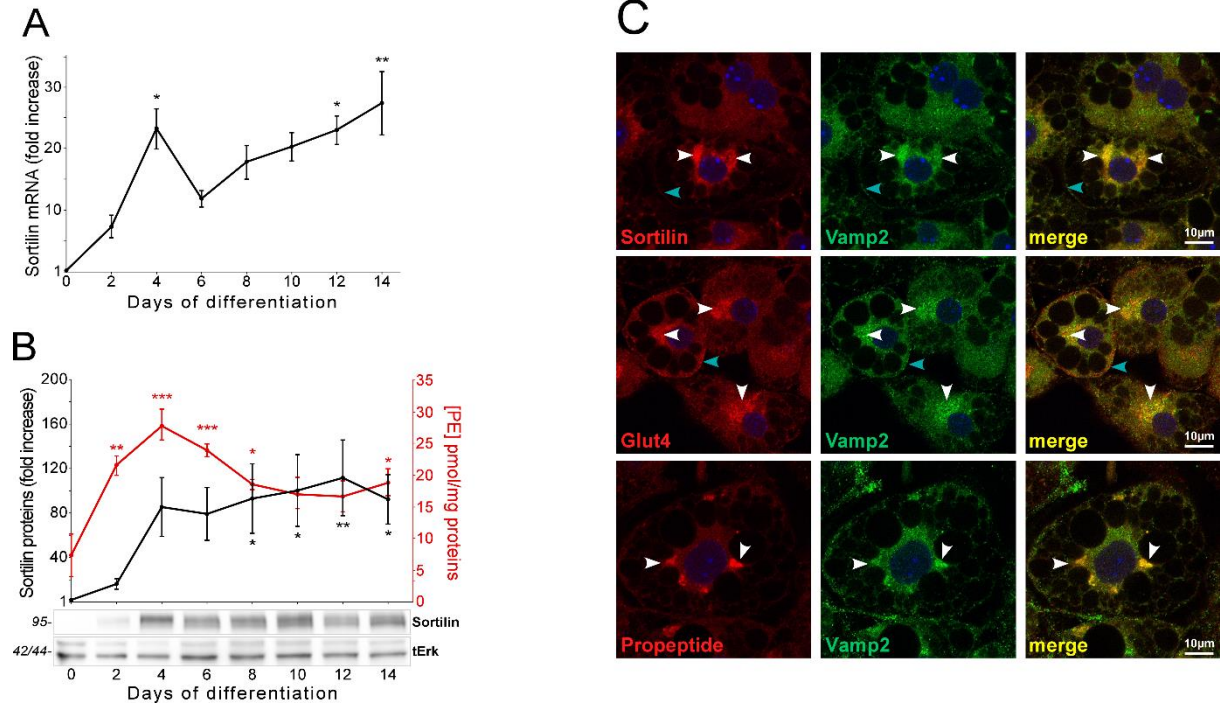
**FIGURE 3:** Insulin does not induce a release of PE and spadin does not stimulate glucose uptake, in 3T3-L1 adipocytes.

(A) Bars show the concentration of released PE by 3T3-L1 adipocytes after stimulation with insulin (0, 1, 10 and 100nM) during 30 and 60min. The PE concentration was normalized as the ratio of PE/total protein. (n=6-7). (B) Shown are the glucose uptake kinetics in 3T3-L1 adipocytes subjected to a treatment with insulin (10nM, full black squares), spadin (10nM, full red squares) or both (full red circles) using radioactivity assay (n=2-4). (C) Bars show the fold change in glucose uptake compared to time 0. 3T3-L1 adipocytes were analysed for the steady state glucose uptake, after insulin (10nM, black bars) or spadin (10nM, grey bars) treatment using radioactivity assay (n=7, \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001).

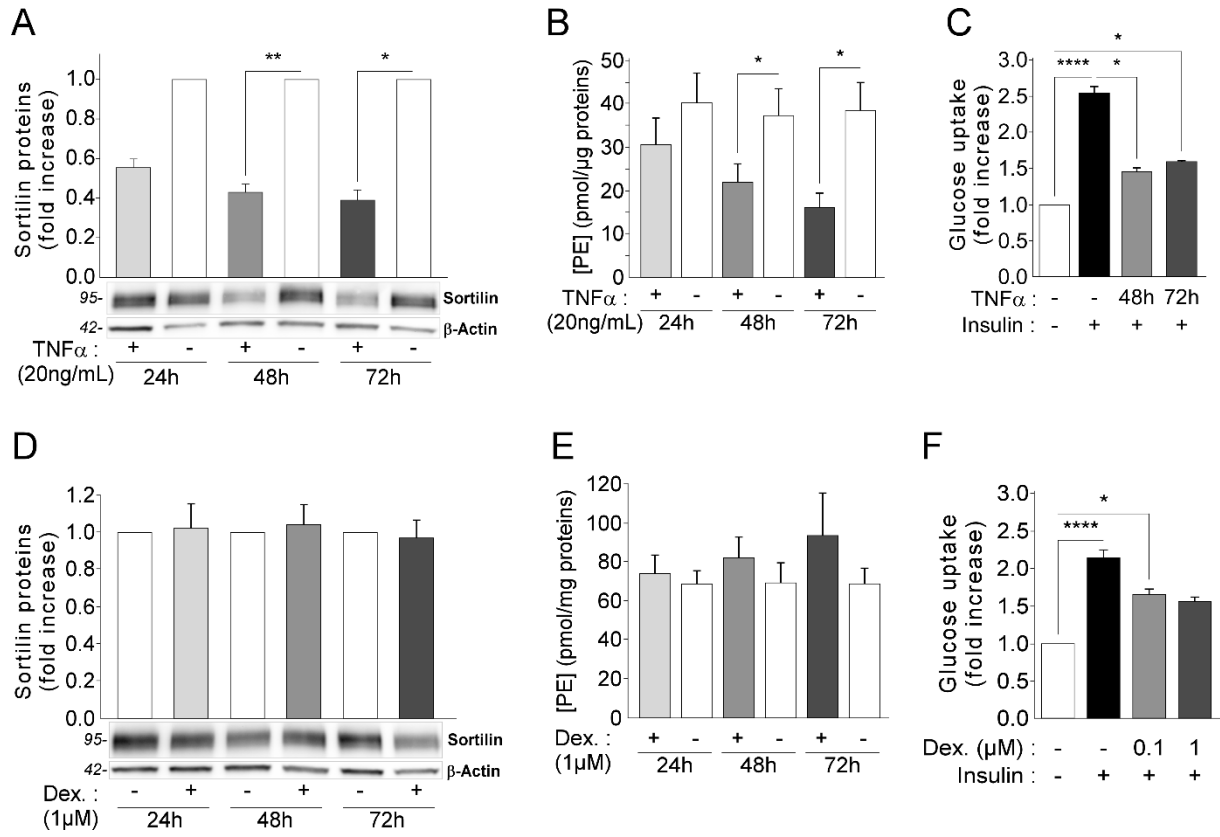
**FIGURE 4:** Akt, Erk and Ampk signalling pathways are not activated by spadin.

Bars show the fold of increase for pAkt (A), pErk (B) and pAmpk (C) after incubation with insulin (10nM, black bars) or spadin (10nM, grey bars) during 2, 5, 15, 30 and 60min before lysis. Each experiment was normalized using total Erk2 (tERK) as control. The values were then compared with those of the time 0 (n =5-6, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001).

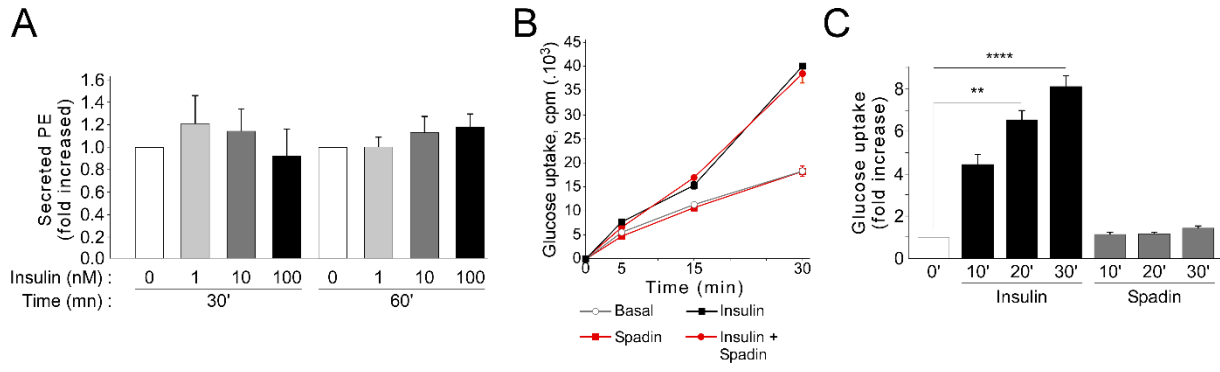
**Figure 1:**



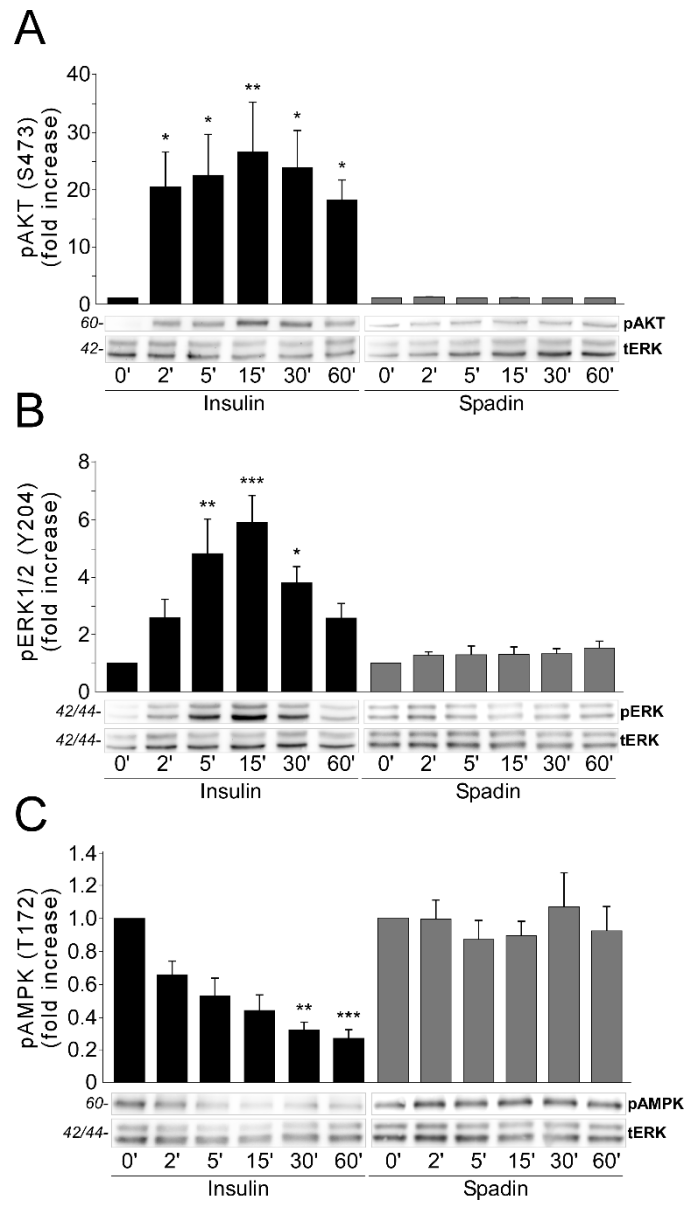
**Figure 2:**



**Figure 3:**



**Figure 4:**



## Discussion

Cette étude met en évidence le lien direct entre l'expression de la sortiline et la production de PE, son produit de maturation (*figures 1 et 2 de l'article*). En revanche, les mécanismes de libération de PE par les adipocytes matures n'ont pas pu être caractérisés (*figure 3A de l'article*). De plus, la spadine, l'analogue synthétique du PE aux propriétés antidépressives, n'a pas d'effet sur le stockage de glucose (*figure 3B-C de l'article*). Ces résultats, discutés dans la suite de cette partie, prennent toute leur importance dans un contexte de développement thérapeutique, que ce soit pour le traitement de la dépression (la spadine est en phase de développement préclinique pour ses propriétés antidépressives) ou le traitement du diabète de type 2 (voir l'article précédent).

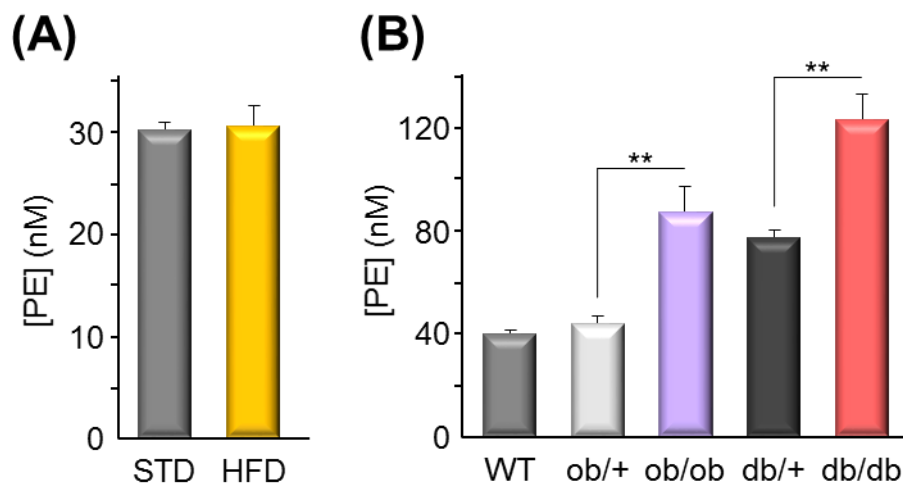
Pour confirmer l'existence d'une corrélation positive entre l'expression de la sortiline et la production de PE, les cellules 3T3-L1 ont été soumises à plusieurs traitements.

