



HAL
open science

Rôle du propeptide de la sortiline et de ses dérivés dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique

Guillaume Daziano

► To cite this version:

Guillaume Daziano. Rôle du propeptide de la sortiline et de ses dérivés dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6025 . tel-03595663

HAL Id: tel-03595663

<https://theses.hal.science/tel-03595663>

Submitted on 3 Mar 2022

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.

THÈSE DE DOCTORAT

Rôle du propeptide de la sortiline et de ses dérivés dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique

Guillaume DAZIANO

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - UMR7275 CNRS

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la Vie

et de la Santé d'Université Côte d'Azur

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Dirigée par : Dr. Thierry COPPOLA

Co-encadrée par : Dr. Patricia LEBRUN
D'AMBROSIO

Soutenu le : 3 décembre 2021

à l'IPMC, Valbonne Sophia Antipolis

Devant le jury, composé de :

Pr. Amar ABDERRAHMANI, PU, Université de Lille

Dr. Karim BOUZAKRI, Dir. CEED, Strasbourg

Dr. Thierry COPPOLA, CR, IPMC, Valbonne

Dr. Safia COSTES, CR, IGF, Montpellier

Dr. Emmanuel DEVAL, DR, IPMC, Valbonne

Pr. Jochen LANG, PU, Université de Bordeaux

Dr. Patricia LEBRUN D'AMBROSIO, MCU, IPMC, Valbonne

Rôle du propeptide de la sortiline et de ses dérivés dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique

Jury :

Président du jury

Dr. Emmanuel DEVAL, Directeur de Recherche, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) UMR7275 CNRS, 06560 Valbonne Sophia Antipolis.

Rapporteurs

Dr. Safia COSTES, Chargée de Recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) UMR 5203, 34094 Montpellier.

Dr. Karim BOUZAKRI, Directeur du Centre Européen d'Etude du Diabète (CEED), 67200 Strasbourg.

Examineurs

Pr. Amar ABDERRAHMANI, Professeur des Universités, Université de Lille, Institut d'Électronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) UMR 8520, 59652 Villeneuve-d'Ascq.

Pr. Jochen LANG, Professeur des Universités, Université de Bordeaux, Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) UMR 5248 CNRS, 33600 Pessac.

Directeurs de thèse

Dr. Patricia LEBRUN D'AMBROSIO, Maître de Conférences, Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) UMR7275 CNRS, 06560 Valbonne Sophia Antipolis.

Dr Thierry COPPOLA, Chargé de Recherche, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) UMR7275 CNRS, 06560 Valbonne Sophia Antipolis.

Résumé

En 2019, la Fédération Internationale du Diabète a révélé que près de 500 millions de personnes étaient atteintes de diabète dans le monde. On estime que cette incidence atteindra les 700 millions de personnes en 2045. Outre, l'aspect financier de la prise en charge, le diabète est un véritable enjeu de santé publique. En effet, l'environnement hyperglycémique délétère associé au diabète est à l'origine de graves complications pouvant altérer le fonctionnement de nombreux organes tels que le cœur, le cerveau ou encore le rein. La résistance à l'insuline associée à la détérioration de la sécrétion d'insuline et à la perte de la masse cellulaire bêta pancréatique constituent les principales caractéristiques du diabète de type 2. Ainsi, afin d'améliorer la prise en charge des patients diabétiques, l'identification d'une approche thérapeutique maîtrisée permettant de protéger la masse cellulaire bêta et de favoriser la sécrétion d'insuline uniquement en réponse au glucose et ce, sans effets secondaires, apparaît idéale.

Les précédents travaux du laboratoire ont identifié le PE endogène et ses dérivés synthétiques la Spadine et la Mini-Spadine comme des inhibiteurs sélectifs des canaux potassiques TREK-1 au fort potentiel antidépresseur et impliqués dans la sécrétion de sérotonine, la prolifération et la survie neuronale. Au niveau périphérique, la Spadine a été décrite *in vitro* et *in vivo* comme un peptide à l'effet incrétine comparable à celui de l'exendine-4, un antidiabétique couramment utilisé en clinique. Ainsi, à la suite de cette étude et par analogie aux effets protecteurs observés sur le neurone, nous avons émis l'hypothèse que le PE et ses dérivés pouvaient avoir un rôle bénéfique dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique.

Dans ce manuscrit, nous démontrons que le PE endogène et ses dérivés protègent les cellules bêta de l'apoptose induite par la présence chronique de l'interleukine pro-inflammatoire et diabétogène IL-1 β , ainsi que d'un choc toxique aigu induit par la staurosporine. De plus, l'analyse des mécanismes intracellulaires révèle que ces peptides provoquent une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, activent les voies prolifératives et de survie ERK et Akt, et maintiennent l'activité du facteur transcriptionnel CREB dans un environnement délétère via un mécanisme dépendant des calmodulines kinases.

Ainsi, ces travaux de thèse montrent que le PE et ses dérivés synthétiques protègent la cellule bêta pancréatique et initient des processus cellulaires vertueux par une voie de signalisation originale indépendante de la PKA, où le potentiel de membrane et le calcium occupent un rôle crucial. Ces données suggèrent le PE endogène et ses dérivés synthétiques comme une nouvelle classe de peptides protecteurs des cellules bêta pancréatiques.

Mots clés : Propeptide de la sortiline, TREK-1, cellule bêta, protection, calcium, CREB.

Abstract

In 2019, the International Diabetes Federation revealed that nearly 500 million people have diabetes worldwide. It is estimated that this incidence will reach 700 million people by 2045. In addition to the financial aspect of treatment, diabetes is a real public health issue. Indeed, the deleterious hyperglycemic environment associated with diabetes could induce serious complications, leading to a functional alteration of many organs such as the heart, the brain or the kidney. Insulin resistance associated with the deterioration of insulin secretion and the loss of pancreatic beta cell mass are the main characteristics of type 2 diabetes. Thus, in order to improve the management of diabetic patients, the identification of a controlled therapeutic approach to protect beta cell mass and promote insulin secretion only in response to glucose and without side effects, appears ideal.

The laboratory has identified the endogenous PE and its synthetic derivatives Spadin and Mini-Spadin as selective inhibitors of TREK-1 potassium channels. By this mechanism, the peptides showed also a strong antidepressant potential by modulating serotonin secretion, neuronal proliferation and survival. At the peripheral level, Spadin has been described *in vitro* and *in vivo* as a peptide with an incretin effect comparable to that of exendin-4, an antidiabetic commonly used in the clinic. Thus, following this study and by analogy to the protective effects observed on the neuron, we hypothesized that PE and its derivatives may have a beneficial role in the survival mechanisms in the pancreatic beta-cell.

In this thesis, we demonstrate that endogenous PE and its derivatives protect beta cells from apoptosis induced by the chronic presence of the pro-inflammatory and diabetogenic interleukin IL-1 β , as well as from an acute toxic shock induced by staurosporine. Furthermore, analysis of intracellular mechanisms reveals that these peptides cause an increase in intracellular calcium concentration, activate the ERK and Akt proliferative and survival pathways, and maintain CREB transcriptional factor activity in a deleterious environment via a calmodulin kinase-dependent pathway.

Thus, this work shows that PE and its synthetic derivatives protect the pancreatic beta-cell and initiate virtuous cellular processes through an original PKA-independent signaling pathway, where membrane potential and calcium play a crucial role. This suggests the sortilin-derived peptides as new class of pancreatic beta-cell protective molecules.

Keywords : Sortilin-released propeptide, TREK-1, beta-cell protection, calcium influx, CREB.

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci aux rapporteurs, Dr Safia Costes et Dr Karim Bouzakri. Merci aux examinateurs, Prof Amar Abderrahmani et Prof Jochen Lang. Enfin, merci au Dr Emmanuel Deval d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie sincèrement et chaleureusement mes directeurs de thèse, les Drs Patricia Lebrun et Thierry Coppola, pour tout ce qu'ils m'ont apporté, aussi bien sur le plan scientifique que personnel. Patricia, merci pour ton encadrement, ta patience, ta pédagogie et ta disponibilité pendant ces 3 années. Ta façon d'aborder les choses a grandement contribué à améliorer ma capacité d'organisation et de réflexion. Thierry, merci pour la richesse de ton enseignement scientifique. Grâce à toi, j'ai pu rapidement devenir autonome sur le plan expérimental. Malgré les différents épisodes que nous avons traversé durant mon séjour à l'IPMC (COVID et autres...), tu as été présent et disponible. C'est toujours un plaisir de discuter science avec toi...et rugby aussi. Même si tu supportes les mauvais rouges et noirs !

Je souhaite remercier tout particulièrement les Drs Catherine Heurteaux et Jean Mazella de m'avoir fait confiance et d'avoir fait en sorte que je puisse effectuer ma thèse au sein de leur équipe. Catherine, je vous remercie pour votre accueil et votre soutien durant mon doctorat. Jean, merci pour ces moments, ainsi que pour toute l'expertise technique et scientifique que tu m'as apporté durant ces années de thèse... Et aussi pour celle des mycètes !

Je remercie le Labex ICST ainsi que son directeur Dr Florian Lesage, pour le soutien financier grâce auquel j'ai pu réaliser ma thèse et mener à bien mon projet de recherche.

Je remercie également les membres de l'équipe, les Drs Nicolas Blondeau, Sophie Béraud-Dufour et Marc Borsotto. Nicolas, merci sincèrement pour tout ce temps que tu m'as accordé et qui a fortement contribué à ma formation scientifique. Grâce à toi, j'ai appris à mieux conceptualiser mes idées. Sophie, je te remercie pour ton soutien technique, ainsi que pour ta bonne humeur. Merci à vous Marc pour toutes ces discussions scientifiques et non-scientifiques. J'ai été ravi de pouvoir échanger quelques mots dans la langue de Mistral.

Ces années de thèse m'ont aussi permis de rencontrer de nombreuses personnes, dont certaines que je considère maintenant comme de véritables amis. Alors merci à vous les copains du B09, Marie, Ilona, Julie, Sébastien, Alberto, Marin, Joris et Thomas. Sans vous, ces 3 années n'auraient pas eu la même saveur. Merci pour votre soutien, pour ces grands débats post-prandiaux et pour tous ces moments passés ensemble, à l'IPMC et ailleurs. J'en profite également pour remercier les anciens résidents des locaux, Mariel et Veronika, pour leur accueil, leur affection et leur bonne humeur au quotidien.

Je tiens également à remercier spécialement et affectueusement ma famille et en particulier mes beaux-parents, ma mère et ma sœur pour leur présence et leurs encouragements. Léa, merci infiniment pour ton aide, ta patience, ton écoute et ton soutien inconditionnel depuis tant d'années.

Enfin, je remercie toutes les autres personnes que j'ai rencontré durant ce doctorat, qui ont contribué à enrichir cette expérience, aussi bien scientifiquement qu'humainement.

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique
AC : Adénylate Cyclase
ACC : Acyl-CoA Carboxylase
ACh : Acétylcholine
ACS : Acyl-CoA Synthétase
ADP : Adenosine DiPhosphate
AGL : Acide Gras Libres
ALA : Acide α -linoléinique
AMPc : AMP cyclique
AMPK : AMP Kinase
APO : Apolipoprotéine
ATP : Adenosine TriPhosphate
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BAD : BCL2 Associated of cell Death
BCAA : Branched-Chain Amino Acid
BCL2 : B-cell lymphoma 2
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
Ca²⁺ : Calcium (ion)
CaMK : Protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes
CPT-1 : Carnitine Palmitoyl Transférase 1
CREB : cAMP Response Element Binding protein
CRTC2 : CREB Regulated Transcription Coactivator 2
DAG : DiAcylGlycerol
DHA : Acide docosahexaénoïque
DPP-IV : DiPeptidyl-Peptidase-IV
DT1 : Diabète de Type 1
DT2 : Diabète de type 2

EPA : Acide eicosapentaénoïque

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

Ex-4 : Exendine-4

FAK : Focal Adhesion Kinase

FFAR : Free Fatty Acid Receptors

FID : Fédération Internationale du Diabète

G6P : Glucose-6-Phosphate

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GcgR : Récepteurs au glucagon

GCPG : récepteurs couplés aux protéines G

GDP : Guanosine DiPhosphate

GIP : Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide

GIRK : G-protein activated Inwardly Rectifying K⁺ current

GLP-1 : Glucagon Like Peptide-1

GLUT : GLUcose Transporter

Grb2 : Growth factor receptor binding protein 2

GRP : Gastrin Releasing Peptide

GRPP : Glycetin-Related PolyPeptide

GTP : Guanosine TriPhosphate

GTT : Glucose Tolerance Test

ICER : Inducible cAMP Early Repressor

IKK β : Inhibitor of Kappa B Kinase- β

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL-6 : Interleukine-6

IP-1/2 : Intervening Peptide-1/2

IP3 : Inositol 1,4,5 trisphosphate

IRS : Insulin Receptor Substrate

ISRS : Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine

ITT : Insulin Tolerance Test

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

K⁺ : Potassium (ion)

K2P : Canaux potassiques à deux domaines pore

K-ATP : Canal potassique sensible à l'ATP

Kir6.2 : K⁺ inward-rectifier 6.2

LDH : Lactate Déshydrogénase

LPL : LipoProtéine Lipase

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MPGF : Major ProGlucagon Fragment.

mTORC2 : mechanistic Target Of Rapamycin Complex

Na⁺ : Sodium (ion)

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NGF : Nerve Growth Factor)

NO : Oxyde Nitrique

NSF : N-ethylmaleimide-Sensitive Factor

NT : Neurotensine

NTSR : Récepteur de la neurotensine

p75NTR : p75 NeuroTrophin Receptor

PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide

PC : Prohormone Convertase

PDX-1 : Pancreatic and Duodenal homeoboX-1

PE : Propeptide de la sortiline

PH : Pleckstrin Homology

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PIP3 : Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-trisphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKB : Protéine Kinase B

PKC : Protéine Kinase C

PKG : Protéine Kinase G

PLC : Phospholipase C

PP : Polypeptide Pancréatique

RAP : Receptor-Associated Protein

RE : Réticulum Endoplasmique

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RyR : Ryanodine Receptor

SGLT2 : Sodium/GLucose coTransporteur 2

SNA : Système Nerveux Autonome

SNAP : Soluble NSF Attachment Protein

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor

SNC : Système Nerveux Central

SOS : Son Of Sevenless

SST : Sérotonine

SSTR : Récepteur de la sérotonine

SUR1 : Sulfonylurea Receptor 1

TNF α : Facteur de Nécrose Tumorale α

TREK-1 : TWIK1-related K⁺ channel

Ucn3 : Urocortine 3

UPR : Unfolded Protein Response

UPR : Unfolded Protein Response

VAMP : Vesicle Associated Membrane Protein

VDCC : Canaux calciques voltage-dépendants

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes généraux impliqués dans le contrôle de la glycémie.....	10
Figure 2 : Localisation et anatomie du pancréas humain.	12
Figure 3 : Comparaison de l'architecture d'un îlot de Langerhans humain et de rongeur.	13
Figure 4 : La maturation du glucagon.....	15
Figure 5 : La maturation de l'insuline.....	16
Figure 6 : La maturation de la somatostatine.	18
Figure 7 : Implication des hormones pancréatiques dans les voies d'utilisation et de stockage du glucose.....	19
Figure 8 : La régulation paracrine des cellules alpha, bêta et delta pancréatiques.	22
Figure 9 : Les voies de signalisation activées par le récepteur à l'insuline.....	23
Figure 10 : Origines et conséquences de la résistance à l'insuline.	26
Figure 11 : Représentation schématique de l'apparition progressive du diabète de type 2. .	29
Figure 12 : Prévalence actuelle et prévisionnelle du diabète chez l'adulte (20-79 ans).	31
Figure 13 : Représentation schématique de la sécrétion biphasique d'insuline induite par le glucose.....	38
Figure 14 : Les principales étapes de la machinerie d'exocytose.	40
Figure 15 : Résumé des différentes étapes impliquées dans la sécrétion d'insuline.	41
Figure 16 : Les effets de certains nutriments sur la sécrétion d'insuline.	44
Figure 17 : Les principales voies de signalisation impliquées dans le maintien d'une masse bêta pancréatique fonctionnelle.	53
Figure 18 : Tableau récapitulatif des effets des thérapies utilisées classiquement contre le diabète de type 2.	62
Figure 19 : Représentation schématique de la famille des récepteurs au domaine VSP10P. .	65
Figure 20 : Modélisation structurale du domaine extracellulaire de la sortiline.....	66
Figure 21 : Tableau récapitulatif des différents ligands de la sortiline/NTSR3.....	68
Figure 22 : Schéma de la structure commune à TREK-1 et aux autres canaux K2P.....	76
Figure 23 : Les régulations physiologiques et pharmacologiques de TREK-1.....	79
Figure 24 : La production du propeptide de la sortiline.	83
Figure 25 : Effet du propeptide (PE) sur l'activité de TREK-1.....	84
Figure 26 : Les séquences peptidiques du propeptide, de la Spadine et de la Mini-Spadine.	85
Figure 27 : La Mini-Spadine prévient la baisse d'activité CREB induite par la surexpression d'ICER dans des cellules INS-1E.....	116
Figure 28 : Représentation schématique des possibles rôles du PE.....	120

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	5
SOMMAIRE	6
INTRODUCTION.....	8
<i>I/ Le diabète de type 2, de la physiologie à la pathologie.....</i>	<i>8</i>
A) Les mécanismes généraux de l'homéostasie glucidique	8
1. La glycémie : Définition, régulation et organes impliqués	8
2. Le pancréas, un organe clé dans le contrôle de la glycémie.....	11
Structure et fonctions du pancréas.....	11
Le pancréas endocrine	12
3. Les hormones pancréatiques régulant la glycémie	14
Le glucagon	14
L'insuline	15
La somatostatine.....	17
La régulation paracrine intra-îlot	19
B) Rupture de l'homéostasie glucidique et pathogénèse du diabète de type 2	22
1. Insulinorésistance : Définition et mécanismes impliqués	22
2. Les mécanismes compensatoires de la masse cellulaire bêta endocrine fonctionnelle face à l'insulinorésistance.....	27
La plasticité morphologique.....	27
La plasticité fonctionnelle	28
3. Rupture des mécanismes compensatoires et apparition du diabète de type 2	30
Le diabète : définitions, répartition et origines.....	30
Les facteurs cellulaires et moléculaires conduisant au diabète de type 2	31
Les complications associées au diabète de type 2	34
<i>II/ Les mécanismes essentiels de maintien d'une masse cellulaire bêta pancréatique fonctionnelle.....</i>	<i>35</i>
A) Le couplage glucose-sécrétion d'insuline.....	35
1. Détection et transport du glucose.....	35
2. Métabolisme du glucose	36
3. Potentiel de membrane et flux calcique	37
4. Libération des granules contenant l'insuline.....	37
B) Les activateurs de la sécrétion d'insuline	41
1. Les nutriments.....	42
2. Les neurotransmetteurs	45
3. Les incrétines peptidiques.....	46
C) La signalisation intracellulaire impliquée dans le maintien d'une masse cellulaire bêta pancréatique fonctionnelle	47
1. La signalisation des récepteurs couplés aux protéines G	47
2. La signalisation calcique	48
3. Les sérine/thréonine kinases ERK1/2 et Akt.....	50
4. Le facteur de transcription CREB	52
<i>III/ La prise en charge actuelle du diabète de type 2</i>	<i>54</i>
A) La modification du mode de vie	54
1. L'alimentation	54
2. L'exercice physique	55
B) Les traitements médicamenteux actuels	56
1. Les insulino-sensibilisants	56
2. Les inhibiteurs de la réabsorption du glucose.....	57
3. Les insulino-sécréteurs gluco-indépendants	58
4. Les insulino-sécréteurs de type incrétine.....	59
<i>IV/ Le propeptide de la sortiline et ses dérivés, une approche innovante contre le diabète de type 2</i>	<i>63</i>
A) La sortiline ou récepteur 3 à la neurotensine (NTSR3).....	63