**Premièrement**, le processus de différenciation des fibroblastes 3T3-L1 en adipocytes est associé à une augmentation de l'expression de la sortiline, ce qui est confirmé par notre étude, qui montre également l'augmentation de la production de PE lors de l'adipogenèse (Morris et al., 1998).

**Deuxièmement**, les adipocytes 3T3-L1 ont été stimulés avec le dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse ayant des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. Dans les adipocytes, cette hormone altère la voie de signalisation induite par l'insuline, ce qui provoque une diminution de l'expression membranaire et de l'activité de Glut4, à l'origine d'une réduction de l'entrée de glucose dans les adipocytes (Buren et al., 2002; Garvey et al., 1989; Olefsky, 1975; Sakoda et al., 2000; van Putten et al., 1985). L'absence d'effet de cette hormone sur l'expression de la sortiline et la production de PE est en accord avec les données de la littérature : le dexaméthasone induit une insulino-résistance en réduisant le signal déclenché par l'insuline, ce qui altère le trafic de Glut4 vers la membrane plasmique, indépendamment de la fonction d'adressage de la sortiline.

**Troisièmement**, les adipocytes 3T3-L1 ont été stimulés avec la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$ , dont la concentration circulante est fortement augmentée chez des individus atteints d'obésité et de diabète (Hotamisligil et al., 1993; Jager et al., 2007; Rotter et al., 2003). Ces pathologies sont également associées à une réduction de l'expression de la sortiline dans le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique (Kaddai et al., 2009; Li et al., 2015). Ici, l'effet de

la cytokine sur l'expression de la sortiline est confirmé et associé à une diminution de la production de PE. Puisque l'inflammation périphérique associée à un état diabétique obèse modifie l'expression de la sortiline, qu'en est-il de la concentration circulante de PE dans ces conditions ? Des expériences préliminaires, réalisées au sein de l'équipe, ont permis de mesurer le niveau circulant de PE chez des souris sauvages soumises à un régime enrichi en gras pendant dix-neuf semaines (Figure 36A). Ces souris obèses ne présentent pas d'insulino-résistance et ont un niveau circulant de PE comparable à celui des souris sauvages du même âge (Figure 36A). La concentration de PE dans le sang de souris ob/ob, obèses et diabétiques, de souris db/db, seulement diabétiques, et de leurs contrôles respectifs (ob/+ et db/+) a également été quantifiée (Figure 36B). Les souris ob/ob et db/db ont un niveau de PE supérieur à celui de leur propre contrôle (un facteur 2 pour les souris ob/ob, un facteur 1,6 pour les souris db/db). Chez ces souris, plusieurs études montrent que l'expression de la sortiline dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc est réduite par rapport à leur contrôle et que la concentration circulante de TNF $\alpha$  est augmentée (Ai et al., 2012; Kaddai et al., 2009; Yamakawa et al., 1995). De plus, l'obésité ne semble pas être suffisante pour modifier la concentration circulante de PE (Figure 36A). Ce qui suggère que ces tissus (tissu adipeux blanc, foie, muscle squelettique) ne sont pas responsables de l'augmentation de PE dans la circulation périphérique.



**Figure 36 : Mesure de la concentration de PE en conditions physiopathologiques.**

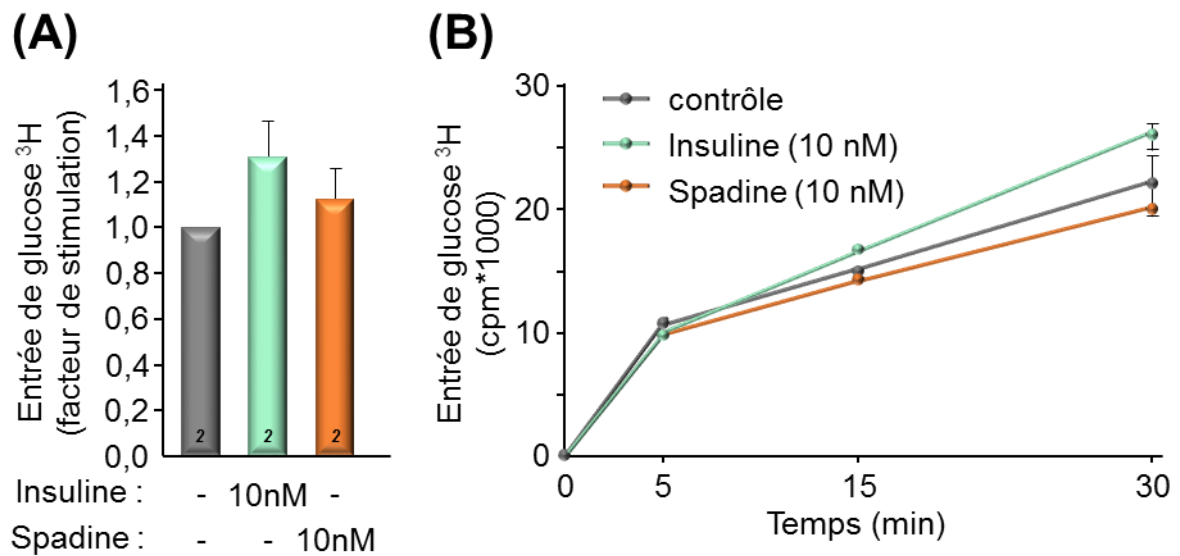
(A) Des souris sauvages sont soumises à un régime enrichi en gras (HFD, high fat diet) pendant dix-neuf semaines et comparées à des souris soumises à un régime standard (STD). (B) Le PE circulant est mesuré chez des souris sauvages (WT), obèses et diabétiques (ob/ob), et diabétiques (db/db), et comparés à leur contrôle respectif (ob/+, db/+). Test de Mann-Whitney, \*\*  $p < 0,01$ .

Bien qu'une fraction mineure de la sortiline soit présente à la membrane plasmique, certains peptides peuvent stimuler son expression à la surface cellulaire : c'est le cas de l'insuline dans les adipocytes 3T3-L1 et de la neurotensine dans les neurones embryonnaires (Chabry et al., 1993; Mazella et al., 1998; Morris et al., 1998). Ce qui suggère que toute molécule pouvant stimuler le transfert de la sortiline à la membrane plasmique pourrait également stimuler la libération du PE dans le milieu extracellulaire. Cependant, quelle que soit la dose d'insuline utilisée ou le temps de stimulation, la concentration de PE libérée par les adipocytes 3T3-L1 n'est pas modifiée. Compte tenu du protocole utilisé et optimisé (faible volume de culture lors de la stimulation, concentration des échantillons sur colonnes), les variations de la quantité de PE libéré sous l'effet de l'insuline ne sont pas détectables par notre système de quantification Alphascreen™. En effet, l'insuline stimule faiblement l'expression membranaire de la sortiline (par un facteur 1,7), contrairement à celles de Glut4 et d'IRAP (respectivement par un facteur 14 et 5) (Morris et al., 1998). De plus, les auteurs révèlent que 70% des vésicules contenant Glut4 expriment également la sortiline (Morris et al., 1998). Par ailleurs, parmi les vésicules transférées à la membrane plasmique sous l'effet de l'insuline, certaines sont des vésicules recyclées et ne contiennent plus le PE issu de la maturation de la sortiline. Ces informations peuvent donc expliquer pourquoi les variations de PE ne sont pas mesurables par notre système de mesure, en plus du fait que l'adipocyte n'est peut-être pas le modèle à privilégier. Dans ces conditions, il faut envisager d'identifier les sécrétagogues du PE sur l'animal entier, en injectant l'insuline, la neurotensine, ou une autre molécule susceptible de modifier l'expression membranaire de la sortiline. Cependant, ces expériences sont plus complexes puisqu'elles nécessitent de choisir l'état métabolique optimal (à jeun ou non, durée du jeun, type d'alimentation), les manipulations des souris (les injections et/ou les prélèvements) pouvant leur provoquer un stress capable de modifier la concentration circulante de PE.

Chez la souris, l'injection de spadine améliore la tolérance au glucose (article 1). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet effet : une augmentation de la sécrétion d'insuline (ce qui est suggéré dans le premier article), une augmentation du stockage de glucose dans les tissus insulino-sensibles, une diminution de l'absorption intestinale de glucose ou une augmentation de son élimination rénale. Ce deuxième article montre que la spadine n'a pas d'effet sur le stockage de glucose dans les adipocytes 3T3-L1. Des expériences



complémentaires non publiées ont également révélé l'absence d'effet de la spadine sur le modèle musculaire squelettique C2C12 (Figure 37).



**Figure 37 : La spadine ne stimule pas l'entrée de glucose dans les cellules musculaires squelettiques C2C12.**

(A) Les cellules musculaires squelettiques C2C12 sont incubées pendant une heure avec l'insuline (10 nM, en vert) ou la spadine (10 nM, en orange). A la fin de la période d'incubation, l'entrée de glucose est mesurée à l'équilibre par l'ajout de [<sup>3</sup>H] 2-deoxyglucose pendant deux minutes. La radioactivité mesurée à l'intérieur des cellules est normalisée par la quantité de protéines et comparée à la condition contrôle (cellules non stimulées) (n = 2). (B) Les cellules musculaires squelettiques C2C12 sont incubées pendant 5, 15 et 30 minutes avec l'insuline (10 nM, en vert) ou la spadine (10 nM, en orange), supplémentées en [<sup>3</sup>H] 2-deoxyglucose, afin d'analyser la cinétique d'incorporation de glucose radioactif (n = 1).

Bien que ces résultats illustrent **l'absence d'effet de la spadine sur les modèles d'adipocytes et de cellules musculaires squelettiques**, ils sont un atout pour ce peptide, qui, pris comme antidépresseur, n'aura pas de conséquence sur la gestion de la glycémie par les tissus insulino-sensibles.

# Discussion générale

---

Au cours de ces trois années de thèse, les mécanismes de production et de libération du PE issu de la maturation de la sortiline, ainsi que les effets de la spadine, un analogue synthétique du PE, sur l'homéostasie glucidique ont été étudiés. *In vitro*, l'expression de la sortiline dans différentes conditions physiopathologiques (adipogenèse, insulino-résistance et inflammation) est positivement corrélée à la production de PE. Les effets de la spadine sur la sécrétion d'insuline ainsi que son rôle potentiel dans le stockage de glucose par les cellules insulino-sensibles ont également été analysés. Les résultats principaux et soumis à publication sont les suivants :

- La production de PE est **positivement corrélée** à l'expression de la sortiline
- La spadine **améliore la tolérance au glucose** chez des souris sauvages et saines
- La spadine **potentialise la sécrétion d'insuline** induite par le KCl, probablement grâce à son action inhibitrice des courants TREK-1
- La spadine n'a **pas d'effet sur l'entrée de glucose** dans les deux modèles *in vitro* étudiés : les adipocytes (lignée cellulaire 3T3-L1) et les cellules musculaires squelettiques (lignée cellulaire C2C12).

La valorisation de ces résultats nécessite des études complémentaires pour la compréhension des fonctions physiologiques du PE. Par ailleurs, grâce à ses propriétés antidépressives, la spadine fait l'objet d'un brevet et est en phase préclinique en vue d'une commercialisation. Il est donc nécessaire d'identifier ses effets périphériques.

## Partie 1 : Les origines et les fonctions du PE

Le PE est présent dans le sang chez les rongeurs et chez l'Homme. Il est quantifiable et varie dans certaines conditions : sa concentration plasmatique augmente chez les souris obèses et diabétiques, et diminue chez les individus atteints de dépression. Deux questions peuvent alors se poser :

1. D'où vient-il (un ou plusieurs tissus) ?
2. Quel est son rôle (fonction physiologique ou marqueur de pathologie) ? Peut-on moduler sa concentration circulante ?

**Premièrement**, le ou les tissu(s) source(s) de PE expriment la sortiline, tels que le système nerveux central, la moelle épinière, le muscle squelettique, les testicules, le cœur, le placenta, le pancréas, la prostate, le foie, le tissu adipeux blanc et le petit intestin (Hermans-Borgmeyer et al., 1999; Morris et al., 1998; Petersen et al., 1997). Chez des modèles de souris obèses et diabétiques, la concentration circulante de PE est plus élevée que chez leur contrôle alors que les données de la littérature montrent une réduction de l'expression de la sortiline dans les tissus insulino-sensibles (muscle squelettique, tissu adipeux blanc, foie) (Kaddai et al., 2009; Li et al., 2015). Ce qui suggère que ces tissus ne sont pas la source de PE circulant. Dans le cas de la dépression, des résultats de l'équipe (non publiés) ont mis en évidence une diminution de la concentration plasmatique de PE alors que les données de la littérature montrent une augmentation de l'expression de la sortiline dans le sérum (forme soluble) et dans les lymphocytes (forme membranaire) chez des individus dépressifs (Buttenschon et al., 2015; Zhou et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la sortiline soluble puisse interagir avec le PE mais ne donne pas d'informations supplémentaires quant à l'origine tissulaire du PE circulant.