1. Généralités	63
2. Structure et distribution	64
3. Rôles biologiques de la sortiline	67
4. Dérégulation et pathologies associées	72
B) Le canal TREK-1, un partenaire essentiel de la sortiline	75
1. Généralités sur TREK-1	75
2. La régulation de TREK-1.....	76
3. Les outils pharmacologiques de TREK-1	77
4. Les rôles physiologiques et pathologiques de TREK-1	79
C) Le propeptide ou PE endogène	82
1. Le PE, un produit de maturation de la sortiline.....	82
2. Pharmacologie du PE et de ses dérivés synthétiques.....	83
D) Les propriétés bénéfiques du PE et de ses dérivés	85
1. Les effets au niveau central.....	85
2. Les effets sur la périphérie	87
LES OBJECTIFS DE LA THESE	89
RESULTATS ET DISCUSSION	90
<i>Projet : Rôle du propeptide de la sortiline et de ses dérivés, dans les mécanismes de survie de la cellule</i>	
<i>bêta pancréatique</i>	<i>90</i>
A) Contexte de l'étude.....	90
B) Résultats.....	91
C) Discussion générale.....	115
D) Conclusion et perspectives	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121

INTRODUCTION

I/ Le diabète de type 2, de la physiologie à la pathologie

A) Les mécanismes généraux de l'homéostasie glucidique

1. La glycémie : Définition, régulation et organes impliqués

Le glucose est un nutriment qui représente le principal carburant de l'organisme. Pendant la digestion, il est transporté dans le sang vers l'ensemble des cellules de l'organisme, pour y être soit utilisé pour la production d'énergie (production d'ATP), soit stocké sous différentes formes de réserves (glycogène, acides gras). Ces stocks sont mobilisables à tout moment en fonction des besoins de l'organisme. De fait, la concentration de glucose dans le sang (glycémie) varie entre des périodes de satiété (post-prandiale) et de jeûne. Chez l'Homme, la glycémie est comprise entre 0,60 et 1,10 g/L le matin à jeun, elle augmente fortement après un repas (hyperglycémie) mais ne doit pas dépasser 1,40 g/L deux heures après celui-ci (Source : Fédération Internationale du Diabète). Le maintien de cette glycémie est sous contrôle hormonal et fait intervenir plusieurs organes au niveau périphérique tels que :

Le pancréas endocrine : Il est reparti au sein du tissu exocrine sous forme d'amas de cellules appelés îlots de Langerhans. Ce tissu est une organisation complexe de plusieurs types de cellules endocrines qui sécrètent des hormones de façon régulée. Les îlots de Langerhans détectent les variations de la glycémie et répondent en libérant différentes hormones peptidiques : l'insuline, le glucagon et la somatostatine qui se coordonnent et entraînent soit une baisse, soit une augmentation de la glycémie. De plus, nous savons que ces îlots sécrètent également des neurotransmetteurs tels que le GABA et la sérotonine, qui participent à la régulation de la sécrétion des hormones pancréatiques (Almaça et al., 2016; Brereton et al., 2015; Campbell et al., 2020; Rorsman and Huising, 2018).

Les tissus adipeux blancs : Ils sont capables de stocker le glucose sous forme d'acides gras (triglycérides). L'insuline permet de faciliter le transport de glucose dans les adipocytes afin qu'il soit transformé en lipides. Les adipocytes possèdent également

une fonction endocrine régulant la dépense énergétique et la prise alimentaire. Par exemple, ils sécrètent de la leptine qui agit au niveau du système nerveux central et réduit la prise alimentaire (Longo et al., 2019; Scherer, 2006).

Les muscles squelettiques : Ils participent à l'appareil locomoteur de l'organisme, sont de grands consommateurs de glucose pendant un effort physique. Ils assurent également le stockage d'environ 80% du glucose apporté par l'alimentation principalement sous forme de glycogène (Yang, 2014). Le stockage du glucose est sous le contrôle de l'insuline, comme pour les adipocytes. De manière intéressante, le muscle possède également des propriétés endocrines. Par exemple lors de l'exercice physique, il sécrète des molécules appelées « exerkinines » (Fractalkine, IL-6, ostéoprotégerine, exosomes, ...) qui sont impliquées dans la communication inter-organe et ont un rôle bénéfique dans le contrôle de l'homéostasie glucidique (Langlois et al., 2021a).

Le foie : Il maintient la glycémie à un niveau homéostatique principalement en diminuant sa production de glucose en période post-prandiale et en produisant du glucose (glucogénèse) pendant une période de jeûne à partir des stocks mobilisables de glycogène (glycogénolyse) ou à partir de précurseurs non-glucidiques (néoglucogénèse) (Klover and Mooney, 2004; Pilkis and Granner, 1992).

Le rein : C'est un organe capable de produire du glucose par néoglucogénèse au niveau du cortex rénal. Il participe également à la réabsorption du glucose présent dans le sang lors de la filtration glomérulaire. Ainsi dans des conditions physiologiques, l'urine ne contient pas de glucose. Ces mécanismes participent au maintien de la glycémie, notamment pendant des périodes de jeûne (DeFronzo et al., 2012; Girard, 2013).

Ainsi, d'une manière générale, lorsque la glycémie varie au cours de la journée, la sécrétion adaptée des hormones pancréatiques va permettre le stockage ou la libération de glucose dans le sang par les principaux tissus insulinosensibles cités ci-dessus (Figure 1). Cela permet le maintien d'une glycémie normale (environ 1g/L), également appelée normo-

glycémie. Lorsque les valeurs de la glycémie sortent de cette gamme, on parle d'hypoglycémie (<0.6g/L), ou d'hyperglycémie (>1.10g/L).

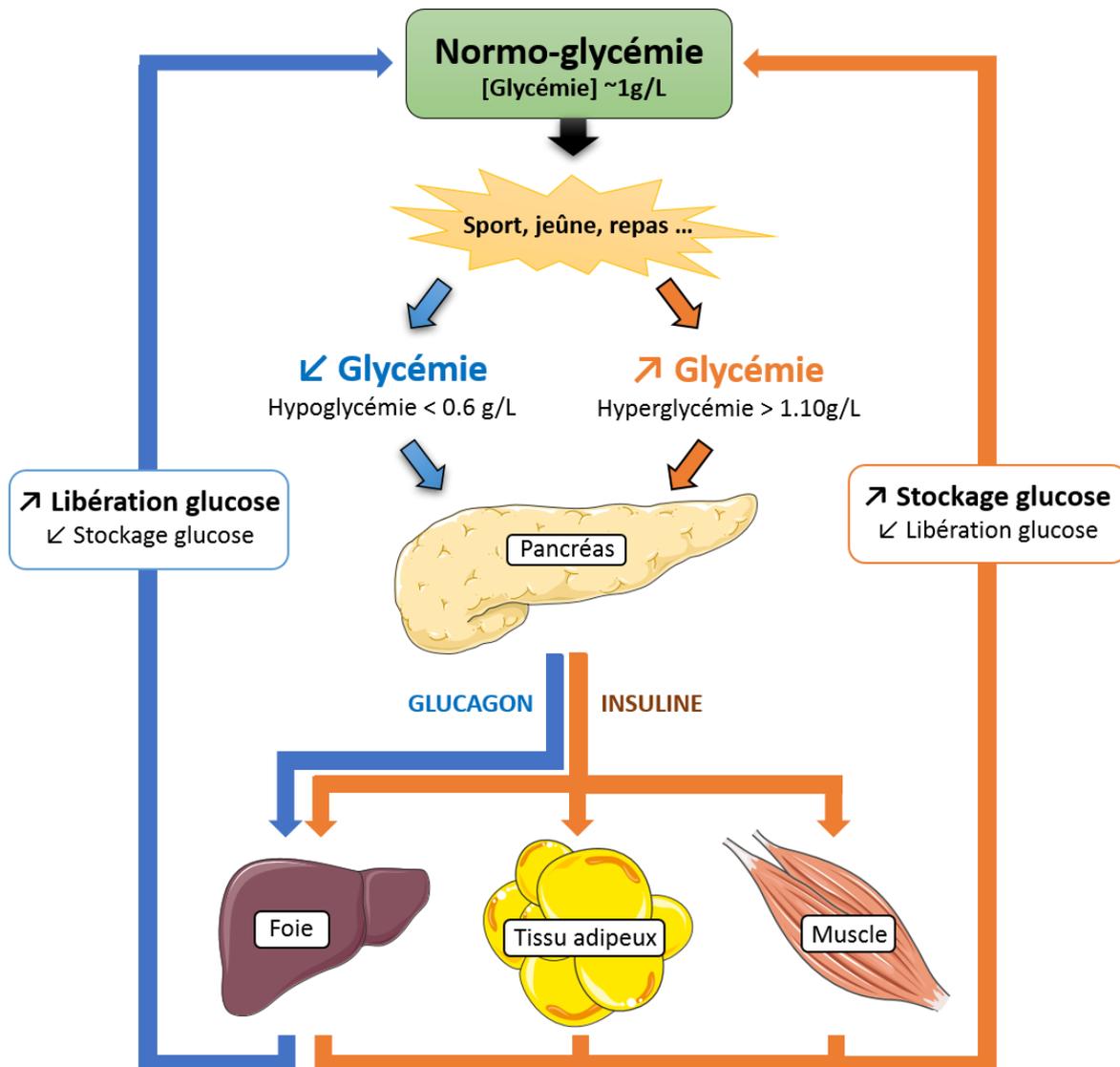


Figure 1 : Mécanismes généraux impliqués dans le contrôle de la glycémie.

Chez un individu sain, la concentration de glucose dans le sang à jeun se situe autour de 1g/L de plasma. Différents évènements au cours de la journée font varier la glycémie, qui malgré tout reste stable. Cette régulation est sous le contrôle hormonal du pancréas et fait intervenir d'autres organes tels que le foie, le muscle, le tissu adipeux. L'ensemble de ces organes se coordonnent pour permettre le retour de la glycémie à des valeurs physiologiques. L'insuline (en orange), libérée lorsque la glycémie augmente (hyperglycémie), favorise le stockage de glucose, alors que le glucagon (en bleu), sécrété en réponse à une baisse de la glycémie (hypoglycémie) entraîne une production de novo de glucose, notamment via la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatique. La figure a été créée en utilisant des images provenant de Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>) (Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

2. Le pancréas, un organe clé dans le contrôle de la glycémie

Structure et fonctions du pancréas

Le pancréas est un organe de forme allongée et diffuse (chez l'homme) qui est situé dans la cavité abdominale. Il est en contact avec le duodénum et se trouve à proximité de la rate (Motta et al., 1997). On distingue sur le pancréas 4 principales parties qui sont : la tête, l'isthme (ou le col), le corps et la queue (Figure 2). Pour l'essentiel (95% de sa masse), il est composé d'un tissu exocrine qui produit et transporte des enzymes qui participent à la digestion des nutriments (trypsine, chymotrypsine...). Toutes les parties du pancréas sont traversées par des conduits pancréatiques qui collectent les sucs digestifs produits par les cellules acineuses et les amènent jusqu'à la tête du pancréas. Lors d'un repas, les contractions musculaires du sphincter d'Oddi permettent la libération de ce bol de substances digestives dans le duodénum. Cela représente une étape essentielle de la digestion (Betts et al., 2013; Standing et al., 2016).

Le pancréas est une glande amphicrine, ce qui signifie qu'en plus de sa fonction exocrine, il possède une fonction endocrine. En effet, comme le montre la figure 2, de petites structures cellulaires appelées îlots de Langerhans se distinguent parmi les cellules du tissu exocrine. Ces îlots, composés de cellules endocrines, ne représentent qu'entre 1 et 2% de la masse du pancréas (Cerasi and Ktorza, 2007). Ces cellules sécrètent des hormones spécifiques qui ont un rôle crucial dans le maintien de la glycémie. C'est le pancréas endocrine.

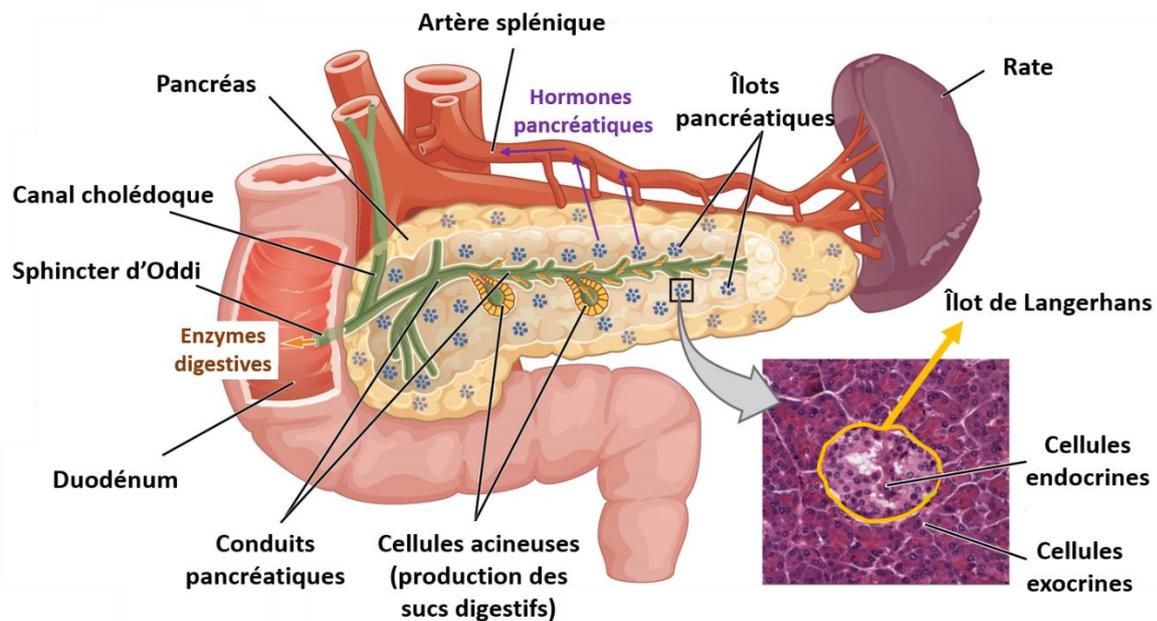


Figure 2 : Localisation et anatomie du pancréas humain.

Ce schéma représente les principales structures impliquées dans les deux grandes fonctions exocrine et endocrine du pancréas. Alors qu'environ 98% de la masse du pancréas est dédiée à la digestion, de petits amas de cellules endocrines forment ce que l'on appelle des îlots de Langerhans. Ces îlots, composés de cellules endocrines, occupent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie glucidique. Image modifiée à partir de (Betts et al., 2013).

Le pancréas endocrine

Les îlots de Langerhans sont constitués de différents types cellulaires qui ont chacun une fonction endocrine spécialisée dans le contrôle de la glycémie (Hinrichsen, 1997; Röder et al., 2016). Les îlots constituent 1 à 2 % de la masse totale du pancréas chez la plupart des mammifères à l'âge adulte. La majorité du tissu endocrine (environ 65-80%) est composé de cellules bêta sécrétrices d'insuline. Les cellules alpha, représentent 15-20% du pancréas endocrine et produisent le glucagon. Les cellules delta et gamma, représentent chacune 3 à 5% du pancréas endocrine et produisent respectivement, la somatostatine (inhibe la sécrétion de nombreuses hormones) et le polypeptide pancréatique (PP) (régule la prise alimentaire et la dépense énergétique). Enfin, les cellules epsilon représentent moins de 1 % de l'îlot et libèrent de la ghréline, une hormone qui stimule la prise alimentaire, le dépôt de graisse et la sécrétion d'hormones de croissance (Batterham et al., 2003; Müller et al., 2015; Röder et al., 2016; Rorsman and Huising, 2018).

La répartition et le nombre de cellules au sein de l'îlot peut varier en fonction de l'espèce. Par exemple, chez la souris les cellules bêta sont plutôt localisées au centre de l'îlot et sont plus nombreuses que chez l'homme (Figure 3). Les cellules alpha et delta sont elles majoritairement situées sur la périphérie de l'îlot de souris alors que chez l'homme, elles sont dispersées dans l'îlot. A noter que les cellules alpha semblent être plus nombreuses dans l'îlot humain (Figure 3) (Abdulreda et al., 2013; Campbell and Newgard, 2021). D'une manière générale, les îlots pancréatiques possèdent une riche vascularisation, à tel point qu'on les considère comme des micro-organes. Ainsi l'organisation spatiale spécifique combinée à l'architecture vasculaire sont essentielles pour la fonction endocrine et permettent une fine communication intra-îlot (Brereton et al., 2015). Cette coordination implique de nombreuses protéines telle que la connexine 36 qui relie les cellules entre-elles, ce qui joue un rôle important dans l'exocytose d'insuline (Ravier et al., 2005).

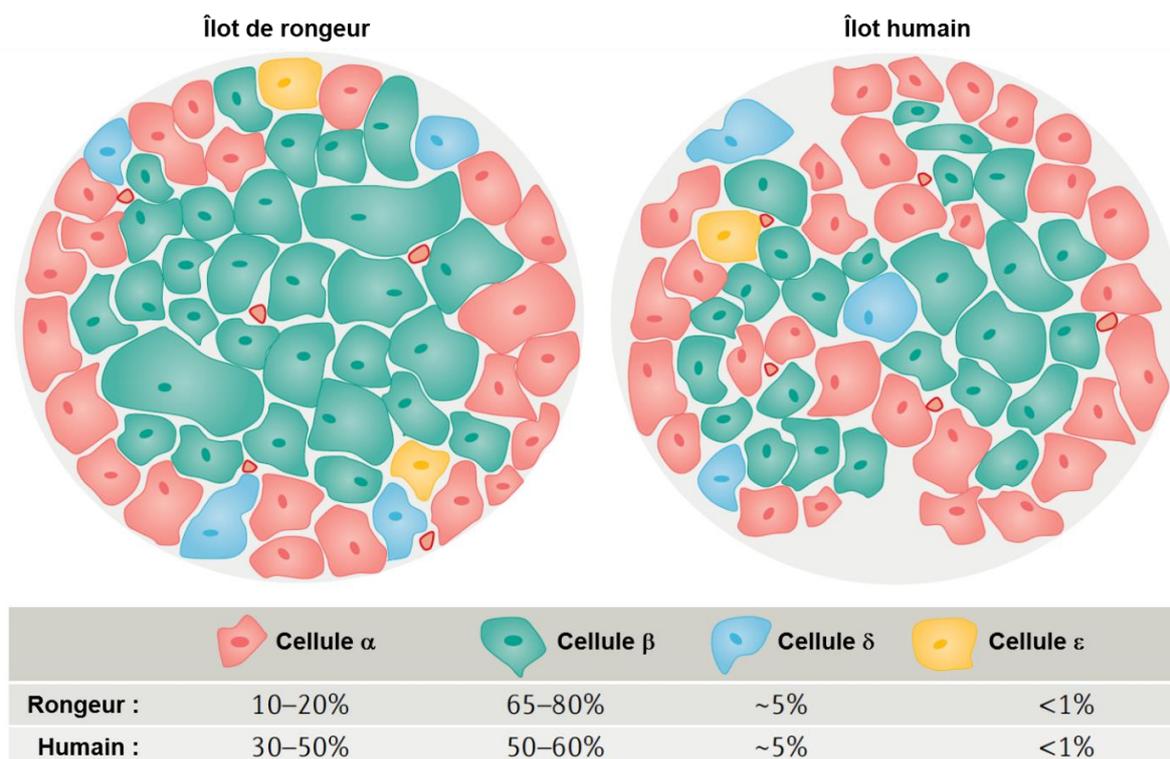


Figure 3 : Comparaison de l'architecture d'un îlot de Langerhans humain et de rongeur.