**Deuxièmement**, les variations de la concentration plasmatique de PE semblent spécifiques de la pathologie étudiée. En effet, des souris diabétiques et obèses présentent une élévation de la concentration plasmatique de PE, par rapport à leur contrôle. Inversement, des individus atteints de dépression présentent une réduction du niveau circulant de PE, qui augmente lorsque ces patients répondent efficacement aux traitements antidépresseurs. **Le PE pourrait être un marqueur de ces pathologies, voire de leur rémission, les variations plasmatiques étant spécifiques de ces deux maladies.** Il serait alors intéressant de mesurer la concentration circulante de PE au cours du développement du diabète et de l'obésité, chez des souris soumises ou non aux traitements actuels du diabète de type 2 tels que la metformine et l'exendine-4, et de confirmer ces résultats avec des études menées chez l'Homme.

## Partie 2 : La spadine, un nouveau médicament ?

### I/ Les effets de la spadine

D'après les résultats obtenus, la spadine n'a d'effet que si les cellules expriment le canal TREK-1 (Figure 38). C'est le cas des neurones et des cellules  $\beta$  du pancréas (Devader et al., 2015; Mazella et al., 2010) (article 1 de ce mémoire). A l'inverse, la spadine n'a pas d'effet sur les tissus insulino-sensibles qui n'expriment que la sortiline (article 2 de ce mémoire). Par ailleurs, aucune voie de signalisation activée directement par la sortiline n'a été mise en évidence. Bien qu'il reste à le démontrer, ces informations suggèrent que les effets de la spadine sont médiés par le canal TREK-1 et/ou un autre récepteur non identifié. De plus, chez la souris, la spadine améliore la tolérance en glucose (article 1 de ce mémoire). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine du contrôle de la clairance du glucose. L'équipe a pu montrer que la spadine stimule la sécrétion d'insuline, comme les hormones incrétines, et qu'elle n'a pas d'effet sur le stockage de glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (Figure 38). Il reste donc à étudier les effets de la spadine sur les tissus exprimant le canal TREK-1 et/ou la sortiline et capables d'utiliser le glucose sanguin.

**L'intestin** est le siège de l'absorption des nutriments, grâce à des cellules très spécialisées, les entérocytes. Aucune étude ne met en évidence l'expression du canal TREK-1 ou de la sortiline dans ces cellules. En revanche, ces deux protéines sont présentes dans les cellules musculaires lisses du colon qui participent au péristaltisme intestinal, c'est-à-dire à l'ensemble des contractions de la paroi intestinale permettant la progression du bol alimentaire à travers le tractus gastro-intestinal (Azriel et al., 2010; Koh et al., 2001) (Figure 38). Bien que la fonction de la sortiline dans ces cellules est encore inconnue, celle du canal TREK-1 a été un peu étudiée. Une première étude, réalisée sur des cellules COS-7 transfectées avec le canal TREK-1, a montré que les molécules capables de moduler les potentiels de jonctions inhibiteurs des cellules musculaires lisses du colon peuvent également réguler l'activité du canal (Hwang et al., 2008). Les auteurs ont conclu de façon indirecte que le canal TREK-1 est impliqué dans la régulation des potentiels de jonctions inhibiteurs des cellules musculaires lisses du colon. Cependant, cette étude a été contredite par la suite par deux publications réalisées chez la souris et le rat, dans lesquelles le canal n'a pas d'effet sur les potentiels des cellules musculaires lisses du colon (Gil et al., 2012; Zhang et al., 2010). Ces

dernières études suggèrent que le canal TREK-1 participe au contrôle du péristaltisme du tractus gastro-intestinal, bien que le mécanisme précis ne soit pas encore identifié.

**Le rein** joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie, que ce soit en période post-absorptive ou en période postprandiale. C'est un organe de production de glucose (par néoglucogénèse), d'utilisation du glucose (pour les besoins énergétiques de la médulla) et de réabsorption du glucose filtré (tant que la glycémie est inférieure à 1,8 g/L). Chez les personnes atteintes de diabète de type 2, la production, l'utilisation et la réabsorption du glucose sont augmentées, ce qui aggrave l'hyperglycémie. Le principal transporteur de glucose SGLT2 est surexprimé et le seuil de réabsorption passe de 1,8 à 2,2 g/L. Pour pallier ces problèmes rénaux, l'utilisation des inhibiteurs des SGLT2 inverse la tendance. Le canal TREK-1 et la sortiline sont exprimés dans les reins (Medhurst et al., 2001; Petersen et al., 1997) (Figure 38). Plus précisément, la sortiline est exprimée dans les podocytes humains, majoritairement dans le compartiment intracellulaire, où elle contribue à l'adressage vers le compartiment lysosomal de l' $\alpha$ -galactosidase A, une enzyme impliquée dans le métabolisme rénal du glucose (Prabakaran et al., 2011; Prabakaran et al., 2012). Dans le rein, la fonction majeure de la sortiline est de participer au trafic de protéines, ce qui semble réduire les effets hypothétiques de la spadine.

**Le foie** participe également à l'homéostasie glucidique. C'est un organe de production de glucose (gluconéogénèse), de stockage de glucose sous forme de glycogène après un repas (glycogénogénèse) et de déstockage de glucose entre les repas (glycogénolyse). Jusqu'à présent, seule l'expression de la sortiline a été mise en évidence (Petersen et al., 1997) (Figure 38). Comme dans les reins, la sortiline est impliquée dans l'adressage des protéines vers le lysosome et semble faiblement impliquer le métabolisme hépatique des lipides (Chamberlain et al., 2013; Rabinowich et al., 2015; Strong et al., 2012).

L'intestin, les reins et le foie sont trois organes qui contrôlent de près ou de loin la glycémie et expriment le canal TREK-1 et/ou la sortiline (Figure 38). Jusqu'à présent, tous les effets observés de la spadine sont médiés par le canal TREK-1 (Figure 38). Cependant, on ne peut exclure un rôle de la sortiline, en association avec un ou plusieurs partenaires, dans les effets physiologiques de la spadine.

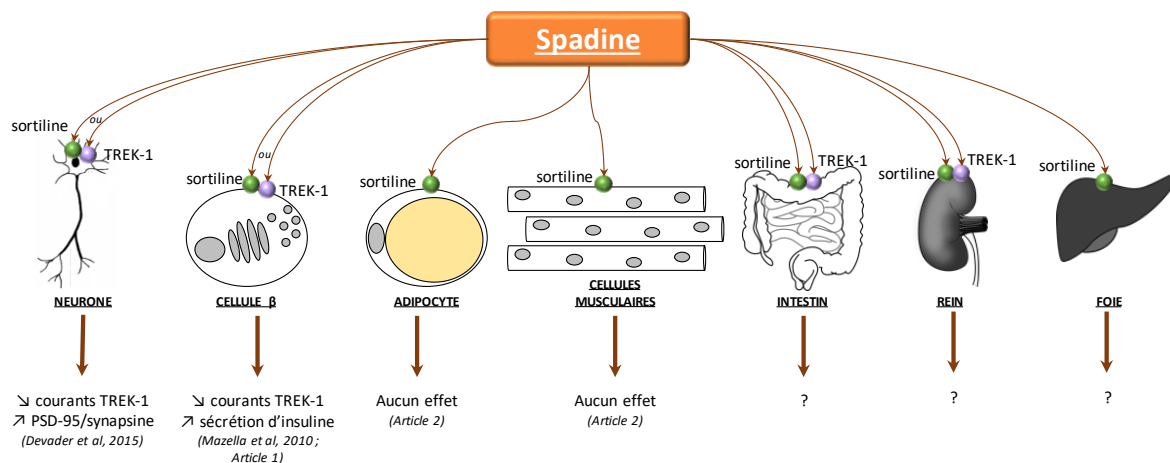


Figure 38 : Les effets connus et hypothétiques de la spadine.

## II/ La spadine, un nouveau traitement du diabète de type 2 ?

Les traitements du diabète de type 2 sont multiples mais présentent de nombreux effets secondaires indésirables (ex : troubles intestinaux, hypoglycémie, diffusion dans le lait maternel, ...). Ces effets désagréables pour le patient, associés à l'expansion rapide du diabète et de l'obésité au sein de la population, nécessitent le développement de nouveaux traitements, plus efficaces et moins gênants. Les derniers produits en cours de développement clinique sont les inhibiteurs de SGLT2 (transporteur rénale de glucose). Ils bloquent la réabsorption rénale de glucose, ce qui favorise son élimination dans les urines. Les conséquences de ce type de traitement sont une glycosurie associée à une augmentation du volume urinaire. Cependant, quelques effets secondaires indésirables ont été mis en évidence : les risques d'hypotensions orthostatiques et d'infections urinaires, ainsi qu'une élévation modérée de la concentration plasmatique en LDL et cholestérol.

Si la spadine est capable de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose, alors elle peut devenir un atout majeur pour traiter le diabète de type 2 et/ou limiter son développement. Ceci nécessite quelques années de recherche fondamentale, pour confirmer l'action de la spadine sur le pancréas et montrer l'absence d'effet secondaire néfaste pour le patient. Il faudra également tester les effets de la spadine sur des modèles de souris et de rats diabétiques et obèses, quand la pathologie est déclarée ou bien au cours de son développement.

# Conclusion

---

Ce travail de thèse s'intéresse à deux aspects biologiques, **la sécrétion d'insuline** par le pancréas et **le stockage de glucose** par les tissus insulino-sensibles. Les objectifs de ce travail ont donc été d'identifier les mécanismes de production et de libération du PE par les tissus insulino-sensibles et de comprendre les fonctions physiologiques de son analogue synthétique, la spadine.

A l'aide du modèle adipocytaire 3T3-L1, nous avons montré que **l'expression de la sortiline est corrélée positivement à la production de PE** au cours de l'adipogenèse et en conditions d'inflammation induite par le TNF $\alpha$ . Chez les souris diabétiques et obèses (modèles génétiques ob/ob et db/db), **la concentration plasmatique de PE est deux fois supérieure** à celle de leur contrôle. Des résultats obtenus par l'équipe montrent que **des patients atteints de dépression ont un niveau circulant de PE plus faible** que la moyenne, et que ce niveau revient à la normale lors de la rémission de la pathologie. A la lumière de ces informations, nous pouvons faire l'hypothèse que **le PE pourrait être un marqueur spécifique d'un état dépressif et/ou diabétique obèse.**

*In vivo*, chez la souris, **l'injection de spadine améliore la tolérance au glucose**. *In vitro*, ce petit peptide, analogue synthétique du PE, **potentialise la sécrétion d'insuline** induite par le KCl (sur la lignée  $\beta$  pancréatique Min6), mais est **sans effet sur le stockage de glucose** par les adipocytes 3T3-L1 et les cellules musculaires squelettiques C2C12. En plus de ses propriétés antidépressives, **la spadine pourrait être un nouveau traitement du diabète de type 2**, aux effets similaires des analogues du GLP-1, mais sans les effets secondaires indésirables des thérapeutiques actuelles, ce qui présente un intérêt pharmaceutique majeur.

# Perspectives

---

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence que la concentration circulante de PE varie en fonction de l'état physiopathologique de l'individu. Chez l'Homme, la dépression induit une diminution du niveau circulant de PE, l'efficacité de son traitement permettant un retour vers un niveau moyen basal. Chez des modèles de souris diabétiques et/ou obèses, le niveau de PE est multiplié par deux par rapport aux individus contrôles. La présence du PE dans le sang, ainsi que les variations de sa concentration circulante, ne sont pas anodines et nécessitent d'en comprendre les causes et les conséquences. L'importance de ces résultats nécessite donc de nombreux travaux pour :

- **Identifier le ou les type(s) cellulaire(s) à l'origine du PE circulant.** Pour cela, on pourra utiliser plusieurs modèles murins chez lesquels la concentration sérique de PE varie (certains sont déjà connus, comme les souris ob/ob et db/db) et quantifier l'expression protéique de la sortiline dans les tissus qui l'expriment.
- **Identifier les causes moléculaires** à l'origine des variations de la concentration circulante de PE. Que cela concerne la dépression ou les pathologies métaboliques, il est nécessaire de déterminer le mécanisme moléculaire qui engendre la modification de PE circulant et de l'expression de la sortiline (modification de l'expression génique, altération de sa maturation et/ou de son adressage)
- **Déterminer si, chez l'Homme, le PE est un marqueur** d'une ou de plusieurs pathologies, et identifier sa nature (prédictif, de rémission)

Mes travaux de thèse ont également permis d'étudier les effets de la spadine, l'analogue synthétique du PE, sur la sécrétion d'insuline du pancréas et le stockage de glucose dans les tissus insulino-sensibles. Nous avons mis en évidence que, chez la souris, la spadine améliore la tolérance au glucose, effet qui semble s'expliquer par une augmentation de l'insuline libérée par le pancréas. Nous avons également montré l'absence d'effet de la spadine sur le stockage de glucose dans le muscle squelettique et les adipocytes. La spadine étant en phase de développement préclinique pour ses propriétés antidépressives, l'ensemble de ces résultats doivent être approfondis et élargis pour :



- **Déterminer les effets exacts de la spadine sur le pancréas.** Pour cela, il est nécessaire d'identifier le rôle de ce peptide sur la **sécrétion d'insuline induite par le glucose** et les **mécanismes moléculaires** qui en découlent. Il est également important de caractériser les effets de la spadine sur l'ensemble des **hormones pancréatiques** (glucagon, somatostatine).
- **Identifier les autres cibles de la spadine** pouvant participer à la régulation de la glycémie (intestin, foie, reins)
- **Déterminer si la spadine est un nouveau traitement** du diabète de type 2.