Chez le rongeur, les cellules β sont principalement situées au centre de l'îlot pancréatique et les cellules α sont plutôt localisées sur le manteau externe. En comparaison, chez l'homme, les cellules β sont moins nombreuses et les cellules α plus nombreuses. Egalement, l'ensemble des cellules pancréatiques qui compose l'îlot humain est dispersé au sein du tissu endocrine. D'après (Campbell and Newgard, 2021).

3. Les hormones pancréatiques régulant la glycémie

Le glucagon

Le glucagon est un polypeptide de 29 acides aminés, sécrété par les cellules alpha pancréatiques en réponse à une diminution de la glycémie. A l'état basal, la concentration de glucagon dans le sang est assez faible, en revanche ce taux est augmenté d'un facteur 2 à 3 en condition d'hypoglycémie (Campbell and Drucker, 2015). Historiquement, le glucagon a été découvert en 1923 au cours de la purification de l'insuline, où il a été identifié comme un facteur contaminant hyperglycémique (Finan et al., 2020; Pincus, 1953). Le glucagon dérive de son précurseur, le pro-glucagon. Ce dernier est exprimé dans les cellules alpha pancréatiques, les cellules intestinales L entéroendocrines, mais aussi plus faiblement dans les neurones de la zone hypothalamique et du tronc cérébral (Rix et al., 2019). Lors de sa maturation, le pro-glucagon est clivé par les prohormones convertases PC1/3 ou PC2 en fonction du tissu (Figure 4). Cette maturation tissu-spécifique permet d'obtenir du glucagon biologiquement actif, mais également d'autres peptides tels que le GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1), le GLP-2 (Glucagon Like Peptide-2), l'oxyntomoduline, la glicentine, les IP-1 et 2 (Intervening Peptide-1 et 2) ou encore le MPGF (Major ProGlucagon Fragment). Ces peptides ont des rôles dans différents processus physiologiques comme la prise alimentaire, l'homéostasie glucidique, la fonction digestive ou encore le maintien de la densité osseuse (Cohen et al., 2003; Raffort et al., 2017; Sinclair and Drucker, 2005). Il est à noter que de récents travaux montrent que PC1/3 est présente dans les cellules alpha pancréatiques humaines (Campbell et al., 2020). Cela peut notamment expliquer la capacité de ces cellules à sécréter du GLP-1. Le GLP-1 et ses fonctions dans l'homéostasie glucidique seront abordés plus en détail dans les parties suivantes.

Le récepteur du glucagon est un récepteur couplé aux protéines G fortement exprimé dans le foie, mais aussi dans d'autres tissus tels que les reins, le cœur, le tractus gastro-intestinal, le tissu adipeux, le cerveau et la rate (Watanabe et al., 1998). Dans la cellule hépatique, la liaison du glucagon à son récepteur stimule la production de glucose en activant les voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse, et inhibe la glycolyse et la glycogénogénèse (utilisation et stockage du glucose) (Kulina and Rayfield, 2016). Ces

mécanismes induisent une augmentation de la glycémie, permettant ainsi dans des conditions hypoglycémiantes (jeûne, stress, sport) le maintien d'une glycémie physiologique.

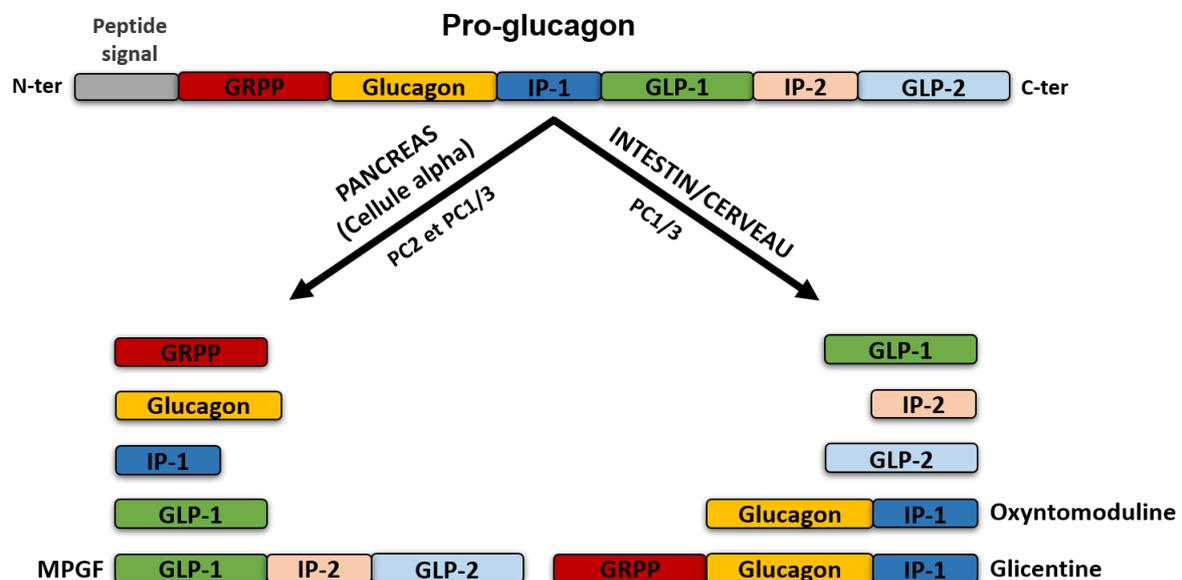


Figure 4 : La maturation du glucagon.

Ce schéma récapitule les différents peptides obtenus à partir de la maturation du pro-glucagon dans le pancréas et dans l'intestin/cerveau. En fonction du tissu, cette maturation fait intervenir les prohormones convertases PC1/3 ou PC2. GRPP (Glycintin-Related PolyPeptide); IP-1/2 (intervening peptide-1/2); MPGF (Major ProGlucagon Fragment). D'après (Rix et al., 2019).

L'insuline

L'insuline est un polypeptide de 6 kDa produit dans le réticulum endoplasmique de la cellule bêta pancréatique sous la forme d'un précurseur, la pré-pro-insuline. La première étape de maturation, réalisée par la signal-peptidase, permet l'élimination du peptide signal situé en N-terminal, c'est la pro-insuline (Figure 5). Au niveau du trans Golgi, cette pro-forme est placée dans des granules immatures. L'acidification progressive du milieu intra-granulaire déclenche ensuite la conversion de la pro-insuline en insuline mature, grâce à l'action des protéines convertases (PC1/3 et PC2) et d'une carboxypeptidase E (CPE), qui libèrent le peptide C et génèrent une forme bioactive de l'insuline, composée de deux chaînes peptidiques reliées entre-elles par deux ponts disulfures (Figure 5) (Patzelt et al., 1978; Ryle et al., 1955; Steiner et al., 2009). De plus, le pH acide déshydrate la granule, ce qui diminue la solubilité de l'insuline mature et favorise la formation d'hexamères qui s'agrègent et génèrent un cristal d'insuline (Hou et al., 2009). Cette propriété permet notamment de stocker une

grande quantité d'insuline mature. Ces granules d'insuline mature sont dits à cœur dense et mesurent entre 200 et 500nm de diamètre (Dean, 1973).

À la suite d'une augmentation de la glycémie, l'insuline est libérée dans la circulation sanguine et agit sur différents types cellulaires, en liant son récepteur spécifique. Le récepteur à l'insuline est un récepteur à activité tyrosine kinase exprimé dans de nombreux tissus dont le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. La liaison de l'insuline à son récepteur favorise l'absorption et le stockage du glucose par les muscles squelettiques et le tissu adipeux en activant les voies de la glycogénèse et de la lipogenèse, et réduit la production hépatique de glucose en inhibant la glycogénolyse et la néoglucogenèse (Barreto et al., 2010; Boucher et al., 2014; Pessin and Saltiel, 2000). Ces mécanismes permettent ainsi de maintenir une glycémie physiologique en favorisant la clairance du glucose sanguin après un repas.

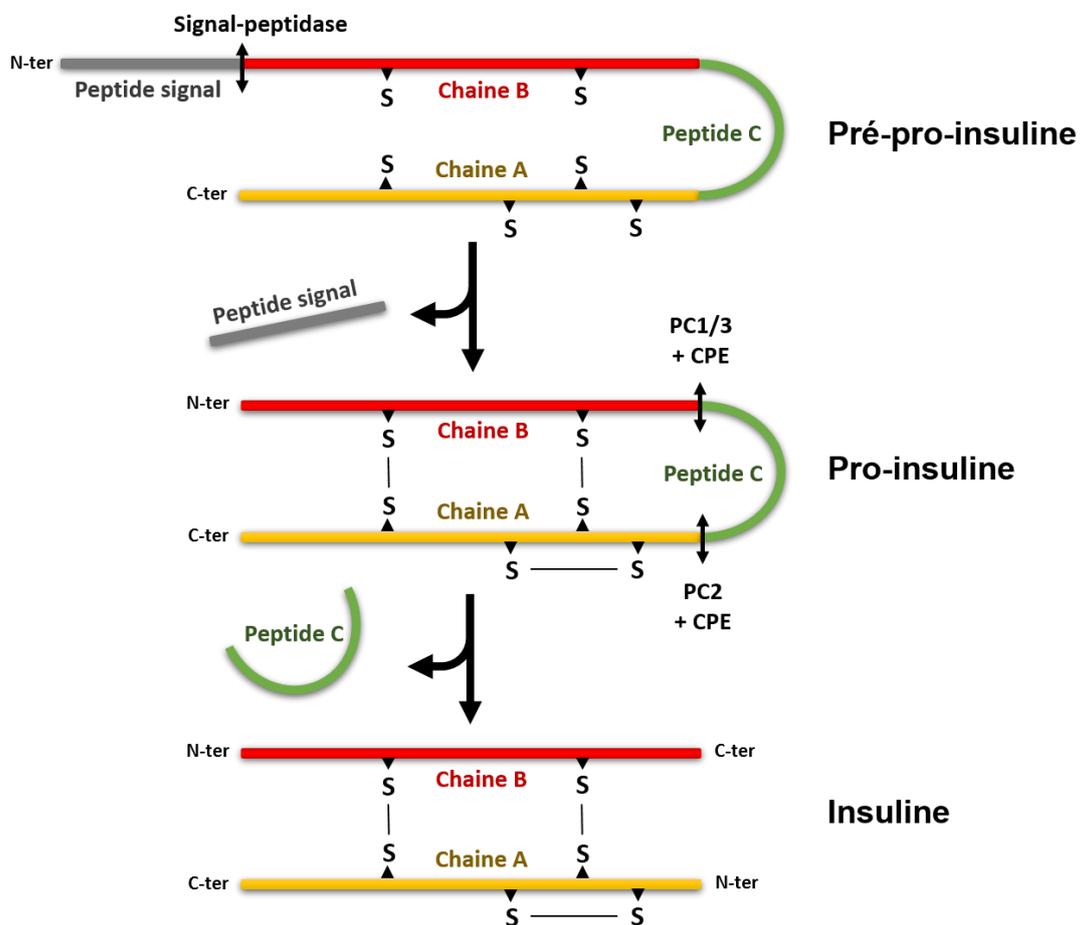


Figure 5 : La maturation de l'insuline.

Représentation schématisée des différentes étapes de maturation de l'insuline dans la cellule bêta pancréatique. La première étape de la maturation par la signal-peptidase permet l'élimination du peptide signal. Ensuite, les endopeptidases PC1/3 et PC2 (Protein Convertase 1/3 et PC2) et la carboxypeptidase E (CPE) permettent le clivage du peptide C, formant ainsi une forme bioactive de l'insuline, constituée de deux chaînes peptidiques A et B, reliées entre elles par des ponts disulfures. D'après (Kaufman, 2011).

La somatostatine

La somatostatine est un polypeptide qui a historiquement été identifié dans le cerveau comme un inhibiteur de la libération de l'hormone de croissance (GH) hypophysaire (Brazeau et al., 1973). Elle a ensuite été localisée dans d'autres tissus tels que le tractus gastro-intestinal et le pancréas (Brereton et al., 2015). La somatostatine est issue de la maturation du précurseur pré-pro-somatostatine qui est clivé en pro-somatostatine. La pro-somatostatine est ensuite maturée par protéolyse par une enzyme de type trypsine. En fonction du tissu, cette maturation est différente, et on obtient soit de la somatostatine-28 (28 acides aminés), soit de la somatostatine-14 (14 acides aminés) (Figure 6). Bien que de tailles différentes, ces formes actives de la somatostatine ont des fonctions biologiques similaires. La somatostatine-28 est majoritairement présente dans le système nerveux central, alors que la somatostatine-14 est retrouvée principalement au niveau périphérique dans l'intestin et le pancréas. En effet, dans le pancréas endocrine, c'est la cellule delta qui produit et sécrète la somatostatine-14 en réponse à une augmentation de la glycémie (Brereton et al., 2015). La fixation de la somatostatine sur ses récepteurs présents à la surface des cellules alpha et bêta pancréatiques, inhibe respectivement la sécrétion de glucagon et d'insuline (Brereton et al., 2015; Hartig and Cox, 2020; Rorsman and Huising, 2018). Il existe 5 sous types de récepteurs de la somatostatine qui ont chacun des voies de signalisation spécifiques. L'inhibition de la libération d'insuline par la somatostatine peut sembler paradoxale en condition d'hyperglycémie. Il s'agit néanmoins d'un mécanisme régulateur essentiel, empêchant une sécrétion exacerbée de glucagon ou d'insuline.

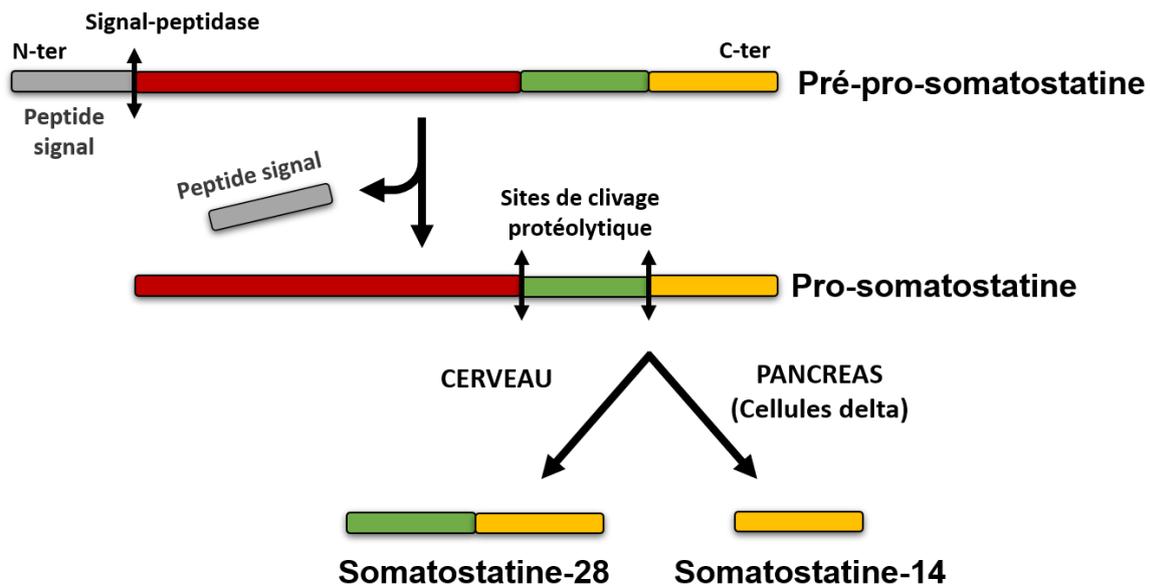


Figure 6 : La maturation de la somatostatine.

Ce schéma représente les grandes étapes de la formation des formes bioactives de la somatostatine dans le cerveau et le pancréas. La première étape de la maturation par la signal-peptidase permet l'élimination du peptide signal. Ensuite, des enzymes de type trypsine clivent la pro-somatostatine et permettent d'obtenir deux formes bioactives : La somatostatine-28 (28 acides aminés) et la somatostatine-14 (14 acides aminés). En fonction du tissu, on retrouve majoritairement une forme ou l'autre.

Les hormones pancréatiques gèrent l'essentiel des voies de dégradation, de stockage et de production du glucose. La figure 7 résume les principales voies du métabolisme glucidique gouvernées par les hormones pancréatiques. Dans tous les cas, l'insuline est hypoglycémiant et le glucagon hyperglycémiant.