# Références

---

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. I., Kahn, B. B., 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-733.
- Adnitt, P. I., Frayn, K. N., Turner, P., 1973. Effects of metformin on glucose uptake by isolated human skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 47, 617P-618P.
- Ahn, M. Y., Katsanakis, K. D., Bheda, F., Pillay, T. S., 2004. Primary and essential role of the adaptor protein APS for recruitment of both c-Cbl and its associated protein CAP in insulin signaling. *J Biol Chem* 279, 21526-21532.
- Ai, D., Baez, J. M., Jiang, H., Conlon, D. M., Hernandez-Ono, A., Frank-Kamenetsky, M., Milstein, S., Fitzgerald, K., Murphy, A. J., Woo, C. W., Strong, A., Ginsberg, H. N., Tabas, I., Rader, D. J., Tall, A. R., 2012. Activation of ER stress and mTORC1 suppresses hepatic sortilin-1 levels in obese mice. *J Clin Invest* 122, 1677-1687.
- Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., Bownes, M., 1997. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-789.
- Aller, M. I., Wisden, W., 2008. Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* 151, 1154-1172.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noel, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A., Lazdunski, M., 2006. TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25, 2368-2376.
- Ammala, C., Bokvist, K., Galt, S., Rorsman, P., 1991. Inhibition of ATP-regulated K<sup>(+)</sup>-channels by a photoactivatable ATP-analogue in mouse pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta* 1092, 347-349.
- Andersson, C. H., Hansson, O., Minthon, L., Andreasen, N., Blennow, K., Zetterberg, H., Skoog, I., Wallin, A., Nilsson, S., Kettunen, P., 2016. A Genetic Variant of the Sortilin 1 Gene is Associated with Reduced Risk of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*.
- Andersson, S., Chang, D., Folkers, K., Rossell, S., 1976. Inhibition of gastric acid secretion in dogs by neurotensin. *Life Sci*. 19, 367-370.
- Ariga, M., Nedachi, T., Katagiri, H., Kanzaki, M., 2008. Functional role of sortilin in myogenesis and development of insulin-responsive glucose transport system in C2C12 myocytes. *J Biol Chem* 283, 10208-10220.
- Arkhammar, P., Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Welsh, M., Nanberg, E., Sjöholm, A., Kohler, M., Berggren, P. O., 1994. Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 269, 2743-2749.
- Ashcroft, S. J., Randle, P. J., 1970. Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem J* 119, 5-15.
- Azriel, Y., Liu, L., Burcher, E., 2010. Complex actions of neurotensin in ascending and sigmoid colonic muscle: Involvement of enteric mediators. *Eur J Pharmacol* 644, 195-202.
- Bang, H., Kim, Y., Kim, D., 2000. TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J Biol Chem* 275, 17412-17419.

- Basabe, J. C., Farina, J. M., Chieri, R. A., 1976. Studies on the dynamics and mechanism of glibenclamide-induced insulin secretion. *Horm Metab Res* 8, 413-419.
- Baukowitz, T., Schulte, U., Oliver, D., Herlitz, S., Krauter, T., Tucker, S. J., Ruppertsberg, J. P., Fakler, B., 1998. PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* 282, 1141-1144.
- Bell, G. I., Santerre, R. F., Mullenbach, G. T., 1983. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302, 716-718.
- Belzeaux, R., Formisano-Treziny, C., Loundou, A., Boyer, L., Gabert, J., Samuelian, J. C., Feron, F., Naudin, J., Ibrahim, E. C., 2010. Clinical variations modulate patterns of gene expression and define blood biomarkers in major depression. *J Psychiatr Res* 44, 1205-1213.
- Beraud-Dufour, S., Coppola, T., Massa, F., Mazella, J., 2009. Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2398-2402.
- Berthet, J., Jacques, P., Hers, H. G., De Duve, C., 1956. Influence de l'insuline et du glucagon sur la synthèse de glycogène hépatique. *Biochim Biophys Acta* 20, 190-200.
- Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., Bell, G. I., 1993. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J Biol Chem* 268, 11356-11363.
- Bogan, J. S., Hendon, N., McKee, A. E., Tsao, T. S., Lodish, H. F., 2003. Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* 425, 727-733.
- Bogan, J. S., Kandror, K. V., 2010. Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Curr Opin Cell Biol* 22, 506-512.
- Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A., Doniach, D., 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279-1283.
- Brown, M., Vale, W., 1976. Effects of neurotensin and substance P on plasma insulin, glucagon and glucose levels. *Endocrinology* 98, 819-822.
- Buren, J., Liu, H. X., Jensen, J., Eriksson, J. W., 2002. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur J Endocrinol* 146, 419-429.
- Buttenschon, H. N., Demontis, D., Kaas, M., Elfving, B., Molgaard, S., Gustafsen, C., Kaerlev, L., Petersen, C. M., Borglum, A. D., Mors, O., Glerup, S., 2015. Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF. *Transl Psychiatry* 5, e677.
- Cain, C. C., Trimble, W. S., Lienhard, G. E., 1992. Members of the VAMP family of synaptic vesicle proteins are components of glucose transporter-containing vesicles from rat adipocytes. *J Biol Chem* 267, 11681-11684.
- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., Morales, C. R., 2008. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 292-297.
- Carlo, A. S., Gustafsen, C., Mastrobuoni, G., Nielsen, M. S., Burgert, T., Hartl, D., Rohe, M., Nykjaer, A., Herz, J., Heeren, J., Kempa, S., Petersen, C. M., Willnow, T. E., 2013. The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid-beta peptide in the brain. *J Neurosci* 33, 358-370.
- Carraway, R., Leeman, S. E., 1973. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248, 6854-6861.

- Cartier, E. A., Conti, L. R., Vandenberg, C. A., Shyng, S. L., 2001. Defective trafficking and function of KATP channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2882-2887.
- Castagliuolo, I., Wang, C. C., Valenick, L., Pasha, A., Nikulasson, S., Carraway, R. E., Pothoulakis, C., 1999. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest* 103, 843-849.
- Chabry, J., Gaudriault, G., Vincent, J. P., Mazella, J., 1993. Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J Biol Chem* 268, 17138-17144.
- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P., Caput, D., 1996. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 386, 91-94.
- Chamberlain, J. M., O'Dell, C., Sparks, C. E., Sparks, J. D., 2013. Insulin suppression of apolipoprotein B in McArdle RH7777 cells involves increased sortilin 1 interaction and lysosomal targeting. *Biochem Biophys Res Commun* 430, 66-71.
- Charron, M. J., Brosius, F. C., 3rd, Alper, S. L., Lodish, H. F., 1989. A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2535-2539.
- Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., Lazdunski, M., 2003. Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K<sup>+</sup> channels. *EMBO J* 22, 5403-5411.
- Chemin, J., Patel, A. J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., Honore, E., 2005. A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *EMBO J* 24, 44-53.
- Chen, C., Wang, L., Rong, X., Wang, W., Wang, X., 2015. Effects of fluoxetine on protein expression of potassium ion channels in the brain of chronic mild stress rats. *Acta Pharm Sin B* 5, 55-61.
- Chen, L. W., Yung, K. K., Chan, Y. S., Shum, D. K., Bolam, J. P., 2008. The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7, 512-523.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A., Yu, L., 1993. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44, 8-12.
- Chen, Y., Yu, L., 1994. Differential regulation by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C of the mu opioid receptor coupling to a G protein-activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 269, 7839-7842.
- Chiang, S. H., Baumann, C. A., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Watson, R. T., Neudauer, C. L., Macara, I. G., Pessin, J. E., Saltiel, A. R., 2001. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410, 944-948.
- Cho, Y. S., Chen, C. H., Hu, C., Long, J., Ong, R. T., Sim, X., Takeuchi, F., Wu, Y., Go, M. J., Yamauchi, T., Chang, Y. C., Kwak, S. H., Ma, R. C., Yamamoto, K., Adair, L. S., Aung, T., Cai, Q., Chang, L. C., Chen, Y. T., Gao, Y., Hu, F. B., Kim, H. L., Kim, S., Kim, Y. J., Lee, J. J., Lee, N. R., Li, Y., Liu, J. J., Lu, W., Nakamura, J., Nakashima, E., Ng, D. P., Tay, W. T., Tsai, F. J., Wong, T. Y., Yokota, M., Zheng, W., Zhang, R., Wang, C., So, W. Y., Ohnaka, K., Ikegami, H., Hara, K., Cho, Y. M., Cho, N. H., Chang, T. J., Bao, Y., Hedman, A. K., Morris, A. P., McCarthy, M. I., Takayanagi, R., Park, K. S., Jia, W., Chuang, L. M., Chan, J. C., Maeda, S., Kadowaki, T., Lee, J. Y., Wu, J. Y., Teo, Y. Y., Tai, E. S., Shu, X. O., Mohlke, K. L.,

- Kato, N., Han, B. G., Seielstad, M., 2012. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nat Genet* 44, 67-72.
- Christy, R. J., Yang, V. W., Ntambi, J. M., Geiman, D. E., Landschulz, W. H., Friedman, A. D., Nakabeppu, Y., Kelly, T. J., Lane, M. D., 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes. *Genes Dev* 3, 1323-1335.
- Clement, J. P. t., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., 1997. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 18, 827-838.
- Cohen, A., Ben-Abu, Y., Hen, S., Zilberberg, N., 2008. A novel mechanism for human K2P2.1 channel gating. Facilitation of C-type gating by protonation of extracellular histidine residues. *J Biol Chem* 283, 19448-19455.
- Congiu, C., Minelli, A., Bonvicini, C., Bortolomasi, M., Sartori, R., Maj, C., Scassellati, C., Maina, G., Trabucchi, L., Segala, M., Gennarelli, M., 2015. The role of the potassium channel gene KCNK2 in major depressive disorder. *Psychiatry Res* 225, 489-492.
- Cook, D. L., Hales, C. N., 1984. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311, 271-273.
- Coppola, T., Beraud-Dufour, S., Antoine, A., Vincent, J. P., Mazella, J., 2008. Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2296-2302.
- Corin, R. E., Donner, D. B., 1982. Insulin receptors convert to a higher affinity state subsequent to hormone binding. A two-state model for the insulin receptor. *J Biol Chem* 257, 104-110.
- Curry, D. L., Bennett, L. L., Grodsky, G. M., 1968. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83, 572-584.
- Dadi, P. K., Vierra, N. C., Jacobson, D. A., 2014. Pancreatic beta-cell-specific ablation of TASK-1 channels augments glucose-stimulated calcium entry and insulin secretion, improving glucose tolerance. *Endocrinology* 155, 3757-3768.
- Dalle, S., Fontes, G., Lajoix, A. D., LeBrigand, L., Gross, R., Ribes, G., Dufour, M., Barry, L., LeNguyen, D., Bataille, D., 2002. Miniglucagon (glucagon 19-29): a novel regulator of the pancreatic islet physiology. *Diabetes* 51, 406-412.
- Dalle, S., Smith, P., Blache, P., Le-Nguyen, D., Le Brigand, L., Bergeron, F., Ashcroft, F. M., Bataille, D., 1999. Miniglucagon (glucagon 19-29), a potent and efficient inhibitor of secretagogue-induced insulin release through a Ca<sup>2+</sup> pathway. *J Biol Chem* 274, 10869-10876.
- Danforth, W. H., 1965. Glycogen Synthetase Activity in Skeletal Muscle. Interconversion of Two Forms and Control of Glycogen Synthesis. *J Biol Chem* 240, 588-593.
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., Schuit, F., 1995. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 96, 2489-2495.
- Dean, P. M., 1973. Ultrastructural morphometry of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetologia* 9, 115-119.
- Devader, C., Khayachi, A., Veyssiere, J., Moha Ou Maati, H., Roulot, M., Moreno, S., Borsotto, M., Martin, S., Heurteaux, C., Mazella, J., 2015. In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant spadin. *Br J Pharmacol* 172, 2604-2617.
- Devilliers, M., Busserolles, J., Lolignier, S., Deval, E., Pereira, V., Alloui, A., Christin, M., Mazet, B., Delmas, P., Noel, J., Lazdunski, M., Eschalier, A., 2013. Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat Commun* 4, 2941.

- Dhungel, N., Eleuteri, S., Li, L. B., Kramer, N. J., Chartron, J. W., Spencer, B., Kosberg, K., Fields, J. A., Stafa, K., Adame, A., Lashuel, H., Frydman, J., Shen, K., Masliah, E., Gitler, A. D., 2015. Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on alpha-synuclein. *Neuron* 85, 76-87.
- Dillon, J. S., Tanizawa, Y., Wheeler, M. B., Leng, X. H., Ligon, B. B., Rabin, D. U., Yoo-Warren, H., Permutt, M. A., Boyd, A. E., 3rd, 1993. Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology* 133, 1907-1910.
- Dolais-Kitabgi, J., Kitabgi, P., Brazeau, P., Freychet, P., 1979. Effect of neurotensin on insulin, glucagon, and somatostatin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 105, 256-260.
- Dorschner, H., Brekardin, E., Uhde, I., Schwanstecher, C., Schwanstecher, M., 1999. Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* 55, 1060-1066.
- Du, B., Liu, S., Cui, C., Wang, S., Cui, W., 2013. Association between glucose transporter 1 rs841853 polymorphism and type 2 diabetes mellitus risk may be population specific (1rs8418532). *J Diabetes* 5, 291-299.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 1997. TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 16, 5464-5471.
- Duprat, F., Lesage, F., Patel, A. J., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M., 2000. The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* 57, 906-912.
- Dupre, J., Ross, S. A., Watson, D., Brown, J. C., 1973. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 37, 826-828.
- Eckert, M., Egenberger, B., Doring, F., Wischmeyer, E., 2011. TREK-1 isoforms generated by alternative translation initiation display different susceptibility to the antidepressant fluoxetine. *Neuropharmacology* 61, 918-923.
- Findlay, I., Dunne, M. J., Petersen, O. H., 1985. High-conductance K<sup>+</sup> channel in pancreatic islet cells can be activated and inactivated by internal calcium. *J Membr Biol* 83, 169-175.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 1996. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 15, 6854-6862.
- Frattali, A. L., Pessin, J. E., 1993. Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem* 268, 7393-7400.
- Freytag, S. O., Paielli, D. L., Gilbert, J. D., 1994. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8, 1654-1663.
- Froesch, E. R., Burgi, H., Bally, P., Labhart, A., 1965. Insulin inhibition of spontaneous adipose tissue lipolysis and effects upon fructose and glucose metabolism. *Mol Pharmacol* 1, 280-296.
- Fry, M. J., Panayotou, G., Dhand, R., Ruiz-Larrea, F., Gout, I., Nguyen, O., Courtneidge, S. A., Waterfield, M. D., 1992. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase complex from bovine brain by using phosphopeptide affinity columns. *Biochem J* 288 ( Pt 2), 383-393.