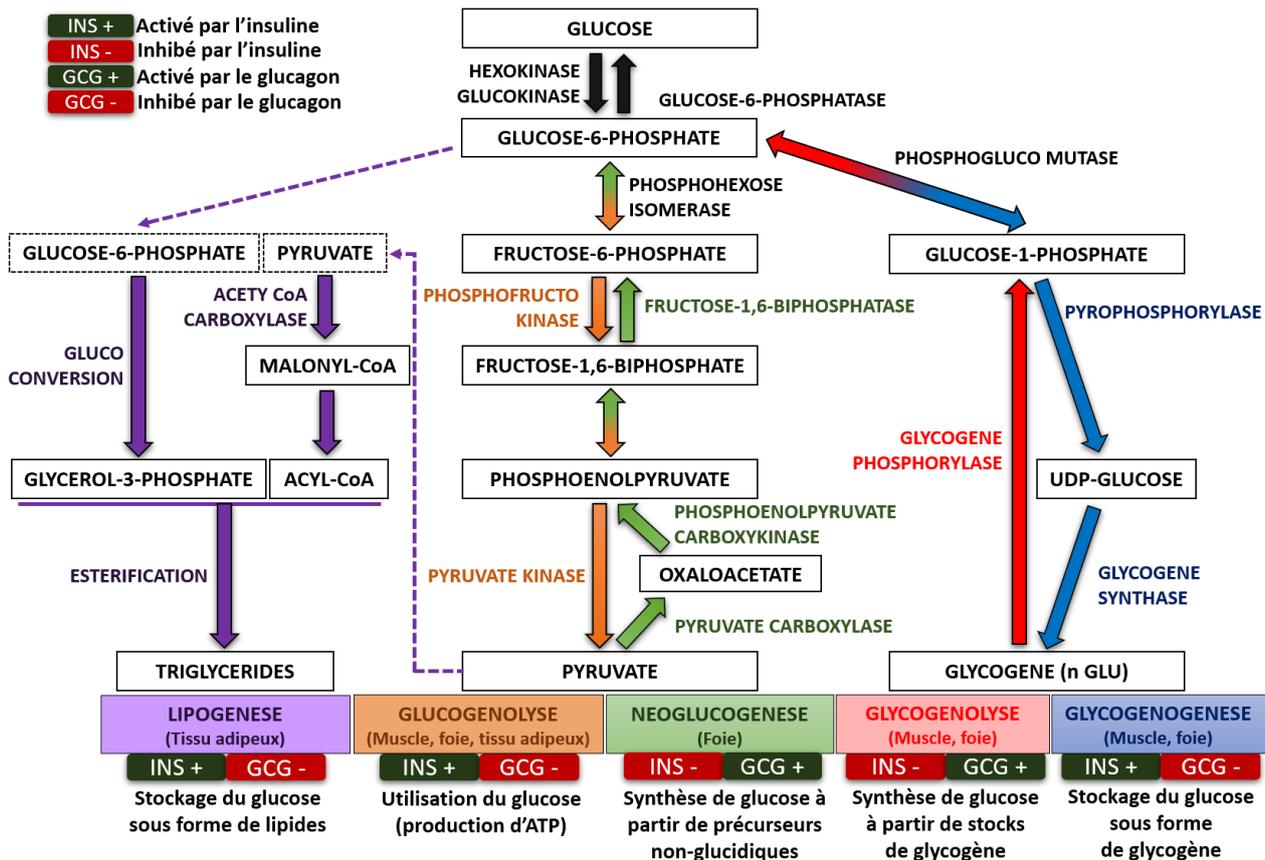


Figure 7 : Implication des hormones pancréatiques dans les voies d'utilisation et de stockage du glucose.

La lipogenèse (en violet) est une voie qui, en réponse à l'insuline, entraîne le stockage de glucose sous forme de lipides dans les adipocytes. La glucogénolyse (en orange) est la voie commune à toutes les cellules permettant la production d'ATP à partir de glucose. La néoglucogénèse (en vert) est une voie retrouvée dans les cellules hépatiques conduisant à la synthèse de novo de glucose à partir de précurseurs non-glucidiques. La glycogénolyse (en rouge) favorisée par le glucagon, est une voie qui permet la synthèse de glucose à partir des stocks de glycogène. La glycogénogenèse (en bleu) permet, sous l'action de l'insuline, le stockage de glucose sous forme de glycogène.

La régulation paracrine intra-îlot

Les différentes hormones que nous venons de voir possèdent des effets biologiques spécifiques, pouvant être complètement opposés. Elles sont toutes sécrétées par les cellules qui composent le pancréas endocrine (cellules alpha, bêta et delta pancréatiques). Ainsi, il est essentiel que cette sécrétion soit coordonnée. Cette coordination tissulaire permet notamment de répondre rapidement à la variation de la glycémie, et ce, grâce à une communication paracrine finement régulée (Figure 8) (Brereton et al., 2015).

Comme vu précédemment, lorsque la glycémie diminue en dessous d'un certain seuil, la sécrétion de glucagon permet de maintenir une concentration physiologique de glucose en favorisant sa synthèse à partir de stocks glucidiques et non glucidiques. En plus de cette action endocrine, le glucagon agit également en paracrine et notamment sur la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques. Contrairement à ce que l'on pourrait penser compte-tenu des propriétés antagonistes de ces deux hormones, le glucagon favorise la sécrétion d'insuline (Huising, 2020). En effet, le glucagon agit sur la cellule bêta en liant principalement deux types de récepteurs aux protéines G, les récepteurs au glucagon (GcgR) mais également avec une moindre affinité les récepteurs au GLP-1 (GLP-1R) (Hartig and Cox, 2020). La liaison du glucagon active l'adénylate cyclase, via les protéines Gs stimulatrices et entraîne une production d'AMP cyclique. L'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc induit un effet potentialisateur d'exocytose des granules contenant l'insuline. En plus de ces effets directs sur la sécrétion, l'AMPc a également des effets bénéfiques à plus long terme, notamment grâce l'activation de facteurs de transcription. Parmi eux, le facteur « c-AMP Response Element-binding protein » (CREB) est impliqué dans la survie, la différenciation et la fonction de la cellule bêta pancréatique (Hartig and Cox, 2020; MacDonald et al., 2002). Les effets du glucagon sont donc semblables à ceux du glucagon-like peptide 1 (GLP-1), qui est un peptide produit à partir du précurseur du glucagon par les cellules L entéroendocrines (intestin grêle) (voir figure 4) (MacDonald et al., 2002). Il s'agit d'une hormone incréatine qui est capable de potentialiser l'effet du glucose sur la libération d'insuline mais ne provoque pas de sécrétion d'insuline *per se*. De manière intéressante, il a été montré chez l'homme, que les cellules alpha produisent également du GLP-1, et que le nombre de ces cellules productrices de GLP-1 est augmenté en cas de diabète de type 2 (Campbell et al., 2020). Le glucagon et le GLP-1 agissent également sur les cellules delta pancréatiques, en potentialisant la libération de somatostatine. Cependant, en contraste aux effets observés sur la cellule bêta, le glucagon aurait un effet inhibiteur sur la prolifération de la masse cellulaire delta pancréatique chez la souris (Gelling et al., 2003).

La sécrétion de glucagon est régulée par le glucose (agit par rétrocontrôle négatif), mais aussi par des modulateurs paracrines comme l'insuline ou la somatostatine, qui sont libérés en hyperglycémie (Bansal and Wang, 2008; Kulina and Rayfield, 2016). Quand la glycémie est revenue à sa valeur de référence, la sécrétion de glucagon cesse.

La somatostatine inhibe la sécrétion d'insuline et de glucagon via des mécanismes relativement similaires. En effet, la liaison de la somatostatine sur les cellules alpha et bêta active une protéine G inhibitrice qui diminue drastiquement la capacité des cellules à sécréter leurs hormones. La concentration intracellulaire d'AMPc diminue, ce qui provoque une diminution de ses effets potentialisateurs. On a ici un effet inverse à l'effet incrétine et la diminution de l'activité de la PKA sur ses cibles, comme les canaux ioniques, provoque une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Il a également été montré que la somatostatine active des canaux de type *G-protein activated Inwardly Rectifying K+ current* (GIRK) ce qui provoque une importante sortie d'ions K⁺. Cela aboutit à une hyperpolarisation de la membrane plasmique, mettant la cellule en quiescence sécrétoire (Hartig and Cox, 2020). Les travaux réalisés à l'aide d'îlots humains, montrent que la SST, essentiellement par le biais de son récepteur SSTR2, active les courants sortant de canaux K⁺ GIRK et inhibe des courants calciques de types P/Q (Kailey et al., 2012).

Enfin, l'insuline agit également sur la cellule alpha, via son récepteur spécifique, et inhibe les mécanismes essentiels à la sécrétion de glucagon, notamment en activant la phosphodiesterase 3B, qui va dégrader l'AMPc cytosolique et diminuer l'activité PKA (Elliott et al., 2015). De plus, l'urocortine 3 (Ucn3) et le neurotransmetteur GABA qui sont exprimés dans la cellule bêta et co-sécrétés avec l'insuline, potentialisent l'effet positif du glucose sur la libération de somatostatine (Rorsman and Huising, 2018).

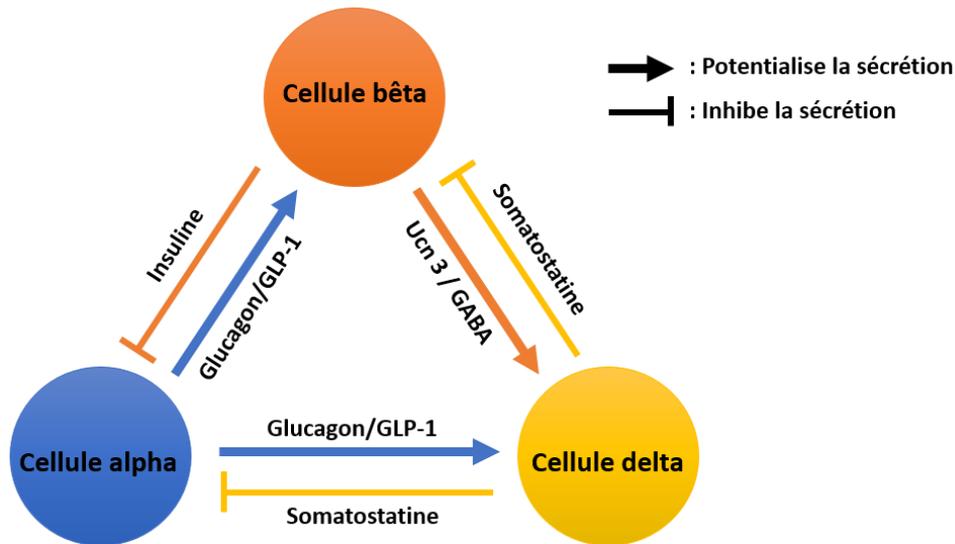


Figure 8 : La régulation paracrine des cellules alpha, bêta et delta pancréatiques.
 GLP-1 : *Glucagon-like peptide-1*; Ucn 3 : *Urocortine 3*; GABA : *Acide gamma-aminobutyrique*.

B) Rupture de l'homéostasie glucidique et pathogénèse du diabète de type 2

1. Insulinorésistance : Définition et mécanismes impliqués

Dans des conditions physiologiques, la liaison de l'insuline sur son récepteur à activité tyrosine kinase entraîne l'autophosphorylation de ce dernier et permet le recrutement des protéines substrats du récepteur de l'insuline (principalement IRS1 et IRS2). Les IRS (Insulin Receptor Substrate), ancrés à la membrane plasmique par leur domaine PH (Pleckstrin Homology), sont phosphorylés par le récepteur à l'insuline et recrutent à leur tour des protéines possédant un domaine SH2 (domaine de liaison aux tyrosines phosphorylées) telles que la protéine Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) et la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) (De Meyts, 2016; Petersen and Shulman, 2018). Ces protéines (Grb2 et PI3K) constituent le point départ de deux voies de signalisation canoniques de la réponse à l'insuline. Une fois activée, la PI3K catalyse la conversion du Phosphatidyl-Inositol 4,5-bisphosphate (PIP2) de la membrane plasmique en Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) qui recrute les activateurs de la protéine kinase B (PKB) ou Akt (Manning and Toker, 2017). L'activation de cette voie PI3K/Akt joue un rôle majeur puisqu'elle facilite d'une part l'entrée du glucose dans les adipocytes et les cellules musculaires par translocation du transporteur au glucose GLUT-4 à la membrane plasmique,

et d'autre part l'expression et l'activation de nombreuses protéines telles que des enzymes, des facteurs de transcription, ou des protéines anti-apoptotiques (Boucher et al., 2014). La deuxième voie canonique de la signalisation à l'insuline est la voie Grb2/MEK/ERK. En effet, la phosphorylation de la protéine adaptatrice Grb2 par le récepteur à l'insuline active le facteur d'échange nucléotidique guanylique SOS (Son Of Sevenless), qui active à son tour la petite protéine G Ras. Ras active ensuite les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) de type ERK1 et 2, via la voie de signalisation Ras/Raf/MEK. La voie Grb2/MEK/ERK est notamment impliquée dans l'expression et l'activation de protéines jouant un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Boucher et al., 2014; De Meyts, 2016; Petersen and Shulman, 2018).

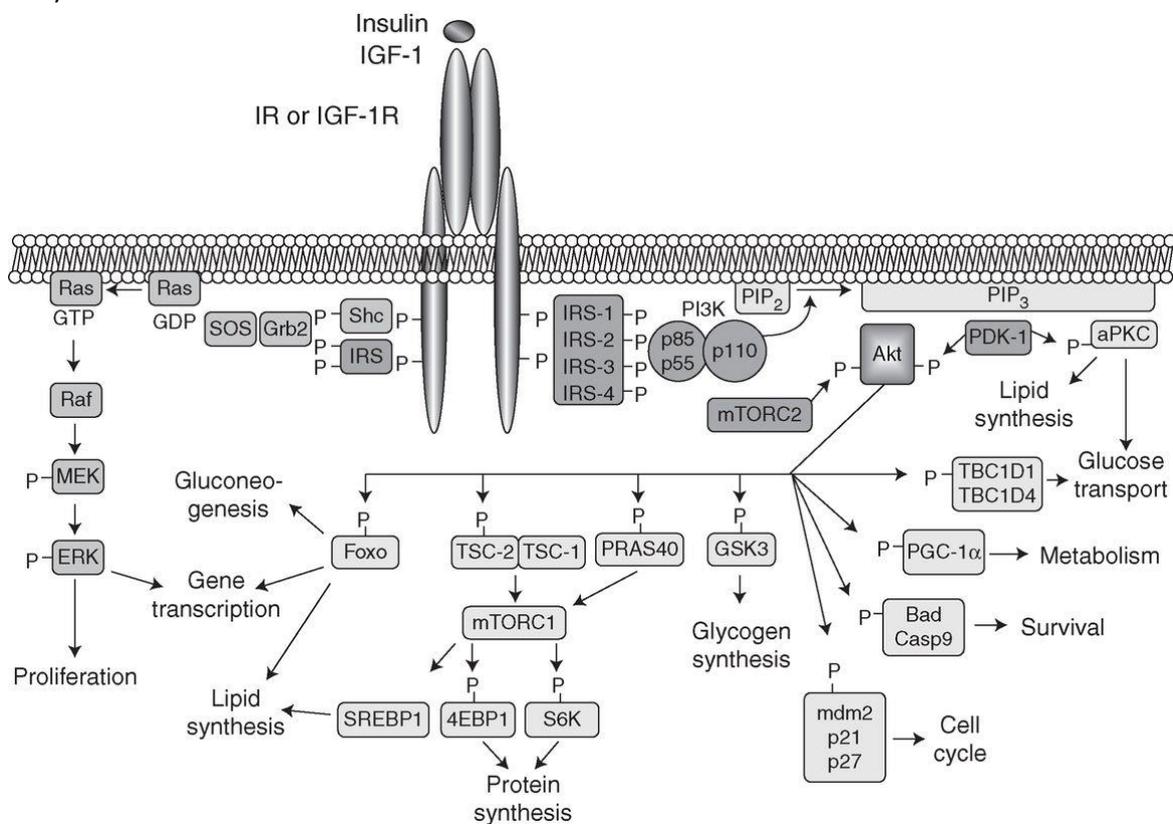


Figure 9 : Les voies de signalisation activées par le récepteur à l'insuline.

La liaison de l'insuline sur son récepteur (IR ou IGF-1) déclenche un changement de conformation et une autophosphorylation de ce dernier. Cela entraîne le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS et Shc. Alors que la protéine Shc active la voie Grb2-SOS-Ras-Raf-MEK-ERK impliquée dans la prolifération cellulaire, les protéines IRS recrutent et activent principalement la PI3K, qui est une kinase qui catalyse la conversion du PIP₂ en PIP₃. Le PIP₃ recrute à la membrane et active PDK-1, qui va ensuite activer par phosphorylation l'enzyme Akt et les PKC atypiques. La voie Akt est impliquée dans le transport et le métabolisme du glucose, mais également dans la synthèse de lipides, le contrôle du cycle cellulaire et la survie. D'après (Boucher et al., 2014).

Comme toutes les valeurs constantes en physiologie, le maintien de la glycémie peut se dégrader. Dans la majorité des cas, cela conduit à un état d'insulino-résistance et d'intolérance au glucose qui peut dégénérer en diabète de type 2.

L'insuline joue un rôle majeur dans l'utilisation et le stockage du glucose. Dans certaines conditions environnementales délétères pour le métabolisme, telles que l'obésité, on va observer une perte d'efficacité de l'insuline. En effet, il est communément admis que l'obésité participe au développement de la résistance à l'insuline, c'est-à-dire que les organes cibles ne répondent plus, ou répondent moins à son action ne permettant plus une clairance efficace du glucose circulant (Skyler et al., 2017). L'inflammation de bas grade du tissu adipeux qui s'installe en réponse à l'obésité génère une désensibilisation des tissus insulino-sensibles face à cette hormone (Barazzoni et al., 2018). De plus, l'insuline, même à de faibles concentrations, a un effet anti-lipolytique sur le tissu adipeux. Ainsi, dans des conditions d'obésité ou de surpoids où la masse adipeuse est déjà abondante, le maintien ou l'expansion des réserves adipeuses favorise le développement d'un environnement pro-inflammatoire (Barazzoni et al., 2018; Kahn and Flier, 2000). L'inflammation qui s'ajoute à l'hyperglycémie transitoire et l'hyperlipidémie déjà présent, créent un terrain toxique qui altère la signalisation de l'insuline (Boucher et al., 2014).

En condition d'insulinorésistance, l'obésité et la surnutrition peuvent conduire à une diminution du taux membranaire du récepteur de l'insuline, mais également à une réduction de son activité kinase (Caro et al., 1987; Samuel and Shulman, 2016). Cette chute d'activité altère la voie IRS/PI3K/Akt, ce qui diminue la vitesse d'adressage des transporteurs de glucose GLUT4 à la membrane. Le glucose ne pouvant plus rentrer dans la cellule, celle-ci ne peut plus le stocker sous forme de glycogène ou d'acides gras et l'hyperglycémie est ainsi maintenue (Petersen and Shulman, 2018; Yu et al., 2002). Au niveau du tissu adipeux, la surnutrition peut également entraîner une hypertrophie des adipocytes pouvant générer du stress oxydatif et induire de l'inflammation via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (Barazzoni et al., 2018; Furukawa et al., 2004; Yaribeygi et al., 2019). Ces cytokines pro-inflammatoires activent des voies de signalisation telles que JNK (c-Jun N-terminal Kinase) ou IKK β (Inhibitor of Kappa B Kinase- β), ce qui entraînent une diminution de

l'expression des GLUT4, des IRS et d'autres protéines essentielles à la signalisation de l'insuline (Boucher et al., 2014; Tilg and Moschen, 2008). Le tissu adipeux en excès libère également dans la circulation sanguine de grandes quantités d'acides gras libres (AGL), qui favorisent la néoglucogenèse hépatique et inhibent les mécanismes impliqués dans le métabolisme du glucose. Les AGL saturés tel que le palmitate peuvent aussi déclencher des mécanismes délétères dans la cellule bêta (inflammation, stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique) et activer des voies de stress telles que JNK et IKK β (Böni-Schnetzler et al., 2009; Boucher et al., 2014; Samuel and Shulman, 2016). De plus, les AGL semblent modifier les types de myokines sécrétées par les myotubes. En effet, il a été montré sur des cellules musculaires squelettiques humaines qu'en fonction de leur sensibilité à l'insuline, elles sécrètent des myokines différentes qui peuvent influencer positivement ou négativement la sécrétion d'insuline, la prolifération et la survie de la cellule bêta (Bouzakri et al., 2011; Langlois et al., 2021b).

En somme, en altérant divers processus cellulaires majoritairement impliqués dans l'homéostasie glucidique (Figure 10), ces mécanismes délétères ont un effet synergique qui aggrave la situation métabolique et favorise le développement du diabète de type 2.

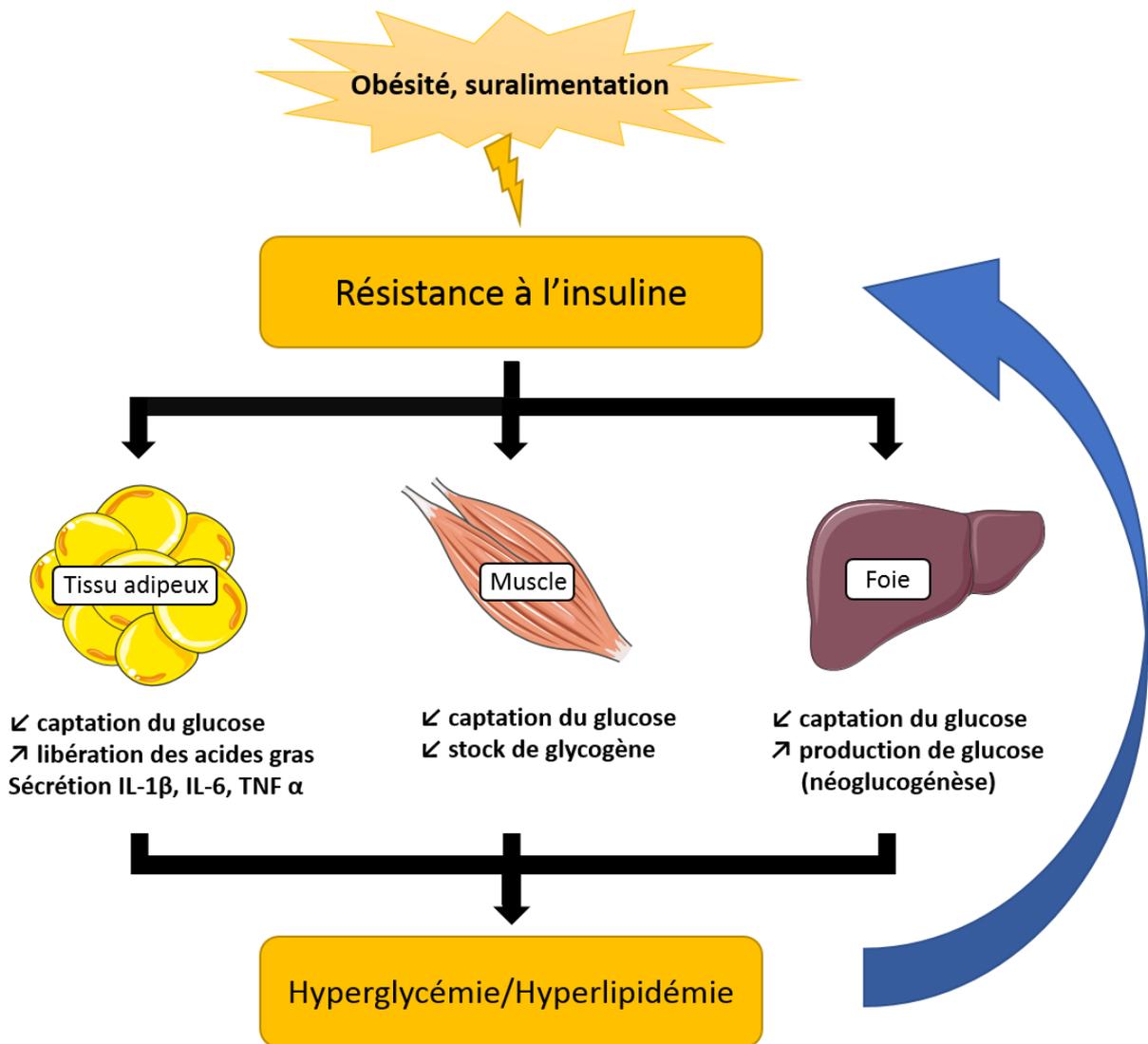


Figure 10 : Origines et conséquences de la résistance à l'insuline.

L'inflammation, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie rencontrées dans les conditions d'obésité et/ou de surnutrition peuvent altérer la signalisation de l'insuline des différents organes impliqués dans l'homéostasie glucidique tels que le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. L'excès de tissu adipeux génère un terrain pro-inflammatoire via la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 ou de TNF α qui aggrave la situation métabolique. Lorsqu'ils sont maintenus trop longtemps, ces mécanismes délétères plongent l'organisme dans un état prédiabétique avec une glycémie augmentée et une lipidémie à des niveaux élevés et toxiques.

L'insulinorésistance est considérée comme un stade prédiabétique réversible. Il constitue un signal d'alerte métabolique et à ce stade, une modification du mode de vie est nécessaire. Il est cependant important de noter que cet état est compensé par l'importante plasticité anatomique et fonctionnelle de la masse des cellules bêta pancréatiques. Ces mécanismes adaptatifs permettent à l'organisme, en augmentant la masse des îlots de Langerhans, de maintenir une glycémie physiologique.

2. Les mécanismes compensatoires de la masse cellulaire bêta endocrine fonctionnelle face à l'insulinorésistance

La plasticité morphologique

La plasticité du système endocrine pancréatique est un processus qui lui permet de s'adapter à des conditions physiologiques ou environnementales qui varient au cours du temps. Ainsi, en fonction des besoins, on peut observer soit une genèse de nouvelles cellules beta (néogenèse) afin de produire plus d'insuline, soit une prolifération de cellules déjà présentes. Le maintien de la fonctionnalité des cellules est aussi un mécanisme nécessaire et complémentaire à ce processus.

Chez l'homme, le taux le plus élevé de prolifération des cellules bêta est observé avant l'âge de 2 ans. Ensuite, pendant l'enfance et l'adolescence, les niveaux de néogenèse et d'apoptose s'ajustent pour atteindre un équilibre qui assure une masse bêta fonctionnelle et stable jusqu'à l'âge adulte (Chen et al., 2011; Goodyer et al., 2012; Gregg et al., 2012; Meier et al., 2008). Cette masse cellulaire peut toutefois être modulée pour s'adapter aux demandes métaboliques importantes de l'organisme qui surviennent en cas d'insulinorésistance physiologique (grossesse) ou pathologique (obésité, surnutrition) (Alejandro et al., 2015; Butler et al., 2010; Prentki et al., 2020a). Chez le rongeur gravide, il semblerait que le mécanisme compensatoire principal soit la prolifération des cellules bêta préexistantes, induite notamment par la signalisation de la prolactine et/ou de la sérotonine (Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir, 2018). Ces mécanismes impliquent l'activation des voies prolifératives et de survie MEK/ERK et PI3K/Akt (Baeyens et al., 2016). Chez la femme, bien que les recherches soient plus limitées (généralement réalisées post-mortem), une étude a révélé une proportion plus importante de petits îlots pancréatiques (environ 40% de plus par pancréas) mais également une augmentation du nombre de cellules positives à l'insuline au niveau des cellules ductales du pancréas (Butler et al., 2010). Ces données suggèrent qu'à la différence du rongeur, la néogenèse à partir des cellules ductales est le mécanisme majoritairement impliqué dans l'expansion de la masse bêta lors de la grossesse chez la femme. Néanmoins, étant donné la difficulté de réaliser ces études, le débat reste ouvert et les mécanismes prolifératifs sont toujours potentiellement envisagés (Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir, 2018; Sullivan et al., 2015).

La résistance à l'insuline liée à l'obésité ou à la surnutrition induit également un remodelage de la masse cellulaire bêta pancréatique (Figure 11). Il a été démontré que des signaux extracellulaires tels que l'insuline, les facteurs de croissance, le glucose ou encore les acides aminés, jouent un rôle important dans l'adaptation de la masse cellulaire bêta en condition d'insulinorésistance (Prentki et al., 2020a). Chez le rongeur, la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisse entraîne une expansion de la masse cellulaire via des mécanismes de prolifération et d'hypertrophie qui impliquent la signalisation IGF1/PI3K/Akt/mTOR (Alejandro et al., 2015). Alors que la masse cellulaire des rongeurs peut être multipliée par un facteur 30, on observe chez l'homme dans des conditions similaires seulement 30% d'augmentation. Ainsi, alors que la croissance compensatoire chez la souris se fait principalement par réplication, la néogenèse semble être chez l'homme le mécanisme principal (Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir, 2018).

La plasticité fonctionnelle

L'augmentation de la masse de cellules beta doit permettre de sécréter plus d'insuline. Aussi, en plus de l'effet expansif sur la masse cellulaire bêta, une augmentation rapide de la biosynthèse et de la sécrétion d'insuline se met en place en réponse à un besoin accru en insuline et/ou à des taux de glucose anormalement élevés. Cela s'explique grâce à une augmentation de 1/ l'activité de facteurs de transcription (MafA, PDX-1, NeuroD1, ...) nécessaires à la synthèse d'insuline, 2/ l'exocytose de l'hormone et 3/ l'activité d'enzymes mitochondriales jouant un rôle important dans l'homéostasie du glucose (Prentki et al., 2020a). Ces mécanismes de plasticité fonctionnelle sont similaires dans les adaptations soit à l'obésité soit à la grossesse (Baeyens et al., 2016; Chen et al., 2017).

Afin de déterminer si l'augmentation de la sécrétion d'insuline est proportionnelle à l'augmentation de la masse cellulaire bêta, des chercheurs ont quantifié les concentrations plasmatiques d'insuline chez des patients obèses insulino-résistants et non diabétiques, et les ont corrélées avec leur masse cellulaire bêta grâce à des analyses histologiques. De manière générale, les niveaux d'insuline plasmatique après stimulation sont largement supérieurs à l'augmentation observée de la masse cellulaire bêta (Chen et al., 2017). De plus, la sécrétion d'insuline chez des sujets obèses est jusqu'à trois fois plus importante que celle qui est mesurée chez des personnes non-obèses (Chen et al., 2017). Ainsi, ces données montrent

l'importance de la plasticité anatomique et fonctionnelle du pancréas endocrine dans le maintien d'une glycémie physiologique, face à la résistance à l'insuline (Figure 11). Cela permet de souligner que le point crucial pour une adaptation efficace serait une meilleure capacité des cellules bêta à sécréter. Ce paramètre est de fait un élément clé à prendre en compte pour étudier l'évolution vers un état pathologique. Cependant, lorsque le stade prédiabétique est maintenu trop longtemps, la production d'insuline est altérée et sa sécrétion devient insuffisante, on parle alors d'insulinopénie. Ensembles, insulinorésistance et insulinopénie conduisent à une hyperglycémie pathologique : le diabète de type 2 (Skyler et al., 2017).

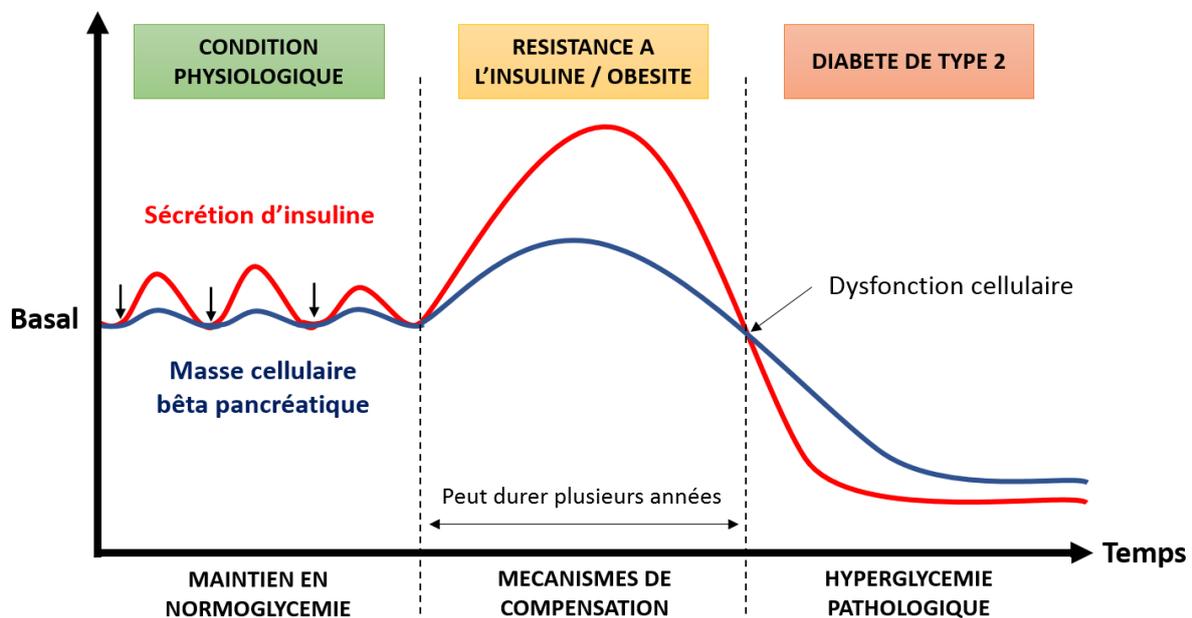


Figure 11 : Représentation schématique de l'apparition progressive du diabète de type 2.

En condition physiologique (vert), l'augmentation de la glycémie (flèches noires) déclenche une sécrétion d'insuline adaptée aux besoins de l'organisme. La sédentarité, associée à une alimentation riche en sucres et/ou lipides, favorise l'apparition d'un environnement métabolique délétère qui rend certains organes impliqués dans le stockage du glucose de plus en plus résistants à l'insuline. Pendant cette période (jaune), on observe une augmentation de la masse cellulaire bêta pancréatique ainsi qu'une sécrétion massive d'insuline. Cette plasticité morphologique et fonctionnelle maintient l'organisme en normo-glycémie. Cependant, sur le long terme, cette suractivité fonctionnelle peut entraîner un épuisement des cellules bêta qui aboutit à une chute de la production et de la libération d'insuline, ainsi qu'à des mécanismes d'apoptose. Cette sécrétion insuffisante d'insuline provoque une hyperglycémie chronique caractéristique du diabète de type 2 (rouge). Cette hyperglycémie, associée à d'autres facteurs cytotoxiques, accentue et précipite le déclin de la masse cellulaire bêta pancréatique. Modifié à partir de (Chen et al., 2017).

3. Rupture des mécanismes compensatoires et apparition du diabète de type 2

Le diabète : définitions, répartition et origines

Les cellules bêta pancréatiques sont les seules cellules de la périphérie capables de produire de l'insuline, la seule hormone hypoglycémisante de l'organisme. Elles jouent donc un rôle crucial dans l'homéostasie du glucose et leur dysfonctionnement conduit irrémédiablement à un excès durable de glucose dans le sang. Cette hyperglycémie chronique est caractéristique du diabète dont on distingue 2 principaux types :

- Le diabète de type 1 (DT1), qui apparaît généralement à l'enfance ou à l'adolescence, est une maladie auto-immune qui provoque la destruction des cellules bêta par le système immunitaire (Skyler et al., 2017).
- Le diabète de type 2 (DT2) quant à lui, représente environ 90% des cas de diabète et est souvent la résultante d'un mode de vie sédentaire et d'une alimentation trop riche (manque d'activité physique, obésité, surpoids, ...). Si le DT2 se déclenche généralement chez les personnes âgées de plus de 40 ans, de plus en plus de cas d'adolescents et de jeunes adultes diabétiques commencent à apparaître (Panagiotopoulos et al., 2018).

En 2019, la Fédération Internationale du Diabète (FID) a révélé que plus de 463 millions de personnes dans le monde étaient diabétiques (Figure 12) (Saeedi et al., 2019). Outre le coût important de la prise en charge du diabète (10% des dépenses mondiales de santé, soit ~760 milliards USD) (Williams et al., 2020), cette pathologie est un véritable enjeu de santé publique. En effet, si elle apparaît de manière progressive et insidieuse, cette maladie est souvent à l'origine de complications graves, pouvant être fatales à long terme telles que des maladies cardiovasculaires, cérébrales, rénales et/ou oculaires. La prévalence du diabète de type 2 varie fortement d'une région du monde à une autre, avec des disparités liées à l'âge, au sexe (les hommes sont plus touchés que les femmes) mais également au statut socio-économique ainsi qu'à l'ethnie (Agardh et al., 2011; Saeedi et al., 2019).

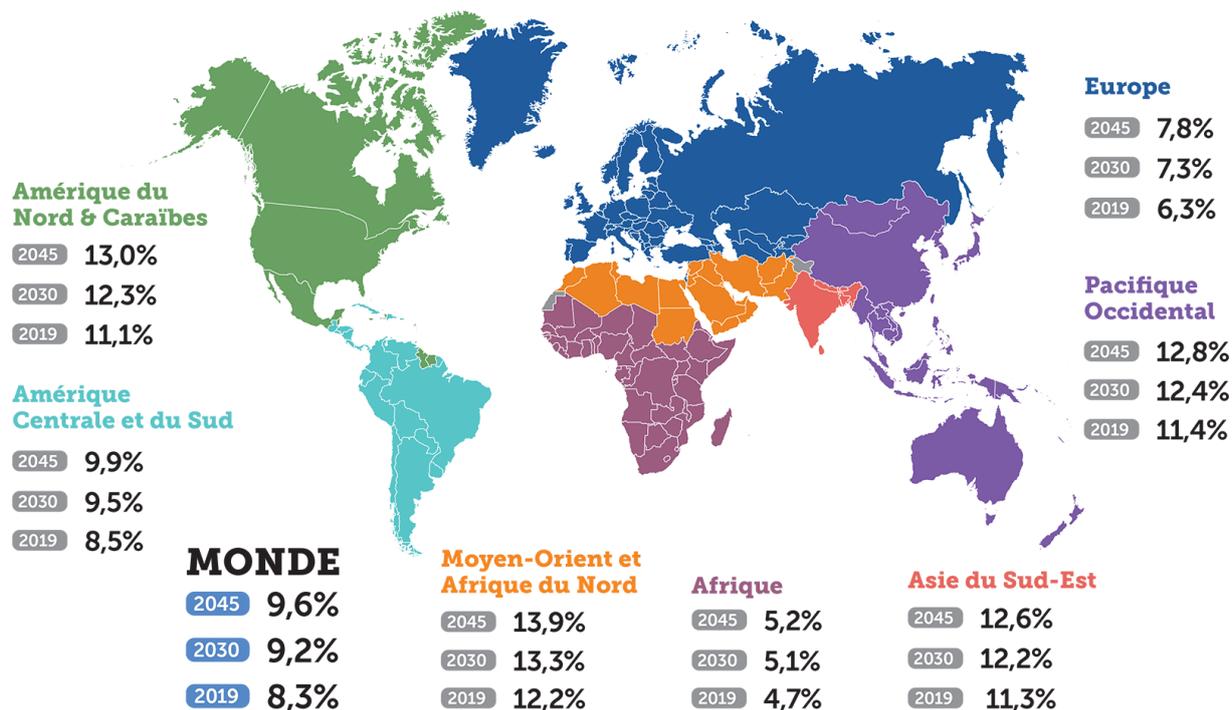


Figure 12 : Prévalence actuelle et prévisionnelle du diabète chez l'adulte (20-79 ans).
 Source : Fédération Internationale du Diabète. Atlas du diabète, 9ème édition 2019.