- Fukuda, K., Kato, S., Morikawa, H., Shoda, T., Mori, K., 1996. Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67, 1309-1316.
- Gao, Z., Reavey-Cantwell, J., Young, R. A., Jegier, P., Wolf, B. A., 2000. Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca<sup>2+</sup>-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells. *J Biol Chem* 275, 36079-36085.
- Garry, A., Fromy, B., Blondeau, N., Henrion, D., Brau, F., Gounon, P., Guy, N., Heurteaux, C., Lazdunski, M., Saumet, J. L., 2007. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep* 8, 354-359.
- Garvey, W. T., Huecksteadt, T. P., Monzon, R., Marshall, S., 1989. Dexamethasone regulates the glucose transport system in primary cultured adipocytes: different mechanisms of insulin resistance after acute and chronic exposure. *Endocrinology* 124, 2063-2073.
- Gil, V., Gallego, D., Moha Ou Maati, H., Peyronnet, R., Martinez-Cutillas, M., Heurteaux, C., Borsotto, M., Jimenez, M., 2012. Relative contribution of SKCa and TREK1 channels in purinergic and nitrergic neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G412-423.
- Gillingham, A. K., Koumanov, F., Pryor, P. R., Reaves, B. J., Holman, G. D., 1999. Association of AP1 adaptor complexes with GLUT4 vesicles. *J Cell Sci* 112 ( Pt 24), 4793-4800.
- Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., Lazdunski, M., Lesage, F., 2001. Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K(+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 249-256.
- Gliemann, J., Nykjaer, A., Petersen, C. M., Jorgensen, K. E., Nielsen, M., Andreasen, P. A., Christensen, E. I., Lookene, A., Olivecrona, G., Moestrup, S. K., 1994. The multiligand alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (alpha 2MR/LRP). Binding and endocytosis of fluid phase and membrane-associated ligands. *Ann N Y Acad Sci* 737, 20-38.
- Gloyn, A. L., Weedon, M. N., Owen, K. R., Turner, M. J., Knight, B. A., Hitman, G., Walker, M., Levy, J. C., Sampson, M., Halford, S., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T., Frayling, T. M., 2003. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 568-572.
- Goedert, M., 1987. Neuronal localization of amyloid beta protein precursor mRNA in normal human brain and in Alzheimer's disease. *EMBO J* 6, 3627-3632.
- Goke, R., Fehmann, H. C., Linn, T., Schmidt, H., Krause, M., Eng, J., Goke, B., 1993. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268, 19650-19655.
- Greig, N. H., Holloway, H. W., De Ore, K. A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M. J., Egan, J. M., 1999. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42, 45-50.
- Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G., Thorens, B., 1997a. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 272, 30261-30269.
- Gremlich, S., Roduit, R., Thorens, B., 1997b. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic beta cells. Comparison with the effects of fatty acids. *J Biol Chem* 272, 3216-3222.

- Grodsky, G. M., 1972. A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *J Clin Invest* 51, 2047-2059.
- Gruss, M., Bushell, T. J., Bright, D. P., Lieb, W. R., Mathie, A., Franks, N. P., 2004. Two-pore-domain K<sup>+</sup> channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol* 65, 443-452.
- Gui, X., Carraway, R. E., 2001. Enhancement of jejunal absorption of conjugated bile acid by neurotensin in rats. *Gastroenterology* 120, 151-160.
- Gui, X., Degolier, T. F., Duke, G. E., Carraway, R. E., 2000. Neurotensin elevates hepatic bile acid secretion in chickens by a mechanism requiring an intact enterohepatic circulation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 127, 61-70.
- Gut, A., Kiraly, C. E., Fukuda, M., Mikoshiba, K., Wollheim, C. B., Lang, J., 2001. Expression and localisation of synaptotagmin isoforms in endocrine beta-cells: their function in insulin exocytosis. *J Cell Sci* 114, 1709-1716.
- Haghverdizadeh, P., Sadat Haerian, M., Sadat Haerian, B., 2014. ABCC8 genetic variants and risk of diabetes mellitus. *Gene* 545, 198-204.
- Henquin, J. C., 1990. Role of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 416, 568-572.
- Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., Schaller, C., 1999. Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res Mol Brain Res* 65, 216-219.
- Hermey, G., Riedel, I. B., Hampe, W., Schaller, H. C., Hermans-Borgmeyer, I., 1999. Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 347-351.
- Herz, J., Goldstein, J. L., Strickland, D. K., Ho, Y. K., Brown, M. S., 1991. 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 266, 21232-21238.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., Lazdunski, M., 2004. TREK-1, a K<sup>+</sup> channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23, 2684-2695.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thummler, S., Peng, X. D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., Gobbi, G., Vaugeois, J. M., Debonnel, G., Lazdunski, M., 2006. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9, 1134-1141.
- Hinrichsen, C., 1997. *Organ Histology: A Student's Guide*. World Scientific.
- Holmkvist, J., Tojjar, D., Almgren, P., Lyssenko, V., Lindgren, C. M., Isomaa, B., Tuomi, T., Berglund, G., Renstrom, E., Groop, L., 2007. Polymorphisms in the gene encoding the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel Ca (V)2.3 (CACNA1E) are associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion. *Diabetologia* 50, 2467-2475.
- Holz, G. G. t., Leech, C. A., Habener, J. F., 1995. Activation of a cAMP-regulated Ca<sup>2+</sup>-signaling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 270, 17749-17757.
- Honore, E., Maingret, F., Lazdunski, M., Patel, A. J., 2002. An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. *EMBO J* 21, 2968-2976.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., Nakayama, K., 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage



- catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 266, 12127-12130.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., Spiegelman, B. M., 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.
- Hsu, W. H., Xiang, H. D., Rajan, A. S., Kunze, D. L., Boyd, A. E., 3rd, 1991. Somatostatin inhibits insulin secretion by a G-protein-mediated decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the beta cell. *J Biol Chem* 266, 837-843.
- Huang, G., Buckler-Pena, D., Nauta, T., Singh, M., Asmar, A., Shi, J., Kim, J. Y., Kandror, K. V., 2013. Insulin responsiveness of glucose transporter 4 in 3T3-L1 cells depends on the presence of sortilin. *Mol Biol Cell* 24, 3115-3122.
- Hwang, S. J., O'Kane, N., Singer, C., Ward, S. M., Sanders, K. M., Koh, S. D., 2008. Block of inhibitory junction potentials and TREK-1 channels in murine colon by  $\text{Ca}^{2+}$  store-active drugs. *J Physiol* 586, 1169-1184.
- Iezzi, M., Kouri, G., Fukuda, M., Wollheim, C. B., 2004. Synaptotagmin V and IX isoforms control  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent insulin exocytosis. *J Cell Sci* 117, 3119-3127.
- Imredy, J. P., Yue, D. T., 1994. Mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive inactivation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuron* 12, 1301-1318.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P. t., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J., 1995. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170.
- Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S. H., Saltiel, A. R., 2003. The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422, 629-633.
- Jacobsen, L., Madsen, P., Moestrup, S. K., Lund, A. H., Tommerup, N., Nykjaer, A., Sottrup-Jensen, L., Gliemann, J., Petersen, C. M., 1996. Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor-associated protein. *J Biol Chem* 271, 31379-31383.
- Jacobson, D. A., Philipson, L. H., 2007. Action potentials and insulin secretion: new insights into the role of Kv channels. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2, 89-98.
- Jager, J., Gremeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F., 2007. Interleukin-1 $\beta$ -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241-251.
- Jedrychowski, M. P., Gartner, C. A., Gygi, S. P., Zhou, L., Herz, J., Kandror, K. V., Pilch, P. F., 2010. Proteomic analysis of GLUT4 storage vesicles reveals LRP1 to be an important vesicle component and target of insulin signaling. *J Biol Chem* 285, 104-114.
- Jelinek, L. J., Lok, S., Rosenberg, G. B., Smith, R. A., Grant, F. J., Biggs, S., Bensch, P. A., Kuijper, J. L., Sheppard, P. O., Sprecher, C. A., et al., 1993. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259, 1614-1616.
- Johnson, J. H., Newgard, C. B., Milburn, J. L., Lodish, H. F., Thorens, B., 1990. The high  $K_m$  glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265, 6548-6551.
- Joubert, P. H., Bam, W. J., Manyane, N., 1986. Effect of an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (BAY m 1099) on post-prandial blood glucose and insulin in type II diabetics. *Eur J Clin Pharmacol* 30, 253-255.
- Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Tanti, J. F., Cormont, M., 2009. Involvement of TNF- $\alpha$  in

- abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* 52, 932-940.
- Kailey, B., van de Bunt, M., Cheley, S., Johnson, P. R., MacDonald, P. E., Gloyn, A. L., Rorsman, P., Braun, M., 2012. SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic beta- and alpha-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E1107-1116.
- Kakinuma, H., Oi, T., Hashimoto-Tsuchiya, Y., Arai, M., Kawakita, Y., Fukasawa, Y., Iida, I., Hagima, N., Takeuchi, H., Chino, Y., Asami, J., Okumura-Kitajima, L., Ito, F., Yamamoto, D., Miyata, N., Takahashi, T., Uchida, S., Yamamoto, K., 2010. (1S)-1,5-anhydro-1-[5-(4-ethoxybenzyl)-2-methoxy-4-methylphenyl]-1-thio-D-glucitol (TS-071) is a potent, selective sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for type 2 diabetes treatment. *J Med Chem* 53, 3247-3261.
- Kalivas, P. W., Nemeroff, C. B., Miller, J. S., Prange Jr, A. J., 1985. Microinjection of neurotensin into the ventral tegmental area produces hypothermia: Evaluation of dopaminergic mediation. *Brain Research* 326, 219-227.
- Kang, D., Choe, C., Kim, D., 2004a. Functional expression of TREK-2 in insulin-secreting MIN6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 323-331.
- Kang, D., Kim, D., 2004. Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K<sup>+</sup> channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 836-844.
- Kang, D., Mariash, E., Kim, D., 2004b. Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K<sup>+</sup> channel family. *J Biol Chem* 279, 28063-28070.
- Kang, G., Chepurny, O. G., Holz, G. G., 2001. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol* 536, 375-385.
- Kathiresan, S., Melander, O., Guiducci, C., Surti, A., Burtt, N. P., Rieder, M. J., Cooper, G. M., Roos, C., Voight, B. F., Havulinna, A. S., Wahlstrand, B., Hedner, T., Corella, D., Tai, E. S., Ordovas, J. M., Berglund, G., Vartiainen, E., Jousilahti, P., Hedblad, B., Taskinen, M. R., Newton-Cheh, C., Salomaa, V., Peltonen, L., Groop, L., Altshuler, D. M., Orho-Melander, M., 2008. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 40, 189-197.
- Kaufman, D. L., Erlander, M. G., Clare-Salzler, M., Atkinson, M. A., Maclaren, N. K., Tobin, A. J., 1992. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 89, 283-292.
- Kaul, N., Ali, S., 2016. Genes, Genetics, and Environment in Type 2 Diabetes: Implication in Personalized Medicine. *DNA Cell Biol* 35, 1-12.
- Kawai, K., Yokota, C., Ohashi, S., Watanabe, Y., Yamashita, K., 1995. Evidence that glucagon stimulates insulin secretion through its own receptor in rats. *Diabetologia* 38, 274-276.
- Keahey, H. H., Rajan, A. S., Boyd, A. E., 3rd, Kunze, D. L., 1989. Characterization of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in beta-cell line. *Diabetes* 38, 188-193.
- Keller, S. R., Scott, H. M., Mastick, C. C., Aebersold, R., Lienhard, G. E., 1995. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem* 270, 23612-23618.
- Kennard, L. E., Chumbley, J. R., Ranatunga, K. M., Armstrong, S. J., Veale, E. L., Mathie, A., 2005. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol* 144, 821-829.
- Kilpelainen, T. O., Lakka, T. A., Laaksonen, D. E., Laukkanen, O., Lindstrom, J., Eriksson, J. G., Valle, T. T., Hamalainen, H., Aunola, S., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukkaanniemi, S., Tuomilehto, J., Uusitupa, M., Laakso, M., 2007. Physical activity modifies the effect of

- SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. *Physiol Genomics* 31, 264-272.
- Kim, E., Hwang, E. M., Yarishkin, O., Yoo, J. C., Kim, D., Park, N., Cho, M., Lee, Y. S., Sun, C. H., Yi, G. S., Yoo, J., Kang, D., Han, J., Hong, S. G., Park, J. Y., 2010. Enhancement of TREK1 channel surface expression by protein-protein interaction with beta-COP. *Biochem Biophys Res Commun* 395, 244-250.
- Kim, Y., Bang, H., Kim, D., 2000. TASK-3, a new member of the tandem pore K(+) channel family. *J Biol Chem* 275, 9340-9347.
- Kitabgi, P., Carraway, R., Leeman, S. E., 1976. Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem* 251, 7053-7058.
- Kjolby, M., Andersen, O. M., Breiderhoff, T., Fjorback, A. W., Pedersen, K. M., Madsen, P., Jansen, P., Heeren, J., Willnow, T. E., Nykjaer, A., 2010. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab* 12, 213-223.
- Koh, S. D., Monaghan, K., Sergeant, G. P., Ro, S., Walker, R. L., Sanders, K. M., Horowitz, B., 2001. TREK-1 regulation by nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. An essential role in smooth muscle inhibitory neurotransmission. *J Biol Chem* 276, 44338-44346.
- Kollewe, A., Lau, A. Y., Sullivan, A., Roux, B., Goldstein, S. A., 2009. A structural model for K2P potassium channels based on 23 pairs of interacting sites and continuum electrostatics. *J Gen Physiol* 134, 53-68.
- Koster, J. C., Remedi, M. S., Dao, C., Nichols, C. G., 2005. ATP and sulfonylurea sensitivity of mutant ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in neonatal diabetes: implications for pharmacogenomic therapy. *Diabetes* 54, 2645-2654.
- Ku, G. M., Kim, H., Vaughn, I. W., Hangauer, M. J., Myung Oh, C., German, M. S., McManus, M. T., 2012. Research resource: RNA-Seq reveals unique features of the pancreatic beta-cell transcriptome. *Mol Endocrinol* 26, 1783-1792.
- Kuo, W. N., Hodgins, D. S., Kuo, J. F., 1973. Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents. *J Biol Chem* 248, 2705-2711.
- Kurose, T., Seino, Y., Nishi, S., Tsuji, K., Taminato, T., Tsuda, K., Imura, H., 1990. Mechanism of sympathetic neural regulation of insulin, somatostatin, and glucagon secretion. *Am J Physiol* 258, E220-227.
- L'Age, M., Henning, H. V., Ohly, B., Seubert, W., 1968. On the role of insulin in the control of gluconeogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 31, 241-246.
- Larance, M., Ramm, G., Stockli, J., van Dam, E. M., Winata, S., Wasinger, V., Simpson, F., Graham, M., Junutula, J. R., Guilhaus, M., James, D. E., 2005. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem* 280, 37803-37813.
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., Lazdunski, M., 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* 19, 1784-1793.
- Lefrancois, S., May, T., Knight, C., Bourbeau, D., Morales, C. R., 2002. The lysosomal transport of prosaposin requires the conditional interaction of its highly conserved d domain with sphingomyelin. *J Biol Chem* 277, 17188-17199.

- Leiser, M., Fleischer, N., 1996. cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac-type alpha 1 subunit of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in a murine pancreatic beta-cell line. *Diabetes* 45, 1412-1418.
- Lengyel, M., Czirjak, G., Enyedi, P., 2016. Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J Biol Chem* 291, 13649-13661.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., Barhanin, J., 1996. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J* 15, 1004-1011.
- Lesage, F., Lauritzen, I., Duprat, F., Reyes, R., Fink, M., Heurteaux, C., Lazdunski, M., 1997. The structure, function and distribution of the mouse TWIK-1 K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett* 402, 28-32.
- Leto, D., Saltiel, A. R., 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383-396.
- Li, J., Matye, D. J., Li, T., 2015. Insulin resistance induces posttranslational hepatic sortilin 1 degradation in mice. *J Biol Chem* 290, 11526-11536.
- Li, J., Peters, P. J., Bai, M., Dai, J., Bos, E., Kirchhausen, T., Kandror, K. V., Hsu, V. W., 2007. An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *J Cell Biol* 178, 453-464.
- Li, L. V., Bakirtzi, K., Watson, R. T., Pessin, J. E., Kandror, K. V., 2009. The C-terminus of GLUT4 targets the transporter to the perinuclear compartment but not to the insulin-responsive vesicles. *Biochem J* 419, 105-112, 101 p following 112.
- Li, L. V., Kandror, K. V., 2005. Golgi-localized, gamma-ear-containing, Arf-binding protein adaptors mediate insulin-responsive trafficking of glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 19, 2145-2153.
- Li, Y., Lu, W., Schwartz, A. L., Bu, G., 2002. Receptor-associated protein facilitates proper folding and maturation of the low-density lipoprotein receptor and its class 2 mutants. *Biochemistry* 41, 4921-4928.
- Lin, B. Z., Pilch, P. F., Kandror, K. V., 1997. Sortilin is a major protein component of Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 272, 24145-24147.
- Lopes, C. M., Rohacs, T., Czirjak, G., Balla, T., Enyedi, P., Logothetis, D. E., 2005. PIP2 hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K<sup>+</sup> channels. *J Physiol* 564, 117-129.
- Love, J. A., Richards, N. W., Owyang, C., Dawson, D. C., 1998. Muscarinic modulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting HIT-T15 cells. *Am J Physiol* 274, G397-405.
- Luttinger, D., King, R. A., Sheppard, D., Strupp, J., Nemeroff, C. B., Prange, A. J., Jr., 1982. The effect of neurotensin on food consumption in the rat. *Eur J Pharmacol* 81, 499-503.
- MacDonald, P. E., Salapatek, A. M., Wheeler, M. B., 2002a. Glucagon-like peptide-1 receptor activation antagonizes voltage-dependent repolarizing K(+) currents in beta-cells: a possible glucose-dependent insulinotropic mechanism. *Diabetes* 51 Suppl 3, S443-447.
- MacDonald, P. E., Salapatek, A. M., Wheeler, M. B., 2003. Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* 546, 647-653.
- MacDonald, P. E., Wang, G., Tsuk, S., Dodo, C., Kang, Y., Tang, L., Wheeler, M. B., Cattral, M. S., Lakey, J. R., Salapatek, A. M., Lotan, I., Gaisano, H. Y., 2002b. Synaptosome-associated protein of 25 kilodaltons modulates Kv2.1 voltage-dependent K(+) channels in neuroendocrine islet beta-cells through an interaction with the channel N terminus. *Mol Endocrinol* 16, 2452-2461.

- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K., 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221, 286-289.
- Maehama, T., Dixon, J. E., 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.
- Maingret, F., Honore, E., Lazdunski, M., Patel, A. J., 2002. Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel. *Biochem Biophys Res Commun* 292, 339-346.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E., 2000a. TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J* 19, 2483-2491.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lazdunski, M., Honore, E., 2001. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J* 20, 47-54.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E., 1999. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274, 26691-26696.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M., Honore, E., 2000b. Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275, 10128-10133.
- Makino, T., Yokokura, T., Iizuka, R., 1978. Effect of neurotensin on pituitary gonadotropin release in vivo. *Endocrinol. Japon.* 25, 181-183.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E., Emr, S. D., 1994. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77, 579-586.
- Mari, A., Sallas, W. M., He, Y. L., Watson, C., Ligueros-Saylan, M., Dunning, B. E., Deacon, C. F., Holst, J. J., Foley, J. E., 2005. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model-assessed beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4888-4894.
- Marshall, S., Olefsky, J. M., 1980. The endocytotic-internalization pathway of insulin metabolism: relationship to insulin degradation and activation of glucose transport. *Endocrinology* 107, 1937-1945.
- Marte, B. M., Downward, J., 1997. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 22, 355-358.
- Martin, F., Moya, F., Gutierrez, L. M., Reig, J. A., Soria, B., 1995. Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 38, 860-863.
- Martin, S., Navarro, V., Vincent, J. P., Mazella, J., 2002. Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123, 1135-1143.
- Martinez-Arca, S., Lalioti, V. S., Sandoval, I. V., 2000. Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs. *J Cell Sci* 113 ( Pt 10), 1705-1715.
- Massague, J., Pilch, P. F., Czech, M. P., 1980. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7137-7141.

- Mazella, J., Beraud-Dufour, S., Devader, C., Massa, F., Coppola, T., 2012. Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 143.
- Mazella, J., Botto, J. M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., Vincent, J. P., 1996. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16, 5613-5620.
- Mazella, J., Chabry, J., Kitabgi, P., Vincent, J. P., 1988. Solubilization and characterization of active neurotensin receptors from mouse brain. *J Biol Chem* 263, 144-149.
- Mazella, J., Chabry, J., Zsuzger, N., Vincent, J. P., 1989. Purification of the neurotensin receptor from mouse brain by affinity chromatography. *J Biol Chem* 264, 5559-5563.
- Mazella, J., Petrault, O., Lucas, G., Deval, E., Beraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., Taouji, S., Conductier, G., Corinus, A., Coppola, T., Gobbi, G., Nahon, J. L., Heurteaux, C., Borsotto, M., 2010. Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol* 8, e1000355.
- Mazella, J., Zsuzger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J. P., Vincent, J. P., 1998. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 273, 26273-26276.
- Meade, R. C., Kneubuhler, H. A., Schulte, W. J., Barboriak, J. J., 1967. Stimulation of insulin secretion by pancreozymin. *Diabetes* 16, 141-144.
- Meadows, H. J., Benham, C. D., Cairns, W., Gloger, I., Jennings, C., Medhurst, A. D., Murdock, P., Chapman, C. G., 2000. Cloning, localisation and functional expression of the human orthologue of the TREK-1 potassium channel. *Pflugers Arch* 439, 714-722.
- Medhurst, A. D., Rennie, G., Chapman, C. G., Meadows, H., Duckworth, M. D., Kelsell, R. E., Gloger, I., Pangalos, M. N., 2001. Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res Mol Brain Res* 86, 101-114.
- Medina, R. A., Meneses, A. M., Vera, J. C., Guzman, C., Nualart, F., Astuya, A., Garcia, M. A., Kato, S., Carvajal, A., Pinto, M., Owen, G. I., 2003. Estrogen and progesterone up-regulate glucose transporter expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Endocrinology* 144, 4527-4535.
- Mei, N., Arlhac, A., Boyer, A., 1981. Nervous regulation of insulin release by the intestinal vagal glucoreceptors. *J Auton Nerv Syst* 4, 351-363.
- Meissner, H. P., Schmelz, H., 1974. Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Pflugers Arch* 351, 195-206.
- Miinea, C. P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peranen, J., Lane, W. S., Lienhard, G. E., 2005. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochem J* 391, 87-93.
- Miki, T., Nagashima, K., Tashiro, F., Kotake, K., Yoshitomi, H., Tamamoto, A., Gonoj, T., Iwanaga, T., Miyazaki, J., Seino, S., 1998. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10402-10406.
- Miller, P., Kemp, P. J., Lewis, A., Chapman, C. G., Meadows, H. J., Peers, C., 2003. Acute hypoxia occludes hTREK-1 modulation: re-evaluation of the potential role of tandem P domain K<sup>+</sup> channels in central neuroprotection. *J Physiol* 548, 31-37.
- Milstein, S. W., Hausberger, F. X., 1956. Lipogenesis and carbohydrate utilization; effects of glucose concentration and insulin in rat liver and adipose tissue. *Diabetes* 5, 89-92.

- Min, J., Okada, S., Kanzaki, M., Elmendorf, J. S., Coker, K. J., Ceresa, B. P., Syu, L. J., Noda, Y., Saltiel, A. R., Pessin, J. E., 1999. Synip: a novel insulin-regulated syntaxin 4-binding protein mediating GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol Cell* 3, 751-760.
- Moens, K., Berger, V., Ahn, J. M., Van Schravendijk, C., Hruby, V. J., Pipeleers, D., Schuit, F., 2002. Assessment of the role of interstitial glucagon in the acute glucose secretory responsiveness of in situ pancreatic beta-cells. *Diabetes* 51, 669-675.
- Moha Ou Maati, H., Veysiere, J., Labbal, F., Coppola, T., Gandin, C., Widmann, C., Mazella, J., Heurteaux, C., Borsotto, M., 2012. Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology* 62, 278-288.
- Montarras, D., Chelly, J., Bober, E., Arnold, H., Ott, M. O., Gros, F., Pinset, C., 1991. Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis. *New Biol* 3, 592-600.
- Moodie, S. A., Alleman-Sposeto, J., Gustafson, T. A., 1999. Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J Biol Chem* 274, 11186-11193.
- Morinville, A., Martin, S., Lavallee, M., Vincent, J. P., Beaudet, A., Mazella, J., 2004. Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2153-2168.
- Morris, N. J., Ross, S. A., Lane, W. S., Moestrup, S. K., Petersen, C. M., Keller, S. R., Lienhard, G. E., 1998. Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 273, 3582-3587.
- Mortensen, M. B., Kjolby, M., Gunnensen, S., Larsen, J. V., Palmfeldt, J., Falk, E., Nykjaer, A., Bentzon, J. F., 2014. Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *J Clin Invest* 124, 5317-5322.
- Motta, P. M., Macchiarelli, G., Nottola, S. A., Correr, S., 1997. Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Tech* 37, 384-398.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., Lodish, H. F., 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945.
- Muendlein, A., Geller-Rhomberg, S., Saely, C. H., Winder, T., Sonderegger, G., Rein, P., Beer, S., Vonbank, A., Drexel, H., 2009. Significant impact of chromosomal locus 1p13.3 on serum LDL cholesterol and on angiographically characterized coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 206, 494-499.
- Munck Petersen, C., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S. K., Madsen, P., 1999. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 18, 595-604.
- Murbartian, J., Lei, Q., Sando, J. J., Bayliss, D. A., 2005. Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J Biol Chem* 280, 30175-30184.
- Murphy, G. A., Solski, P. A., Jillian, S. A., Perez de la Ossa, P., D'Eustachio, P., Der, C. J., Rush, M. G., 1999. Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* 18, 3831-3845.
- Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N. E., Ahfeldt, T., Sachs, K. V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V. M., Pirruccello, J. P., Muchmore, B., Prokunina-Olsson, L., Hall, J. L., Schadt, E. E., Morales, C. R., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Wong, J., Cantley, W., Racie, T., Ejebe, K. G., Orho-Melander, M., Melander, O., Koteliensky, V., Fitzgerald, K., Krauss, R. M., Cowan, C. A., Kathiresan, S., Rader, D. J., 2010. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466, 714-719.