Les facteurs cellulaires et moléculaires conduisant au diabète de type 2

Lors d'une dérégulation de l'homéostasie glucidique, la cellule bêta pancréatique est continuellement exposée à des niveaux élevés de glucose, de lipides, mais également d'acides aminés ramifiés (BCAA) tels que la leucine, l'isoleucine et la valine. Si ces nutriments sont essentiels à des concentrations physiologiques, des concentrations excessives deviennent toxiques et participent à la défaillance de la cellule bêta entraînant une perte de la masse cellulaire (Newgard, 2012; Prentki et al., 2020a). En effet, la perte de la masse cellulaire fonctionnelle est estimée entre 25 et 60 % en fonction du stade pathologique et résulte d'une apoptose accrue des cellules bêta ainsi que d'une dédifférenciation de ces dernières (Bensellam et al., 2018; Butler et al., 2003; Rahier et al., 2008). Là encore, en condition de diabète, l'origine de la défaillance et du déclin de la masse cellulaire fonctionnelle n'est pas exclusive. Ainsi, plusieurs processus cellulaires et moléculaires ont été suggérés, parmi lesquels :

- Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) : L'excès du métabolisme du glucose dans la cellule bêta génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS peuvent avoir une origine mitochondriale, être issues de la glycosylation non enzymatique ou encore produites par la NADPH oxydase membranaire (Kaneto et al., 2010). D'une manière générale, les ROS peuvent induire une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines ou encore causer des dommages de l'ADN génomique (Bertram and Hass, 2008). Ces altérations conduisent à des pertes majeures de fonction des molécules et peuvent également porter atteinte à l'intégrité membranaire, ce qui déclenche des processus d'apoptose. La cellule bêta pancréatique n'exprime que de faibles niveaux d'enzymes antioxydantes telles que le glutathion, la superoxyde dismutase et la catalase, ce qui la rend vulnérable aux ROS (Tiedge et al., 1997). Au niveau fonctionnel, les ROS induisent une diminution de la production et de la sécrétion d'insuline, via des mécanismes qui semblent avoir pour origine une réduction de la liaison des facteurs de transcription PDX-1 (Pancreatic and Duodenal homeobox-1) et MafA à la région promotrice du gène de l'insuline (Kaneto et al., 2008).

- L'inflammation : Les mécanismes inflammatoires ont eux aussi une part importante dans la dysfonction de la cellule bêta pancréatique. En effet, le DT2 et l'obésité sont souvent associés à une inflammation chronique initiée et entretenue par l'activation du système immunitaire induite par l'excès de nutriments (Alejandro et al., 2015). Cette inflammation se caractérise en grande partie par une infiltration de cellules immunitaires tels que les macrophages au sein de différents organes impliqués dans l'homéostasie du glucose (le foie, les muscles, les tissus adipeux et les îlots de Langerhans). Cela favorise la libération de cytokines pro-inflammatoires circulantes telles que le TNF α , l'IL-6 ou l'IL-1 β (Alejandro et al., 2015; Eguchi and Nagai, 2017). Il est d'ailleurs établi qu'une exposition chronique des cellules bêta à des niveaux élevés d'IL-1 β inhibe la voie de survie Akt et active la voie pro-apoptotique JNK ainsi que le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) dans des îlots humains et murins. L'activation d'NF- κ B favorise l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), conduisant à une production massive d'oxyde nitrique (NO) (Alejandro et al., 2015). Le NO est capable de fragmenter l'ADN, mais également d'interférer avec les mécanismes de transfert d'électrons au sein des mitochondries,

inhibant ainsi la production d'ATP et par conséquent diminuant la sécrétion d'insuline (Rojas et al., 2018; Wang et al., 2010). Le NO peut également causer la libération du cytochrome c, qui est connu pour induire l'apoptose via l'activation des caspases pro-apoptotiques telles que les caspases 3 ou 7 (Hui et al., 2004). En plus des effets sur la production de NO, NF- κ B diminue l'expression de certaines protéines essentielles pour la fonction bêta pancréatique, comme le transporteur de glucose GLUT2 et l'insuline. NF- κ B induit aussi l'expression de protéines pro-apoptotiques qui génère un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Rojas et al., 2018).

- Le stress du réticulum endoplasmique (RE) : Comme de nombreuses protéines sécrétées, l'insuline commence sa maturation dans le RE. La cellule bêta utilise le mécanisme UPR (Unfolded Protein Response). Ce processus est activé en réponse à une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, et permet leur dégradation. Il favorise également l'expression des protéines impliquées dans le repliement des protéines. Ainsi, ce processus adaptatif assure un contrôle qualité des protéines et permet de répondre à l'augmentation importante de l'expression d'insuline en condition d'hyperglycémie (Foufelle and Ferré, 2007). Chez les personnes diabétiques, cette réponse UPR est altérée. Il a été montré que les ROS, l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie et enfin plus récemment, l'inflammation, pouvaient être à l'origine de cette défaillance entraînant une accumulation de protéines mal-repliées ou défectueuses (Eizirik and Millard, 2014). En conséquence, le RE se dilate et ce stress peut aboutir à la mort par apoptose de la cellule bêta (Eizirik and Millard, 2014). Chez des patients diabétiques, il a été observé une multiplication par deux de la taille du RE dans les cellules bêta en comparaison à des patients non diabétiques (Marchetti et al., 2007). Lorsque le stress du RE est maintenu trop longtemps, des transducteurs UPR tels que XBP1 ou PERK initient l'apoptose de la cellule en activant des voies spécifiques comme la voie JNK ainsi que des facteurs pro-apoptotiques (Bcl-2, Bak, Bax, ...) (Demirtas et al., 2016).

Les complications associées au diabète de type 2

Le DT2 est une pathologie insidieuse, indolore et silencieuse pouvant mettre des années à être diagnostiquée. Dans la plupart des cas, elle est détectée lorsque des complications apparaissent.

La principale complication associée au DT2 est d'ordre vasculaire et a des conséquences variables en fonction de l'organe ou de la zone touchée. En effet, au niveau cardiaque, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie diabétique favorisent l'apparition de plaques d'athérome sur la paroi des artères, conduisant à un simple rétrécissement ou à l'obstruction complète de l'artère. Les complications cardiaques constituent ainsi la première cause de décès liée au DT2 (près de 80%), avec un risque d'accident cardiaque multiplié par 2 à 6 en fonction du stade diabétique en comparaison à un individu sain (Beckman et al., 2002). Le rein est également une cible privilégiée de l'hyperglycémie diabétique. Chez un individu sain, le rein filtre le sang et élimine les déchets grâce à la formation de l'urine. Cette filtration limite cependant le passage dans l'urine des macromolécules telles que des protéines dont le poids moléculaire est égal ou supérieur à celui de l'albumine (~68kDa) (Scott and Quaggin, 2015). A cause du diabète, le débit du filtre glomérulaire diminue, les membranes de filtration deviennent perméables à ces molécules normalement retenues. Cela entraîne une baisse de leur présence dans le sang et une accumulation dans les urines qui peut être toxique pour le rein (Gross et al., 2005). Sur le long terme, cette dégradation peut conduire à l'insuffisance rénale. Des études prospectives menées chez des patients diabétiques de type 2 ont révélé qu'un des facteurs prédictifs du développement de cette néphropathie diabétique est une atteinte de la rétine, autrement nommée rétinopathie diabétique (Gall et al., 1997; Murussi et al., 2002). En effet, l'altération des capillaires oculaires peut déclencher une ischémie tissulaire. Des mécanismes compensatoires s'initient afin de recréer un réseau de capillaires sanguins et de rétablir le flux sanguin au niveau de la zone touchée. On observe ainsi une angiogénèse oculaire accrue chez les personnes atteintes de rétinopathie diabétique (Larger, 2003). Cette pathologie associée au diabète constitue la principale cause de cécité chez les 20-64 ans (Crawford et al., 2009). Au niveau central cette fois-ci, il est maintenant largement admis que le diabète augmente le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) (Coppola et al., 2019). En effet, en comparaison à une personne saine, le risque de déclencher un AVC est entre deux et quatre fois plus élevé chez un diabétique (Beckman et al., 2002).

Concernant les atteintes psychiques, une étude épidémiologique menée en 2016 sur plus de 90000 individus a révélé que la dépression était plus répandue chez les personnes atteintes de diabète (Meurs et al., 2016). De manière intéressante, l'analyse de la glycémie à jeun des sujets montre que la dépression chez les diabétiques augmente, que le diabète soit diagnostiqué ou non (Meurs et al., 2016). Ces corrélations entre dépression et diabète ont également été rapportées dans de nombreuses autres études (pour revue Bădescu et al., 2016), ce qui souligne l'importance de trouver un moyen de traiter ces deux pathologies. Enfin, parmi les nombreuses autres complications liées au diabète, on retrouve les maladies dentaires, le pied diabétique (risque de gangrène et d'amputation), mais également un risque accru de développer certains cancers (foie, pancréas, endomètre, côlon, sein, vessie), ainsi qu'une moindre résistance aux infections virales telles que la grippe, ou plus récemment, le SARS-CoV-2 (Apicella et al., 2020; Deshpande et al., 2008; Giovannucci et al., 2010; Singh et al., 2020a).

II/ Les mécanismes essentiels de maintien d'une masse cellulaire bêta pancréatique fonctionnelle

A) Le couplage glucose-sécrétion d'insuline

1. Détection et transport du glucose

L'activité sécrétoire de la cellule bêta est associée aux variations de concentration de glucose circulant. Cette cellule possède un système « senseur du glucose » qui est nécessaire au couplage de la sécrétion d'insuline avec des variations même modérées de la glycémie (Schuit et al., 2001). L'initiation de ce mécanisme de détection commence par l'entrée du glucose dans la cellule bêta. De par sa polarité, le glucose ne diffuse pas au travers de la bicouche lipidique de la membrane plasmique et pénètre dans la cellule en suivant son gradient de concentration grâce à des transporteurs au glucose GLUT (GLUcose Transporter). Les GLUT rassemblent 14 isoformes de protéines à douze domaines transmembranaires et assurent le transport passif de différents sucres dans l'environnement intracellulaire. Ils sont divisés en trois grands groupes qui se distinguent par leurs structures, leurs propriétés cinétiques et leurs localisations tissulaires et cellulaires (Mueckler and Thorens, 2013). Les transporteurs GLUT1, 2, 3, 4 et 14 constituent le groupe 1 et assurent principalement le

transport du glucose, mais aussi celui du fructose, du mannose, ou encore du galactose. Les transporteurs GLUT5, 7, 9 et 11, spécialisés dans l'absorption du fructose, constituent le groupe 2. Enfin le groupe 3, rassemble les transporteurs GLUT6, 8, 10, 12 et 13, qui assurent principalement le transport du glucose, sauf pour GLUT13, qui lui transporte du myoinositol (Barron et al., 2016). Alors que GLUT2 est le principal transporteur du glucose de la cellule bêta pancréatique chez le rongeur, chez l'homme, ce rôle est attribué au GLUT1 et GLUT3 (De Vos et al., 1995). GLUT2 possède une forte capacité de transport et une faible affinité pour le glucose ($K_m \sim 17$ mmol/L) (Thorens and Mueckler, 2010). Ainsi, même à des concentrations élevées de glucose, GLUT2 ne sature pas, et la vitesse de transport est proportionnelle à la glycémie ambiante. De fait, la concentration de glucose au sein de la cellule bêta pancréatique est identique à la concentration extracellulaire de glucose, ce qui permet une sécrétion d'insuline adaptée en permanence à la glycémie (Thorens, 2015). En revanche, il faut ajouter qu'à de faibles concentrations, le glucose extracellulaire ne peut être transporté et assure ainsi un frein à la sécrétion d'insuline en période normoglycémique.

2. Métabolisme du glucose

Une fois rentré dans le cytosol de la cellule bêta, le glucose est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphorylation de son 6^{ème} carbone par la glucokinase (GK), autrement nommée hexokinase IV (Kawai et al., 2005; Matschinsky, 1996). A la manière du GLUT2, la GK a une faible affinité pour le glucose ($K_m \approx 8$ mM) ce qui l'empêche de saturer, même lorsque la glycémie est élevée. De plus, parmi toutes les autres kinases capables de phosphoryler le glucose, la GK est la seule qui ne subit pas de rétrocontrôle négatif par son produit, le G6P (Matschinsky, 1996; Matschinsky and Wilson, 2019). Le glucose phosphorylé est ensuite converti en pyruvate par la glycolyse, puis transporté dans la mitochondrie pour y être métabolisé via le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP (Prentki et al., 2013; Schuit et al., 2001). A la différence d'autres types cellulaires, la quasi-totalité du pyruvate dans la cellule bêta est transformée en ATP, renforçant encore le couplage glucose-sécrétion d'insuline. En effet, de manière générale, le pyruvate peut être converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH). Ce dernier peut ensuite être utilisé pour la synthèse *de novo* de glucose (néoglucogénèse), mais également être évacué par des transporteurs monocarboxylates (MCT) hors de la cellule lorsqu'il est en trop grande quantité, afin de

préservé un pH intracellulaire physiologique (Halestrap and Wilson, 2012; Tornheim, 2018). Dans la cellule bêta pancréatique en revanche, en plus de la forte activité pyruvate carboxylase (métabolisme du pyruvate), l'expression de la LDH et du MCT est très faible voire inexistante (Ishihara et al., 1999; Schuit et al., 2001; Sekine et al., 1994). De ce fait, plus de 80% du glucose qui a pénétré dans la cellule bêta sert à la synthèse d'ATP (Prentki et al., 2013; Schuit et al., 1997). Chez la souris et l'homme, la production d'ATP est semi-maximale à 3 mM de glucose et sature à 20mM de glucose (Rorsman and Ashcroft, 2018).

3. Potentiel de membrane et flux calcique

En tant que cellule excitable, le potentiel de membrane de la cellule bêta joue un rôle majeur dans la sécrétion d'insuline. En effet, cette dernière se distingue des autres cellules des îlots de Langerhans par des canaux ioniques distincts ou similaires mais avec des propriétés différentes, leur conférant une signature électrophysiologique spécifique (Briant et al., 2017). Parmi ces canaux, on retrouve notamment le canal K^+ sensible à l'ATP (canal K-ATP) qui est le canal ionique prédominant dans les cellules bêta (Rorsman and Ashcroft, 2018). Ces canaux sont composés d'un pore (Kir 6-2) et d'une sous-unité régulatrice SUR1 (Sulfonylurea Receptor 1). Dans des conditions glycémiques basales, la liaison de l'ADP à SUR1 ouvre le canal, entraînant la diffusion des ions K^+ hors de la cellule, ce qui assure le maintien du potentiel de repos à environ -70mV. A l'inverse, après un repas, l'augmentation du ratio ATP/ADP induit par l'augmentation de la glycémie modifie l'activité du canal. En effet, la liaison de l'ATP sur Kir 6-2 ferme le canal, conduisant à une accumulation cytoplasmique d'ions K^+ qui modifie et augmente le potentiel de la membrane plasmique. Lorsqu'elle atteint un certain seuil, cette dépolarisation membranaire entraîne une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC), suivie d'une entrée massive de calcium dans le cytoplasme (Henquin et al., 2003; Röder et al., 2016). Le Ca^{2+} intracytoplasmique induit alors la sécrétion d'insuline par exocytose, en provoquant la fusion des granules contenant l'hormone avec la membrane plasmique.

4. Libération des granules contenant l'insuline

La libération d'insuline suit un modèle de sécrétion en deux temps (Figure 13). La première phase débute seulement quelques minutes après un repas. C'est une phase

transitoire (moins de 10 minutes) pendant laquelle la sécrétion d'insuline est très importante. A l'issue de ces 10 minutes, la seconde phase prend le relais. Moins intense que la première, elle est associée à une libération soutenue d'insuline qui dure jusqu'au retour à une glycémie basale (Curry et al., 1968; Nesher and Cerasi, 2002).

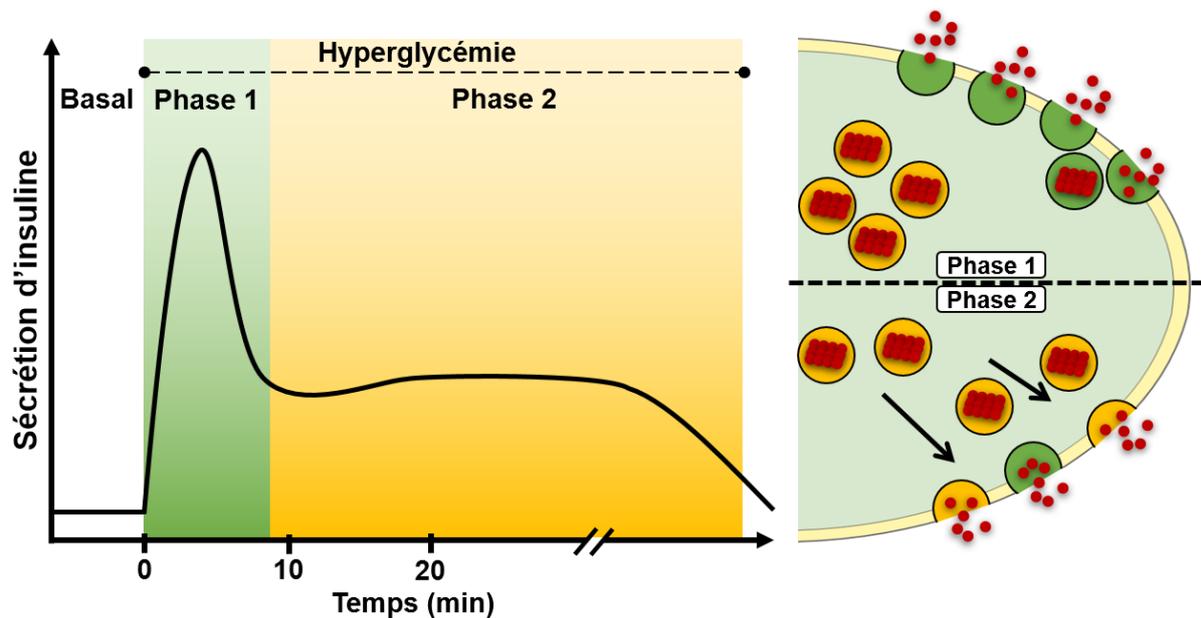


Figure 13 : Représentation schématique de la sécrétion biphasique d'insuline induite par le glucose.

Suite à un événement hyperglycémiant, une quantité importante d'insuline (sphères rouges) est libérée très rapidement grâce à l'exocytose des granules qui se situent au niveau juxtamembranaire (granules verts), c'est la phase 1 (en vert sur le graphe). Au bout d'environ 10 minutes, les granules de réserves (granules jaunes) sont transportés vers la membrane plasmique où ils déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme provoque une sécrétion moins intense, mais durable, qui représente la 2ème phase de la libération d'insuline (jaune sur le graphe). Modifié d'après (Rorsman and Renström, 2003).

Ce modèle de sécrétion biphasique s'explique notamment par une organisation cellulaire très précise. En effet, les granules de sécrétion qui contiennent l'insuline sont ordonnés entre le réticulum endoplasmique et la membrane (Dean, 1973). Les granules d'insuline les plus proches de la membrane plasmique (seulement 1 à 5% des granules) sont impliqués dans la première phase de sécrétion et correspondent au pool facilement libérable (Figure 13). La majorité restante des granules d'insuline reste plutôt proche du réticulum endoplasmique et constitue le pool de réserve, responsable de la libération prolongée d'insuline pendant la seconde phase (Figure 13) (Grotsky, 1972; Rorsman and Renström, 2003). Pour assurer la deuxième phase, le pool de granules de réserve est recruté à la

membrane par un processus actif nécessitant des protéines de transports (kinésines) et des protéines du cytosquelette (Myosines). Ce transport peut être déclenché par des kinases, comme par exemple la CaMKII (Calmoduline Kinase II) dont l'activité est dépendante du calcium. Après un repas, l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} active la CaMKII. Une fois activée, elle phosphoryle des protéines (synapsines) associées aux granules de sécrétion, ce qui déclenche le recrutement des granules d'insuline du pool de réserve à proximité de la membrane plasmique. La CaMKII participe ainsi au maintien de la sécrétion d'insuline (Gromada et al., 1999).

Le mécanisme d'exocytose de l'insuline (et d'autres hormones polypeptidiques) est un processus en plusieurs étapes, comprenant le positionnement, l'amarrage et la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique (Figure 14). Ce processus fait intervenir des protéines spécialisées présentes sur les granules de sécrétion (les v-SNARE) et sur la membrane plasmique (les t-SNARE) (Rorsman and Ashcroft, 2018). Lorsque la vésicule se positionne au niveau du site d'exocytose, la formation d'un complexe entre la v-SNARE VAMP (ou synaptobrevine), et les t-SNARE SNAP-25 et syntaxine-1, fournit la force motrice nécessaire au rapprochement des membranes (Jahn and Südhof, 1999; Weber et al., 1998). La fixation de la protéine complexine sur le complexe SNARE stabilise et renforce les interactions entre les protéines, ce qui rapproche encore un peu plus les membranes et déclenche la fusion des premières couches lipidiques granulaire et membranaire (Mohrmann et al., 2015). C'est ensuite au tour de la synaptotagmine de rentrer en jeu. Cette v-SNARE possède deux domaines C2 désignés C2A et C2B. Ces structures sont des sites de liaison du Ca^{2+} qui assurent la liaison de la synaptotagmine avec certaines protéines (syntaxine-1, SNAP-25, ...) et des phospholipides (Chapman et al., 1995; Geppert and Südhof, 1998; Ohara-Imaizumi et al., 1997; Schiavo et al., 1996). Ainsi, la fixation du Ca^{2+} sur ces domaines entraîne leur ancrage dans les membranes plasmiques, ce qui déclenche la fusion du granule et permet la libération du contenu granulaire dans le milieu extracellulaire. Enfin, la liaison de la protéine de fusion sensible au N-éthylmaleimide (NSF) et de la protéine soluble d'attachement NSF (SNAP) au complexe SNARE, entraîne sa dissociation et favorise l'endocytose et le recyclage ou la dégradation du granule (Südhof, 2013).

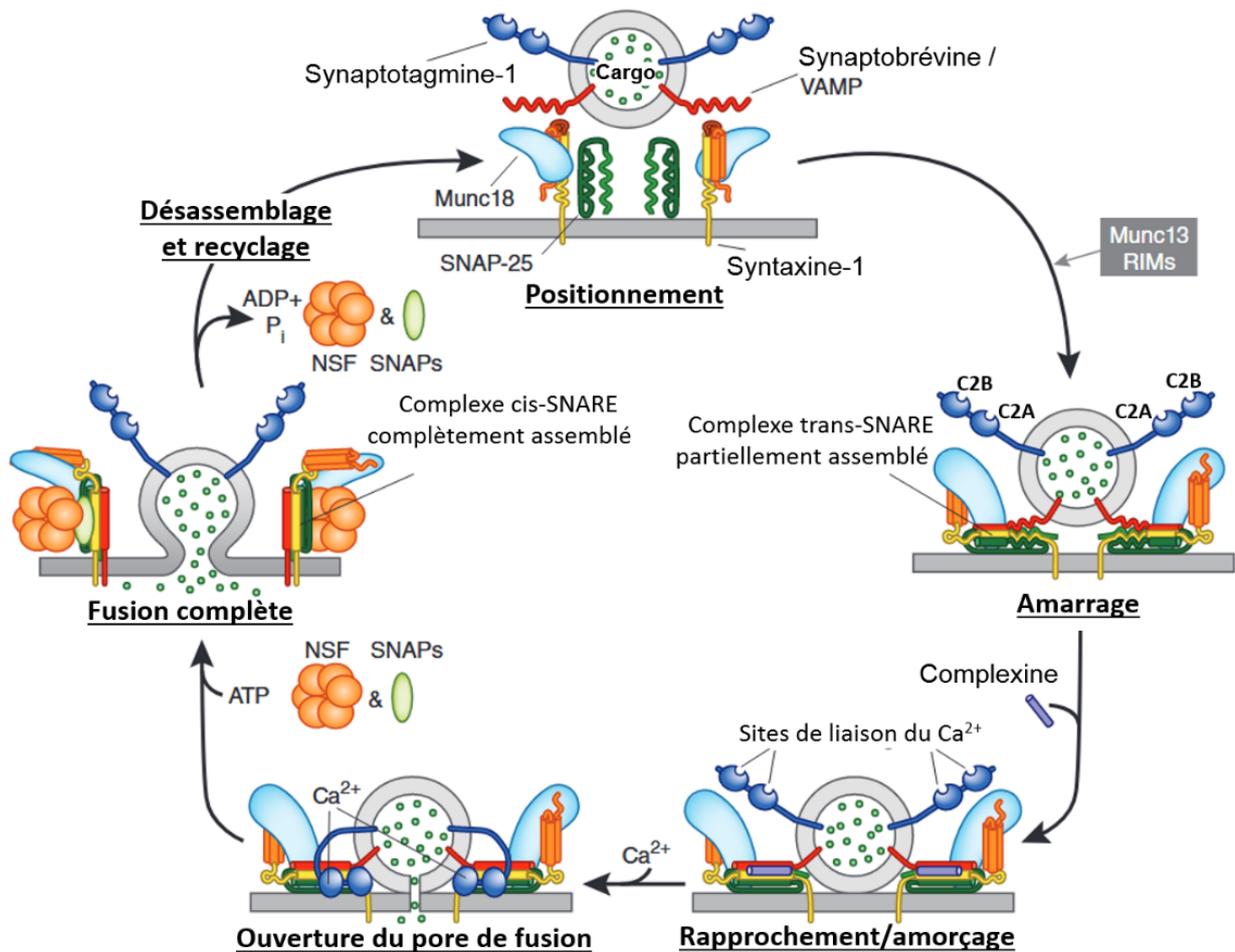


Figure 14 : Les principales étapes de la machinerie d'excocytose.

Suite au positionnement du granule sur le site d'excocytose, le complexe SNARE se lie, c'est l'amarrage. Ensuite, la liaison de la complexine au complexe SNARE entraîne un rapprochement du granule à la membrane plasmique, ce qui provoque la préfusion des premières couches lipidiques granulaire et membranaire (rapprochement/amorçage). Suite à la dépolarisation de la membrane plasmique induite par un stimulus tel que le glucose, le calcium pénètre dans la cellule et se fixe sur les domaines C2A et C2B de la synaptotagmine. Cette fixation provoque l'ancrage de ces domaines dans les membranes plasmiques, ce qui déclenche l'ouverture complète du pore de fusion et permet la libération de contenu granulaire dans le milieu extracellulaire. La fixation des protéines NSF et SNAP initie le désassemblage du complexe SNARE et favorise l'endocytose du granule. Il sera ensuite soit dégradé, soit recyclé. Image modifiée d'après (Südhof, 2013).

La figure 15 récapitule l'ensemble des mécanismes clés impliqués dans la sécrétion d'insuline de la cellule bêta pancréatique.

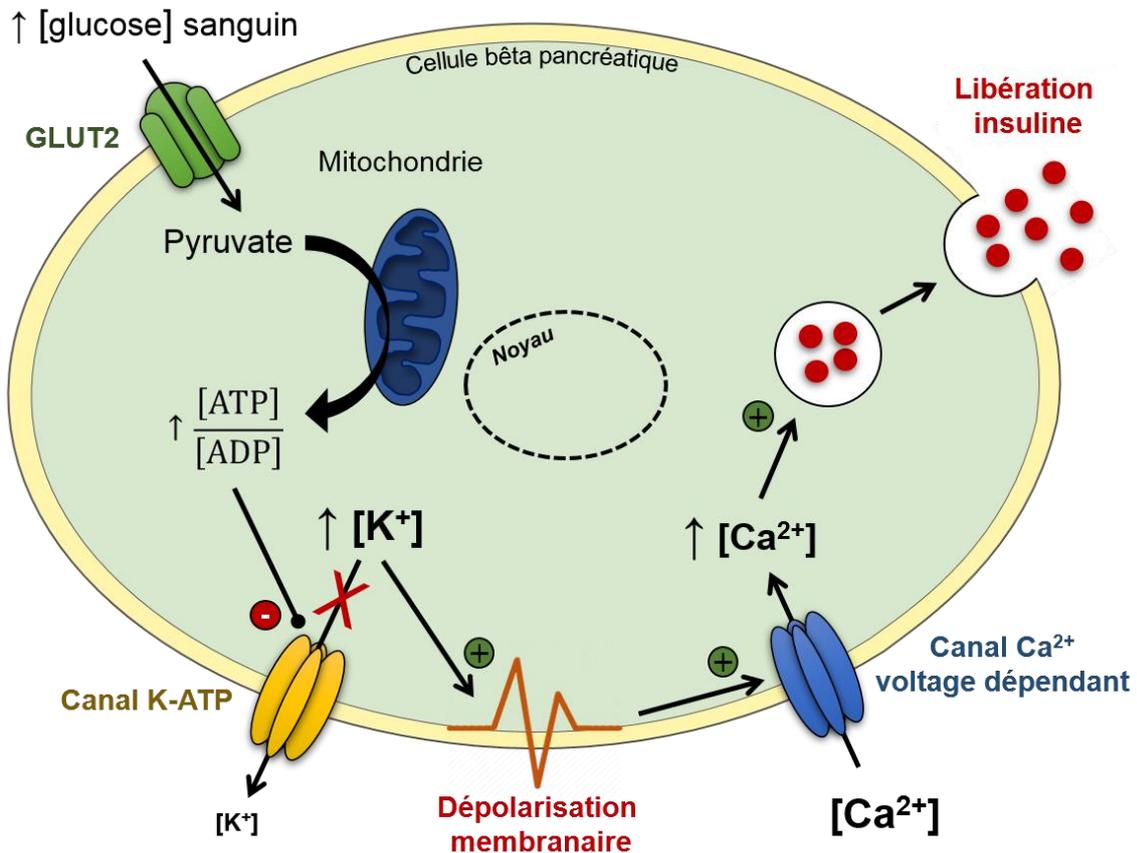


Figure 15 : Résumé des différentes étapes impliquées dans la sécrétion d'insuline.

Suite à une élévation de la glycémie, le glucose est transporté dans la cellule bêta pancréatique via des transporteurs au glucose GLUT2 (vert), pour y être métabolisé par la mitochondrie afin de produire de l'ATP. Cet ATP provoque la fermeture des canaux potassiques K-ATP (jaune), ce qui entraîne une accumulation d'ions K^+ dans le cytoplasme qui modifie la charge électrique de la cellule et dépolarise la membrane plasmique (orange). L'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage (bleu) provoque une entrée importante d'ions Ca^{2+} nécessaires à l'exocytose des granules d'insuline.

B) Les activateurs de la sécrétion d'insuline

Afin de répondre efficacement aux différents épisodes hyperglycémiques au cours de la journée, la sécrétion d'insuline doit être un mécanisme dynamique. Cette réactivité est notamment due à l'action coordonnée de différentes molécules capables de potentialiser, via l'activation de voies de signalisation spécifiques, l'effet du glucose sanguin sur la sécrétion d'insuline.

1. Les nutriments

Certains nutriments sont les premières molécules capables de déclencher et aussi d'amplifier la sécrétion d'insuline. Parmi eux on retrouve évidemment le glucose dont on vient de discuter, mais aussi les acides gras et les acides aminés, qui sont des modulateurs de la libération d'insuline (Figure 16).

Les acides aminés sont essentiels pour une grande variété de fonctions cellulaires comme la synthèse de protéines et de nucléotides. De plus, certains d'entre eux sont capables d'agir sur la libération d'insuline, en modulant plus ou moins directement le potentiel de membrane en fonction de leurs charges, de manière complètement dépendante du glucose (Newsholme et al., 2007). En effet, les acides aminés cationiques tels que la L-arginine ou la L-Lysine dépolarisent directement la membrane plasmique, entraînant un influx calcique qui potentialise la sécrétion d'insuline (Newsholme et al., 2006). Leur effet sur l'influx calcique étant trop faible, ils ne peuvent pas moduler la libération d'insuline sans la présence du glucose. D'autres acides aminés comme l'alanine ou la proline agissent eux aussi sur le potentiel de membrane, mais d'une façon indirecte. Ces derniers sont co-transportés au sein de la cellule avec le Na^+ . Ainsi, l'augmentation de la présence de ces acides aminés dans le sang, augmente leur transport au sein de la cellule et donc mécaniquement celui du sodium. L'augmentation de la concentration en Na^+ modifie la charge intracellulaire, ce qui dépolarise la membrane et crée un influx de calcium qui amplifie la sécrétion d'insuline uniquement en condition d'hypoglycémie (Rorsman and Ashcroft, 2018).

Les acides aminés agissent aussi comme le glucose. En effet, le métabolisme des acides aminés tels que la leucine, isoleucine ou l'alanine conduit à une élévation du ratio ATP/ADP, entraînant la fermeture des canaux K^+ -ATP et en conséquence stimule la sécrétion d'insuline (Holeček, 2018; Newsholme et al., 2007, 2014). De plus, de manière intéressante, l'isoleucine permet la synthèse de glutamate (Holeček, 2018). Ce dernier chélate les ions ammonium (NH_4^+), toxiques pour la cellule, ce qui entraîne sa conversion en glutamine. Le glutamate et la glutamine modulent la sécrétion d'insuline (Gammelsaeter et al., 2011; Maechler, 2017). En effet, dans la cellule bêta pancréatique, le métabolisme de la glutamine et sa conversion en glutamate potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose et active des voies de survie et de prolifération cellulaire (Modi et al., 2014; Prentki et al., 2020a). En revanche,

lorsque le glutamate se trouve au niveau extracellulaire, il active les récepteurs au NMDA, ouvre les canaux K-ATP, repolarise la cellule et donc diminue l'exocytose d'insuline (Maechler, 2017).

Les acides gras sont capables de pénétrer dans la cellule par diffusion libre (Hamilton and Kamp, 1999). En normo-glycémie, les acides gras cytosoliques sont transformés en acyl-CoA à longues chaînes par l'acyl-CoA synthétase (ACS), puis transportés dans la matrice mitochondriale via la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT-1), où ils sont métabolisés par la voie de la β -oxydation pour produire de l'ATP. L'ATP maintient ainsi la sécrétion d'insuline (Newsholme and Krause, 2012). Après un repas, le métabolisme du glucose et des acides aminés entraîne la synthèse de la malonyl-CoA par l'acyl-CoA carboxylase (ACC), ce qui inhibe le transporteur CPT-1 et détourne donc les acyl-CoA de la β -oxydation vers la synthèse de lipides estérifiés, tels que les diacylglycérols (DAG) (Prentki et al., 2020b). L'accumulation résultante de lipides dans le cytoplasme peut potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose en modulant l'activité du canal K-ATP et de la protéine kinase C (PKC), en modulant les courants calciques. Les lipides sont aussi des modulateurs de l'exocytose grâce à leurs effets sur la machinerie. Par exemple, certains lipides (oméga-3, oméga-6, acides gras non-estérifiés) activent des protéines du complexe SNARE telles que la syntaxine ou encore Munc13, ce qui facilite le processus d'exocytose (Darios et al., 2007; Deeney et al., 2000; Prentki et al., 2020b).

Les acides gras circulants peuvent également agir sur la sécrétion d'insuline sans pénétrer à l'intérieur de la cellule bêta mais par interaction avec des récepteurs couplés aux protéines G (GCPG), les FFAR (Free Fatty Acid Receptors). Cette classe regroupe des récepteurs tels que FFAR1 (GPR40), FFAR2 (GPR43), FFAR3 (GPR41) et FFAR4 (GPR120), caractérisés par leur distribution tissulaire et leur affinité pour les acides gras à longues ou courtes chaînes (Kimura et al., 2020). Au niveau de la cellule bêta pancréatique, le GPR40 est le récepteur le plus exprimé. *In vivo* et *in vitro* il potentialise la sécrétion d'insuline après un repas (Itoh et al., 2003; Kristinsson et al., 2013; Tomita et al., 2006). En effet, l'activation du GPR40 entraîne la formation d'inositol trisphosphate (IP3) par la phospholipase C, qui induit la libération des stocks de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique via l'ouverture des canaux IP3 sensibles récepteur de la ryanodine (Islam, 2002). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium

2. Les neurotransmetteurs

Le cerveau est également impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Les îlots pancréatiques sont connectés directement au système nerveux autonome (SNA) par des nerfs provenant des zones sympathique et parasympathique (Thorens, 2011). Au sein de ces structures, on retrouve des neurones sensibles au glucose, qui modulent l'activité du SNA. Ces neurones sont activés soit par l'hyperglycémie, soit par l'hypoglycémie (Thorens and Labouèbe, 2021). En condition d'hypoglycémie, la stimulation du système nerveux sympathique entraîne la libération de noradrénaline, de galanine et du neuropeptide Y dans le pancréas endocrine par les terminaisons nerveuses (Magnan and Ktorza, 2005). Ces neuromédiateurs inhibent la sécrétion d'insuline, principalement par des mécanismes qui impliquent l'activation de protéines G inhibitrices ainsi qu'une réduction des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} et d'AMPc (Ahrén, 2000; Magnan and Ktorza, 2005). A l'inverse, la stimulation du système nerveux parasympathique par l'hyperglycémie déclenche la libération de neuropeptides tels que l'ACh (AcétylCholine), le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide), le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) ou encore le GRP (Gastrin Releasing Peptide). PACAP et VIP augmentent la concentration intracellulaire d'AMPc et GRP active la voie PLC/IP3. Ces mécanismes, initiés par des protéines G, augmentent la concentration intracellulaire de calcium, ce qui de fait, potentialise la sécrétion d'insuline (Ahrén, 2000; Igarashi et al., 2011). Concernant l'ACh, sa fixation sur la cellule bêta via un récepteur muscarinique de type M3, augmente la concentration intracellulaire de calcium et active la calmoduline kinase II (CaMKII) par la signalisation PLC-PKC (Ahrén, 2003; Rorsman and Ashcroft, 2018).