- Nagamatsu, S., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Watanabe, T., Katahira, H., Sawa, H., Akagawa, K., 1996. Expression and functional role of syntaxin 1/HPC-1 in pancreatic beta cells. Syntaxin 1A, but not 1B, plays a negative role in regulatory insulin release pathway. *J Biol Chem* 271, 1160-1165.
- Nakaki, T., Nakadate, T., Ishii, K., Kato, R., 1981. Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3':5'-adenosine monophosphate accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 216, 607-612.
- Nakano, K., Suga, S., Takeo, T., Ogawa, Y., Suda, T., Kanno, T., Wakui, M., 2002. Intracellular Ca(2+) modulation of ATP-sensitive K(+) channel activity in acetylcholine-induced activation of rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 143, 569-576.
- Navarro, V., Martin, S., Sarret, P., Nielsen, M. S., Petersen, C. M., Vincent, J., Mazella, J., 2001. Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett* 495, 100-105.
- Nayak, T. K., Harinath, S., Nama, S., Somasundaram, K., Sikdar, S. K., 2009. Inhibition of human two-pore domain K<sup>+</sup> channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol Pharmacol* 76, 903-917.
- Nelson, T. Y., Gaines, K. L., Rajan, A. S., Berg, M., Boyd, A. E., 3rd, 1987. Increased cytosolic calcium. A signal for sulfonylurea-stimulated insulin release from beta cells. *J Biol Chem* 262, 2608-2612.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. M., Achoki, T., AlBuhairan, F. S., Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K., Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwar, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A., Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhury, R., Courville, K. J., Criqui, M. H., Cundiff, D. K., Dabhadkar, K. C., Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D., Ding, E. L., Durrani, A. M., Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J., Harewood, H. C., Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T., Ikeda, N., Islami, F., Jahangir, E., Jassal, S. K., Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B., Kabagambe, E. K., Khalifa, S. E., Kengne, A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Mokdad, A. H., Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M., Nelson, E. L., Neuhauser, M. L., Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S. G., Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G. M., Singh, J. A., Skirbekk, V., Stapelberg, N. J., Sturua, L., Sykes, B. L., Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., van de Vijver, S., Vasankari, T. J., Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L., Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S. J., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Gakidou, E., 2014. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384, 766-781.
- Ni, X., Morales, C. R., 2006. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 7, 889-902.



- Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., Petersen, C. M., 1999. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 274, 8832-8836.
- Nielsen, M. S., Madsen, P., Christensen, E. I., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R., Petersen, C. M., 2001. The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J* 20, 2180-2190.
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Jacobsen, C., Kliemann, M., Schwarz, E., Willnow, T. E., Hempstead, B. L., Petersen, C. M., 2004. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843-848.
- Olefsky, J. M., 1975. Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. *J Clin Invest* 56, 1499-1508.
- Osumi, Y., Nagasaka, Y., Wang, Fu, L. H., Fujiwara, M., 1978. Inhibition of gastric acid secretion and mucosal blood flow induced by intraventricularly applied neurotensin in rats. *Life Sci* 23, 2275-2280.
- Parker, H. E., Habib, A. M., Rogers, G. J., Gribble, F. M., Reimann, F., 2009. Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia* 52, 289-298.
- Parolaro, D., Sala, M., Crema, G., Spazzi, L., Gori, E., 1983. Effect on intestinal transit of neurotensin administered intracerebroventricularly to rats. *Life Sciences* 33, 485-488.
- Patel, A. J., Honore, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., Lazdunski, M., 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci* 2, 422-426.
- Patel, A. J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., 1998. A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K<sup>+</sup> channel. *EMBO J* 17, 4283-4290.
- Patel, K. M., Strong, A., Tohyama, J., Jin, X., Morales, C. R., Billheimer, J., Millar, J., Kruth, H., Rader, D. J., 2015. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circ Res* 116, 789-796.
- Petersen, C. M., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H. H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., Moestrup, S. K., 1997. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 272, 3599-3605.
- Petkov, G. V., 2012. Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol* 9, 30-40.
- Philipson, L. H., Rosenberg, M. P., Kuznetsov, A., Lancaster, M. E., Worley, J. F., 3rd, Roe, M. W., Dukes, I. D., 1994. Delayed rectifier K<sup>+</sup> channel overexpression in transgenic islets and beta-cells associated with impaired glucose responsiveness. *J Biol Chem* 269, 27787-27790.
- Piiper, A., Stryjek-Kaminska, D., Klengel, R., Zeuzem, S., 1997. CCK, carbachol, and bombesin activate distinct PLC-beta isoenzymes via Gq/11 in rat pancreatic acinar membranes. *Am J Physiol* 272, G135-140.
- Piros, E. T., Prather, P. L., Loh, H. H., Law, P. Y., Evans, C. J., Hales, T. G., 1995. Ca<sup>2+</sup> channel and adenylyl cyclase modulation by cloned mu-opioid receptors in GH3 cells. *Mol Pharmacol* 47, 1041-1049.
- Porte, D., Jr., Williams, R. H., 1966. Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. *Science* 152, 1248-1250.

- Prabakaran, T., Nielsen, R., Larsen, J. V., Sorensen, S. S., Feldt-Rasmussen, U., Saleem, M. A., Petersen, C. M., Verroust, P. J., Christensen, E. I., 2011. Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in human podocytes in Fabry disease. *PLoS One* 6, e25065.
- Prabakaran, T., Nielsen, R., Satchell, S. C., Mathieson, P. W., Feldt-Rasmussen, U., Sorensen, S. S., Christensen, E. I., 2012. Mannose 6-phosphate receptor and sortilin mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in kidney endothelial cells. *PLoS One* 7, e39975.
- Punke, M. A., Licher, T., Pongs, O., Friederich, P., 2003. Inhibition of human TREK-1 channels by bupivacaine. *Anesth Analg* 96, 1665-1673, table of contents.
- Qin, L. J., Lv, Y., Huang, Q. Y., 2013. Meta-analysis of association of common variants in the KCNJ11-ABCC8 region with type 2 diabetes. *Genet Mol Res* 12, 2990-3002.
- Rabinowich, L., Fishman, S., Hubel, E., Thurm, T., Park, W. J., Pewzner-Jung, Y., Saroha, A., Erez, N., Halpern, Z., Futerman, A. H., Zvibel, I., 2015. Sortilin deficiency improves the metabolic phenotype and reduces hepatic steatosis of mice subjected to diet-induced obesity. *J Hepatol* 62, 175-181.
- Rajan, A. S., Hill, R. S., Boyd, A. E., 3rd, 1989. Effect of rise in cAMP levels on Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in HIT cells. Second-messenger synarchy in beta-cells. *Diabetes* 38, 874-880.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Muller, R., Grzeschik, K. H., Daut, J., Karschin, A., Derst, C., 2001. THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 276, 7302-7311.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu, G., Preisig-Muller, R., Daut, J., Karschin, A., Derst, C., 2000. TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K<sup>+</sup> channel. An extracellular histiding as pH sensor. *J Biol Chem* 275, 16650-16657.
- Regazzi, R., Wollheim, C. B., Lang, J., Theler, J. M., Rossetto, O., Montecucco, C., Sadoul, K., Weller, U., Palmer, M., Thorens, B., 1995. VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca(2+)-but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *EMBO J* 14, 2723-2730.
- Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G., Parker, H. E., Rogers, G. J., Gribble, F. M., 2008. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab* 8, 532-539.
- Reinbothe, T. M., Alkayyali, S., Ahlqvist, E., Tuomi, T., Isomaa, B., Lyssenko, V., Renstrom, E., 2013. The human L-type calcium channel Cav1.3 regulates insulin release and polymorphisms in CACNA1D associate with type 2 diabetes. *Diabetologia* 56, 340-349.
- Reyes, R., Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Salinas, M., Farman, N., Lazdunski, M., 1998. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K<sup>+</sup> channel from human kidney. *J Biol Chem* 273, 30863-30869.
- Ribalet, B., Eddlestone, G. T., 1995. Characterization of the G protein coupling of a somatostatin receptor to the K<sup>+</sup>ATP channel in insulin-secreting mammalian HIT and RIN cell lines. *J Physiol* 485 ( Pt 1), 73-86.
- Ribon, V., Saltiel, A. R., 1997. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 324 ( Pt 3), 839-845.
- Roe, M. W., Worley, J. F., 3rd, Mittal, A. A., Kuznetsov, A., DasGupta, S., Mertz, R. J., Witherspoon, S. M., 3rd, Blair, N., Lancaster, M. E., McIntyre, M. S., Shehee, W. R., Dukes, I. D., Philipson, L. H., 1996. Expression and function of pancreatic beta-cell delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. Role in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* 271, 32241-32246.

- Rossetti, L., DeFronzo, R. A., Gherzi, R., Stein, P., Andraghetti, G., Falzetti, G., Shulman, G. I., Klein-Robbenhaar, E., Cordera, R., 1990. Effect of metformin treatment on insulin action in diabetic rats: in vivo and in vitro correlations. *Metabolism* 39, 425-435.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., Anderson, R. G., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Rotter, V., Nagaev, I., Smith, U., 2003. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278, 45777-45784.
- Ruan, C. S., Yang, C. R., Li, J. Y., Luo, H. Y., Bobrovskaya, L., Zhou, X. F., 2016. Mice with Sort1 deficiency display normal cognition but elevated anxiety-like behavior. *Exp Neurol* 281, 99-108.
- Rudy, B., Kentros, C., Vela-Saenz De Miera, E., 1991. Families of potassium channel genes in mammals: Toward an understanding of the molecular basis of potassium channel diversity. *Mol Cell Neurosci* 2, 89-102.
- Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R., 1955. The disulphide bonds of insulin. *Biochem J* 60, 541-556.
- Saadipour, K., Yang, M., Lim, Y., Georgiou, K., Sun, Y., Keating, D., Liu, J., Wang, Y. R., Gai, W. P., Zhong, J. H., Wang, Y. J., Zhou, X. F., 2013. Amyloid beta(1)(-)(4)(2) (Aβ(4)(2)) up-regulates the expression of sortilin via the p75(NTR)/RhoA signaling pathway. *J Neurochem* 127, 152-162.
- Sadoul, K., Lang, J., Montecucco, C., Weller, U., Regazzi, R., Catsicas, S., Wollheim, C. B., Halban, P. A., 1995. SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *J Cell Biol* 128, 1019-1028.
- Sakai, K., Imamura, M., Tanaka, Y., Iwata, M., Hirose, H., Kaku, K., Maegawa, H., Watada, H., Tobe, K., Kashiwagi, A., Kawamori, R., Maeda, S., 2013. Replication study for the association of 9 East Asian GWAS-derived loci with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *PLoS One* 8, e76317.
- Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Funaki, M., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T., 2000. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes* 49, 1700-1708.
- Sandoz, G., Bell, S. C., Isacoff, E. Y., 2011. Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2605-2610.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., Lesage, F., 2009. Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14628-14633.
- Sandoz, G., Tardy, M. P., Thummler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., Lesage, F., 2008. Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K<sup>+</sup> channel expression and trafficking. *J Neurosci* 28, 8545-8552.
- Sandoz, G., Thummler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., Lesage, F., 2006. AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J* 25, 5864-5872.
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. W., Lienhard, G. E., 2003a. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278, 14599-14602.

- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., Furuichi, K., 2003b. A novel two-pore domain K<sup>+</sup> channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem* 278, 27406-27412.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Satoh, S., Nishimura, H., Clark, A. E., Kozka, I. J., Vannucci, S. J., Simpson, I. A., Quon, M. J., Cushman, S. W., Holman, G. D., 1993. Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J Biol Chem* 268, 17820-17829.
- Schertzer, J. D., Antonescu, C. N., Bilan, P. J., Jain, S., Huang, X., Liu, Z., Bonen, A., Klip, A., 2009. A transgenic mouse model to study glucose transporter 4myc regulation in skeletal muscle. *Endocrinology* 150, 1935-1940.
- Schjoldager, B. T., Mortensen, P. E., Christiansen, J., Orskov, C., Holst, J. J., 1989. GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig Dis Sci* 34, 703-708.
- Schmidt, W. E., Siegel, E. G., Creutzfeldt, W., 1985. Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia* 28, 704-707.
- Sharma, S. K., Nirenberg, M., Klee, W. A., 1975. Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 590-594.
- Shi, J., Huang, G., Kandror, K. V., 2008. Self-assembly of Glut4 storage vesicles during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 283, 30311-30321.
- Shi, J., Kandror, K. V., 2005. Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *Dev Cell* 9, 99-108.
- Shi, J., Kandror, K. V., 2007. The luminal Vps10p domain of sortilin plays the predominant role in targeting to insulin-responsive Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem* 282, 9008-9016.
- Shiota, C., Larsson, O., Shelton, K. D., Shiota, M., Efanov, A. M., Hoy, M., Lindner, J., Kooptiwut, S., Juntti-Berggren, L., Gromada, J., Berggren, P. O., Magnuson, M. A., 2002. Sulfonylurea receptor type 1 knock-out mice have intact feeding-stimulated insulin secretion despite marked impairment in their response to glucose. *J Biol Chem* 277, 37176-37183.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Gigengack, S., Lienhard, G. E., James, D. E., 1991. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* 113, 123-135.
- Smart, D., Smith, G., Lambert, D. G., 1994.  $\mu$ -Opioid receptor stimulation of inositol (1,4,5)trisphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neurochem* 62, 1009-1014.
- Smeekens, S. P., Montag, A. G., Thomas, G., Albiges-Rizo, C., Carroll, R., Benig, M., Phillips, L. A., Martin, S., Ohagi, S., Gardner, P., et al., 1992. Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertases furin, PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8822-8826.
- Stelzhammer, V., Guest, P. C., Rothermundt, M., Sondermann, C., Michael, N., Schwarz, E., Rahmoune, H., Bahn, S., 2013. Electroconvulsive therapy exerts mainly acute molecular changes in serum of major depressive disorder patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 23, 1199-1207.

- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., Lazar, M. A., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.
- Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, F., Hawkins, P. T., 1997. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570.
- Strong, A., Ding, Q., Edmondson, A. C., Millar, J. S., Sachs, K. V., Li, X., Kumaravel, A., Wang, M. Y., Ai, D., Guo, L., Alexander, E. T., Nguyen, D., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., Morales, C. R., Tall, A. R., Kathiresan, S., Fisher, E. A., Musunuru, K., Rader, D. J., 2012. Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. *J Clin Invest* 122, 2807-2816.
- Student, A. K., Hsu, R. Y., Lane, M. D., 1980. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 255, 4745-4750.
- Subramaniam, V. N., Loh, E., Hong, W., 1997. N-Ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) and alpha-soluble NSF attachment proteins (SNAP) mediate dissociation of GS28-syntaxin 5 Golgi SNAP receptors (SNARE) complex. *J Biol Chem* 272, 25441-25444.
- Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., White, M. F., 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.
- Tajbakhsh, S., Buckingham, M., 2000. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* 48, 225-268.
- Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., Reber, B. F., Catterall, W. A., 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5478-5482.
- Takayama, S., White, M. F., Kahn, C. R., 1988. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 263, 3440-3447.
- Talantikite, M., Berenguer, M., Gonzalez, T., Alessi, M. C., Poggi, M., Peiretti, F., Govers, R., 2016. The first intracellular loop of GLUT4 contains a retention motif. *J Cell Sci* 129, 2273-2284.
- Talley, E. M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., Bayliss, D. A., 2001. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21, 7491-7505.
- Tanaka, K., Masu, M., Nakanishi, S., 1990. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4, 847-854.
- Tanti, J. F., Gremeaux, T., Van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y., 1994. Insulin receptor substrate 1 is phosphorylated by the serine kinase activity of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* 304 ( Pt 1), 17-21.
- Tauris, J., Ellgaard, L., Jacobsen, C., Nielsen, M. S., Madsen, P., Thogersen, H. C., Gliemann, J., Petersen, C. M., Moestrup, S. K., 1998. The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin. *FEBS Lett* 429, 27-30.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., Hempstead, B. L., 2005. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25, 5455-5463.
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D., Novick, P., 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 6483-6494.
- Thorens, B., 1992. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8641-8645.

- Thorens, B., Weir, G. C., Leahy, J. L., Lodish, H. F., Bonner-Weir, S., 1990. Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6492-6496.
- Thummler, S., Duprat, F., Lazdunski, M., 2007. Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 284-289.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-1156.
- Tsuchiya, Y., Hatakeyama, H., Emoto, N., Wagatsuma, F., Matsushita, S., Kanzaki, M., 2010. Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes. *J Biol Chem* 285, 34371-34381.
- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Proks, P., Trapp, S., Ryder, T. J., Haug, T., Reimann, F., Ashcroft, F. M., 1998. Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *EMBO J* 17, 3290-3296.
- Turner, D. S., Etheridge, L., Marks, V., Brown, J. C., Mutt, V., 1974. Effectiveness of the intestinal polypeptides, IRP, GIP, VIP and motilin on insulin release in the rat. *Diabetologia* 10, 459-463.
- Turner, D. S., McIntyre, N., 1966. Stimulation by glucagon of insulin release from rabbit pancreas in vitro. *Lancet* 1, 351-352.
- Usdin, T. B., Mezey, E., Button, D. C., Brownstein, M. J., Bonner, T. I., 1993. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133, 2861-2870.
- Van Obberghen, E., Rossi, B., Kowalski, A., Gazzano, H., Ponzio, G., 1983. Receptor-mediated phosphorylation of the hepatic insulin receptor: evidence that the Mr 95,000 receptor subunit is its own kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 945-949.
- van Putten, J. P., Wieringa, T., Krans, H. M., 1985. Corticosteroids as long-term regulators of the insulin effectiveness in mouse 3T3 adipocytes. *Diabetologia* 28, 445-451.
- Varadi, A., Molnar, E., Ashcroft, S. J., 1995. Characterisation of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca(2+)-ATPases in pancreatic beta-cells and in islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta* 1236, 119-127.
- Varadi, A., Rutter, G. A., 2002. Dynamic imaging of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> concentration in insulin-secreting MIN6 Cells using recombinant targeted cameleons: roles of sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA)-2 and ryanodine receptors. *Diabetes* 51 Suppl 1, S190-201.
- Vierra, N. C., Dadi, P. K., Jeong, I., Dickerson, M., Powell, D. R., Jacobson, D. A., 2015. Type 2 Diabetes-Associated K<sup>+</sup> Channel TALK-1 Modulates beta-Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis. *Diabetes* 64, 3818-3828.
- Visser, M., Bouter, L. M., McQuillan, G. M., Wener, M. H., Harris, T. B., 1999. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282, 2131-2135.
- Vu, D., Ong, J. M., Clemens, T. L., Kern, P. A., 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D induces lipoprotein lipase expression in 3T3-L1 cells in association with adipocyte differentiation. *Endocrinology* 137, 1540-1544.
- Watson, R. T., Khan, A. H., Furukawa, M., Hou, J. C., Li, L., Kanzaki, M., Okada, S., Kandror, K. V., Pessin, J. E., 2004. Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. *EMBO J* 23, 2059-2070.

- Westergaard, U. B., Sorensen, E. S., Hermey, G., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., Petersen, C. M., 2004. Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J Biol Chem* 279, 50221-50229.
- Wheeler, M. B., Gelling, R. W., McIntosh, C. H., Georgiou, J., Brown, J. C., Pederson, R. A., 1995. Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology* 136, 4629-4639.
- Willer, C. J., Sanna, S., Jackson, A. U., Scuteri, A., Bonnycastle, L. L., Clarke, R., Heath, S. C., Timpson, N. J., Najjar, S. S., Stringham, H. M., Strait, J., Duren, W. L., Maschio, A., Busonero, F., Mulas, A., Albai, G., Swift, A. J., Morken, M. A., Narisu, N., Bennett, D., Parish, S., Shen, H., Galan, P., Meneton, P., Hercberg, S., Zelenika, D., Chen, W. M., Li, Y., Scott, L. J., Scheet, P. A., Sundvall, J., Watanabe, R. M., Nagaraja, R., Ebrahim, S., Lawlor, D. A., Ben-Shlomo, Y., Davey-Smith, G., Shuldiner, A. R., Collins, R., Bergman, R. N., Uda, M., Tuomilehto, J., Cao, A., Collins, F. S., Lakatta, E., Lathrop, G. M., Boehnke, M., Schlessinger, D., Mohlke, K. L., Abecasis, G. R., 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 40, 161-169.
- Williams, S. E., Ashcom, J. D., Argraves, W. S., Strickland, D. K., 1992. A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem* 267, 9035-9040.
- Wisniewski, T., Golabek, A., Matsubara, E., Ghiso, J., Frangione, B., 1993. Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 359-365.
- Wollen, N., Bailey, C. J., 1988. Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol* 37, 4353-4358.
- Xu, X., Pan, Y., Wang, X., 2004. Alterations in the expression of lipid and mechano-gated two-pore domain potassium channel genes in rat brain following chronic cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 120, 205-209.
- Yabe-Wada, T., Matsuba, S., Takeda, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Takai, T., Shi, H., Philpott, C. C., Nakamura, A., 2016. TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. *Sci Rep* 6, 26566.
- Yamada, E., Okada, S., Saito, T., Ohshima, K., Sato, M., Tsuchiya, T., Uehara, Y., Shimizu, H., Mori, M., 2005. Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles. *J Cell Biol* 168, 921-928.
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Yamakawa, Y., Kiuchi, Y., Isoda, F., Kawamoto, S., Okuda, K., Sekihara, H., 1995. Augmented production of tumor necrosis factor-alpha in obese mice. *Clin Immunol Immunopathol* 75, 51-56.
- Yang, J., Holman, G. D., 1993. Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 268, 4600-4603.
- Yang, S. N., Berggren, P. O., 2006. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27, 621-676.
- Ye, D., Li, Y., Zhang, X., Guo, F., Geng, L., Zhang, Q., Zhang, Z., 2015. TREK1 channel blockade induces an antidepressant-like response synergizing with 5-HT1A receptor signaling. *Eur Neuropsychopharmacol* 25, 2426-2436.
- Zawalich, W. S., Zawalich, K. C., Rasmussen, H., 1989. Cholinergic agonists prime the beta-cell to glucose stimulation. *Endocrinology* 125, 2400-2406.

- Zhang, Y., Miller, D. V., Paterson, W. G., 2010. TREK-1 channels do not mediate nitrgenic neurotransmission in circular smooth muscle from the lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* 159, 362-373.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao, A. Z., Bornfeldt, K. E., Beavo, J. A., 1998. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest* 102, 869-873.
- Zhou, L., Xiong, J., Lim, Y., Ruan, Y., Huang, C., Zhu, Y., Zhong, J. H., Xiao, Z., Zhou, X. F., 2013. Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord* 150, 776-784.
- Zhou, Q., Lai, Y., Bacaj, T., Zhao, M., Lyubimov, A. Y., Uervirojnangkoorn, M., Zeldin, O. B., Brewster, A. S., Sauter, N. K., Cohen, A. E., Soltis, S. M., Alonso-Mori, R., Chollet, M., Lemke, H. T., Pfuetzner, R. A., Choi, U. B., Weis, W. I., Diao, J., Sudhof, T. C., Brunger, A. T., 2015. Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature* 525, 62-67.
- Zsurger, N., Mazella, J., Vincent, J. P., 1994. Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res* 639, 245-252.
- Zunkler, B. J., Lenzen, S., Manner, K., Panten, U., Trube, G., 1988. Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in pancreatic B-cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337, 225-230.



# Résumé

---

Selon l'organisation mondiale de la santé, 108 millions de personnes étaient atteintes de diabète en 1980. En 2014, ce chiffre a été multiplié par 4. Le diabète est caractérisé par une mauvaise régulation de la glycémie, provoquée par un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas et/ou une diminution du stockage de glucose par les cellules insulino-sensibles (insulino-résistance). La majorité des traitements antidiabétiques actuels, bien qu'efficaces, possèdent de nombreux effets secondaires indésirables, ce qui oblige les industries pharmaceutiques à rechercher de nouvelles molécules, performantes et inoffensives pour le bien-être du patient.

Les travaux de l'équipe ont montré que les canaux potassiques de fond TREK-1 sont exprimés dans les cellules  $\beta$  et sont inhibés par la spadine, un analogue synthétique du propeptide (PE), issu de la maturation de la sortiline. Le PE et la spadine sont capables d'interagir avec la sortiline. Dans les tissus insulino-sensibles, tels que le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique, la sortiline joue un rôle majeur dans la formation et la sensibilité à l'insuline des vésicules contenant le transporteur de glucose Glut4.

Compte tenu de ces informations, l'hypothèse de travail suggérait que le PE pouvait participer à la boucle de régulation de la glycémie entre les cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline et les cellules insulino-sensibles. En effet, l'insuline, libérée en cas d'hyper-glycémie, stimule l'exocytose de Glut4 et le stockage de glucose dans les adipocytes et les cellules musculaires squelettiques. La translocation de Glut4 à la membrane plasmique serait corrélée à la libération de PE qui pourrait avoir un effet autocrine (sur les cellules insulino-sensibles via la sortiline) et/ou un effet paracrine (sur les cellules  $\beta$  via la sortiline et/ou le canal TREK-1). **L'objectif de ce doctorat était donc d'étudier les mécanismes de production et de libération du PE et de caractériser les effets de la spadine sur l'homéostasie glycémique.**

Dans les adipocytes 3T3-L1, nous avons montré que la production de PE est corrélée à l'expression de la sortiline lors de l'adipogenèse et lors de l'inflammation induite par le TNF $\alpha$ . Cependant, la sécrétion de PE semble être insensible à l'insuline.

A l'aide des cellules MIN6-B1, un modèle de cellules  $\beta$ , nous avons confirmé l'effet inhibiteur de la spadine sur les courants TREK-1. Nous avons également montré que la spadine induit une dépolarisation de la membrane plasmique et un influx calcique et qu'elle potentialise la sécrétion d'insuline induite par le KCl. *In vivo*, la spadine améliore la tolérance au glucose. En revanche, elle n'a pas d'effet sur le stockage de glucose dans les adipocytes 3T3-L1.

Ce travail de thèse montre le rôle de la spadine dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Si l'effet potentialisateur de la spadine sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose est confirmé, alors il pourrait présenter un intérêt pharmaceutique majeur dans le traitement du diabète de type 2.