De manière intéressante, le système nerveux parasympathique peut préparer l'organisme à une augmentation de la glycémie, et ce, avant même la première bouchée ! En effet, la vue et/ou l'odeur des aliments déclenchent la sécrétion des neuropeptides cités précédemment, conduisant à la phase céphalique de la sécrétion d'insuline (Magnan and Ktorza, 2005). Les concentrations de glucose circulant au repos (4-5 mM chez l'homme) sont suffisantes pour permettre l'action de ces potentialisateurs de la libération d'insuline (Rorsman and Ashcroft, 2018).

3. Les incrétines peptidiques

Les incrétines, ou gluco-incrétines, sont des hormones peptidiques capables d'augmenter la sécrétion d'insuline en présence de glucose. Parmi elles, le GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide) et le GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1) sont sécrétées par les cellules endocrines situées dans l'épithélium de l'intestin grêle (Thorens, 2003). Ces deux peptides partagent une forte homologie de séquence peptidique avec le glucagon. Le GIP est sécrété dans la partie supérieure de l'intestin grêle par les cellules K entéroendocrines, alors que le GLP-1 est principalement libéré dans l'intestin distal, par les cellules L entéroendocrines (Gautier et al., 2005). Lors d'un repas, le passage des aliments dans l'intestin déclenche la libération de ces hormones incrétines qui agissent ensuite sur la cellule bêta en liant des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G (RCPG) (Les RCPG sont abordés plus en détail dans la partie suivante (II-C-2)) (Holst and Gromada, 2004). Cela active des protéines G spécifiques qui activent l'adénylate cyclase. L'augmentation consécutive d'AMPc cytoplasmique est suffisante pour agir sur la concentration cytosolique de calcium et sur la libération des granules d'insuline (Gautier et al., 2005). Les voies de signalisation de l'AMPc sont soit dépendantes de la PKA, soit de l'activation du facteur d'échange guanine nucléotide II régulé par l'AMPc (AMPc-GEFII, également connu sous le nom d'Epac2) (Holz, 2004; Stožer et al., 2021). Outre l'effet positif direct sur la sécrétion d'insuline, l'augmentation cytoplasmique d'AMPc favorise l'expression de protéines essentielles au maintien d'une masse cellulaire fonctionnelle telle que l'insuline, la cycline D1 et la cycline A (Campbell and Drucker, 2013; Dalle et al., 2011; Nauck and Meier, 2018). Également, la stimulation des récepteurs du GLP-1 et du GIP protège les cellules bêta pancréatiques de l'apoptose (Drucker and Nauck, 2006). Par exemple, le GLP-1, en plus de l'activation de la PKA, entraîne le recrutement des protéines d'échafaudage bêta-arrestines. PKA et bêta-arrestines sont capables d'activer, de manière indépendante, des kinases telles que ERK1 et ERK2 impliquées dans la survie cellulaire (Costes et al., 2021). Le GLP-1 favorise aussi l'expression de la glucokinase et des transporteurs au glucose GLUT2, ce qui permet de maintenir la fonction « glucose senseur » des cellules bêta (Dalle et al., 2013).

C) La signalisation intracellulaire impliquée dans le maintien d'une masse cellulaire bêta pancréatique fonctionnelle

Les cellules bêta pancréatiques doivent répondre de façon adaptée aux variations quotidiennes de la glycémie et sont, de ce fait, régulées par un grand nombre de molécules (glucose, acides gras, incrétines, ...) qui activent des voies de signalisation spécifiques et variées (Figure17). Le diabète de type 2 est une évolution lente vers une perte de fonction des cellules bêta impliquant la détérioration de ces voies de signalisation. Ainsi, la compréhension des principales voies nécessaires au maintien de la masse de cellules fonctionnelles est cruciale pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques du diabète.

1. La signalisation des récepteurs couplés aux protéines G

De nombreux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont exprimés à la surface des cellules bêta pancréatiques (Stewart et al., 2015). Les protéines G associées aux RCPG sont regroupés en deux familles. Les protéines G hétérotrimériques constituées des sous-unité α , β et γ , et les petites protéines G monomériques, (Rab, de Rho ou encore d'Arf) (Kowluru, 2020). Les voies de signalisation induites par les protéines G hétérotrimériques nécessitent l'activation des sous-unités α . A l'état basal, la protéine $G\alpha$ est en interaction avec les sous-unités β et γ . La liaison du ligand à son récepteur provoque l'hydrolyse du GTP en GDP, cela déclenche la dissociation de $G\alpha$ des sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$, $G\alpha$ prend alors sa forme active. La réponse intracellulaire diffère en fonction du type de $G\alpha$ activé (Amisten et al., 2013). Par exemple, $G_{\alpha s}$ active l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc. A l'inverse, l'activation d'une $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$ inhibe l'adénylate cyclase ce qui, mécaniquement, diminue la concentration intracellulaire d'AMPc (Kowluru, 2020; Stewart et al., 2015). Une autre famille, la $G_{\alpha q}/11$, active la phospholipase C et entraîne la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol 1,4,5 trisphosphate (IP3). DAG et IP3 favorisent respectivement l'activation de la PKC (Proteine Kinase C) et la libération des stocks de calcium par le réticulum endoplasmique (Amisten et al., 2013). Ainsi, en fonction du type de RCPG activé, un ligand peut avoir des effets biologiques variés sur la fonction et la survie bêta pancréatique. Par exemple, le GLP-1 vu dans la partie précédente, active la G_s et favorise la production d'AMPc (Campbell and Drucker, 2013). L'augmentation résultante d'AMPc intracellulaire active différentes protéines telles que la PKA et Epac2, qui agissent positivement sur la mobilité des granules d'insuline et favorisent le

renouvellement du pool de granules facilement libérables à la membrane plasmique (Tengholm and Gylfe, 2017). La PKA module aussi l'activité de certains canaux ioniques tels que les K-ATP. L'action de la PKA sur les K-ATP est notamment facilitée par la présence d'Epac, qui se fixe sur sa sous-unité SUR1 (Tengholm and Gylfe, 2017). L'inhibition résultante du canal dépolarise la membrane, potentialisant ainsi la sécrétion d'insuline initiée par le glucose. Enfin, l'augmentation cytoplasmique d'AMPC a également des effets sur d'autres voies de signalisation telles que ERK et Akt. Ensembles PKA, Akt et ERK favorisent l'activité de facteurs de transcription tels que CREB (cAMP-Responsive Element-Binding protein), un facteur impliqué dans l'expression de gènes essentiels pour la fonction insulinosécrétrice et pour la survie de la cellule bêta pancréatique (Dalle et al., 2011; Gautier et al., 2005; Nauck and Meier, 2018).

2. La signalisation calcique

Le calcium est un ion nécessaire à l'organisme et constitue un second messenger essentiel de la cellule bêta pancréatique. Sa capacité à initier un grand nombre de processus intracellulaires implique que sa présence au sein de la cellule doit être régulée. Cette régulation fait intervenir de nombreuses pompes, échangeurs et canaux, qui se coordonnent et maintiennent un gradient de concentration de chaque côté de la membrane (Young and Stokes, 2004). La concentration basale de Ca^{2+} au sein de la cellule bêta est d'environ 100nM, soit environ 20 000 fois moins que la concentration extracellulaire (environ 2-2,5mM). Pendant un influx calcique, on estime que la concentration intracellulaire de Ca^{2+} peut atteindre entre 300 et 1000 nM (Sabatini et al., 2019). Le calcium étant toxique à de fortes concentrations, son niveau doit rapidement être diminué après la stimulation pour maintenir l'homéostasie calcique. Ce retour à la normale est permis grâce à différents mécanismes, dont le stockage du Ca^{2+} dans la mitochondrie, le réticulum endoplasmique (RE), le Golgi ou encore dans des vésicules et granules de sécrétion (Idevall-Hagren and Tengholm, 2020). La concentration en Ca^{2+} dans ces organelles peut atteindre des niveaux très élevés. A titre d'exemple, la concentration en Ca^{2+} libre dans le RE de la cellule bêta est comprise entre 200 et 500 μM (Idevall-Hagren and Tengholm, 2020). Ainsi, ces mécanismes de stockage permettent une diminution rapide de la concentration cytoplasmique de calcium et maintiennent la cellule prête à répondre à des stimuli. La création de ces réserves de Ca^{2+} sont

mobilisables à tout moment. En effet, après un repas, leur libération est déclenchée par l'activation des récepteurs de l'inositol trisphosphate (IP3), de l'acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NAADP) ou aussi des récepteurs de la ryanodine. Cela complémente l'élévation de la concentration de Ca^{2+} interne issue des courants calciques entrants et, de façon synergique, augmente l'exocytose des granules contenant l'insuline (Gilon et al., 2014; Sabatini et al., 2019).

Cette augmentation de concentration de Ca^{2+} a également un effet sur le maintien de la réponse dans l'îlot de Langerhans. Au sein de l'îlot, les vagues de Ca^{2+} qui se propagent d'une cellule à une autre, permettent de synchroniser et de renforcer la sécrétion d'insuline. Cela permet aussi d'agir sur le potentiel de membrane des cellules bêta adjacentes. Cette synchronisation, qui permet de répondre avec précision et efficacité aux besoins de l'organisme en insuline, est la résultante d'une remarquable communication intra îlot qui implique notamment les canaux connexine 36 situés au niveau des jonctions lacunaires des cellules (Benninger et al., 2008; Ravier et al., 2005).

Au niveau cellulaire, le calcium active également de nombreuses voies de signalisation en se fixant à des protéines telles que les calmodulines (CaM). La CaM est un switch moléculaire qui change de conformation et de potentiel de surface en présence de Ca^{2+} , ce qui lui permet d'interagir et d'activer de nombreuses cibles dont la calcineurine (CaN) et les protéines kinases dépendantes de la Ca^{2+} /Calmoduline (CaMK) (Heit, 2007; Shen et al., 2005). Une fois activée, la CaN déphosphoryle ses substrats comme par exemple les membres de la famille NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). Cela entraîne la translocation de ces facteurs de transcription dans le noyau et favorise l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la fonction bêta pancréatique (Heit et al., 2006). Indépendamment de la voie CaN/NFAT, la CaM active aussi des CaMK (Swulius and Waxham, 2008) et plus particulièrement la CaMKII et la CaMKIV dans les cellules bêta (Easom, 1999; Yu et al., 2004). La CaMKII est un régulateur clé de la sécrétion d'insuline. En effet, une étude réalisée sur des souris transgéniques a révélé que l'inhibition de la CaMKII par un pseudosubstrat altère considérablement la tolérance au glucose en réduisant l'activité des canaux calciques et donc diminue la sécrétion d'insuline (Dadi et al., 2014a). La CaMKII agit alors comme un senseur calcique, capable de potentialiser la libération d'insuline induite par le glucose dans des

conditions physiologiques et pathologiques. Les CaMKII et IV activent des facteurs de transcription tel que CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) par phosphorylation de la serine 133 (Dalle et al., 2011). Il semble cependant que la CaMKIV soit plus efficace pour activer ce facteur de transcription (Sun et al., 1994) car elle empêcherait la translocation nucléaire de la CaMKII par phosphorylation d'un résidu proche de son signal de localisation nucléaire (Corcoran and Means, 2001). De plus, la CaMKII phosphoryle CREB sur la sérine 142, ce qui a un effet inhibiteur (Shaywitz and Greenberg, 1999). De fait, la balance de sa capacité à stimuler CREB est difficile à déterminer. Une fois activé, CREB interagit avec ses cofacteurs, le coactivateur CRT2 (CREB Regulated Transcription Coactivator 2) ainsi que la protéine de liaison CBP (CREB-Binding Protein). Cela favorise l'expression de gènes essentiels pour le maintien d'une masse cellulaire bêta pancréatique fonctionnelle (cf. II-C-4) (Dalle et al., 2011; Sabatini et al., 2019). Enfin, en plus de l'action directe sur CREB, les CaMK et principalement la CaMKII, sont capables d'activer d'autres voies de signalisation telles que la voie proliférative ERK1/2 (Illario et al., 2003) ainsi que la voie de survie Akt/PKB (Okuno et al., 2000; Yano et al., 1998).

3. Les sérine/thréonine kinases ERK1/2 et Akt

Les protéines ERK1 et ERK2, ou ERK1/2, (Extracellular signal-Regulated Kinases) appartiennent à la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases). Ce sont des protéines kinases spécifiques des résidus sérine et thréonine, qui jouent un rôle essentiel dans la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire. Dans de nombreux systèmes cellulaires, l'activation des protéines G peut conduire à l'activation de la voie ERK1/2. En effet, la stimulation d'un récepteur (RCPG ou à activité tyrosine kinase) peut activer une petite protéine G comme la GTPase Ras qui est activée sous sa forme associée au GTP. La cascade de signalisation aboutit à l'activation de Raf puis de la MAP kinase kinase (MEK), un activateur direct de ERK1/2 (Stewart et al., 2015). Par ailleurs, pour activer la voie ERK1/2 il existe une voie non canonique médiée par le calcium. En effet, la CaMKII active directement la protéine Raf (Illario et al., 2003). Une fois phosphorylé, ERK1/2 activent des facteurs de transcription impliqués dans l'exocytose, la prolifération et la survie cellulaire tels que AP-1, PDX1 ou encore CREB (Costes et al., 2006; Khoo et al., 2003; Roskoski, 2012).

La protéine Akt, également nommée PKB, est une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreux mécanismes intracellulaires tels que le métabolisme des nutriments, la croissance et la survie cellulaire (Song et al., 2005). Parmi les activateurs canoniques majeurs d'Akt dans la cellule bêta, on retrouve notamment la PI3K (PhosphoInositide 3 Kinase) activée par certains facteurs de croissance, par le glucose, mais aussi par l'insuline (De Meyts, 2016; Manning and Toker, 2017; Srinivasan et al., 2002). Une fois activée, la PI3K catalyse la conversion du Phosphatidyl-Inositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) au niveau de la membrane plasmique (De Meyts, 2016). Akt possède un domaine PH (Pleckstrin Homology) capable de lier le PIP3 membranaire avec une grande affinité, ce qui entraîne son recrutement à la membrane plasmique (Park et al., 2008). Sa liaison avec le PIP3 permet son rapprochement à proximité de kinases telles que la phosphoinositide-dépendante kinase 1 (PDK1) ou encore mTORC2 (mechanistic Target Of Rapamycin Complex 2) qui phosphorylent sa thréonine 308 et sa sérine 473 respectivement (Franke, 2008; Manning and Toker, 2017). Tout comme la voie ERK1/2, l'activation d'Akt/PKB peut également se faire via une voie non canonique indépendante de la PI3K qui implique le calcium. En effet, le calcium active des protéines de la familles des CaMKinases (Swulius and Waxham, 2008), dont certaines, comme la CaMKII, sont capables d'activer directement Akt en phosphorylant sa thréonine 308 dans différents types cellulaires (Gocher et al., 2017; Ke et al., 2013; Li and Malik, 2005; Okuno et al., 2000; Rokhlin et al., 2007; Yano et al., 1998). La signalisation Akt fait partie des voies cruciales impliquées dans la survie et le maintien de la masse cellulaire bêta pancréatique (Elghazi and Bernal-Mizrachi, 2009). Une fois activée, Akt module l'activité de ses partenaires protéiques tels que mTORC1 (mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1) et les protéines du complexe cycline D/Cdk4 (Cyclin-dependent kinase 4), qui sont des protéines dont l'activité est essentielle dans la prolifération et le maintien de la masse des cellules bêta, notamment lors des mécanismes adaptatifs qui précèdent l'apparition du diabète (Balcazar Morales and Aguilar de Plata, 2012; Fatrai et al., 2006). Akt est capable d'inactiver la protéine BAD (BCL2 Associated of cell Death) (Datta et al., 1997). BAD provoque l'apoptose en inhibant l'activité des protéines mitochondriales anti-apoptotiques comme Bcl-XL. BAD favorise ainsi la libération du cytochrome C par les mitochondries, ce qui entraîne l'activation des caspases pro-apoptotiques telles que les caspases 9, 7 ou 3. La phosphorylation de BAD par Akt provoque sa séquestration dans le cytosol et l'empêche de se lier à Bcl-XL, favorisant ainsi la survie cellulaire (Dickson and

Rhodes, 2004). De plus, il a été montré chez l'homme qu'Akt prévient l'apoptose en inactivant directement la pro-caspase 9 (Cardone, 1998). Enfin, Akt agit au niveau transcriptionnel en activant des facteurs de transcription tels que CREB (Jhala et al., 2003).

4. Le facteur de transcription CREB

Le gène *creb* fait partie de la famille des gènes *crem* (CRE Modulator) et *atf1* (Activating Transcription Factor 1) (Mayr and Montminy, 2001). Il s'agit d'un facteur de transcription de type «leucine zipper» exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme (Mayr and Montminy, 2001). Différentes protéines telles que la PKA, Akt, ERK1/2 ou encore les CaMKinases II et IV, sont capables d'activer CREB par phosphorylation de sa sérine 133 (Costes et al., 2006; Dalle et al., 2011; Jhala et al., 2003; Sun et al., 1994). Une fois activée, CREB se lie sous forme de dimère aux promoteurs contenant des éléments CRE et induit la transcription des gènes. Dans la cellule bêta pancréatique, les gènes activés transcriptionnellement par CREB varient et cette activation peut faire intervenir des coactivateurs transcriptionnels différents en fonction de la nature du stimulus (Altarejos and Montminy, 2011; Dalle et al., 2011). Ces propriétés permettent à CREB de réguler spécifiquement la transcription de gènes impliqués dans la survie et la fonction de la cellule bêta. Parmi les cibles de CREB, on retrouve notamment des gènes codants pour la cycline D1 et la cycline A2 (prolifération cellulaire), BCL-2 (fonction anti-apoptotique) ou encore l'IRS2 (Insulin Receptor Substrate 2) (Dalle et al., 2011; Jhala et al., 2003). CREB favorise également l'expression de l'insuline et de protéines nécessaires à sa sécrétion, telles que la granophiline, NOC2, Rab3a et Rab27a (Abderrahmani et al., 2006; Coppola et al., 2002; Dalle et al., 2011). Ce facteur de transcription est donc un acteur majeur pour le maintien de la fonction bêta pancréatique et il est essentiel de souligner ici que le déclin de l'activité de CREB est associé à l'intolérance au glucose dans des lignées bêta et des îlots de rat (Abderrahmani et al., 2006; Favre et al., 2011). En particulier, l'exposition chronique de cellules bêta et d'îlots pancréatiques humains à des concentrations élevées de glucose entraîne la dégradation de CREB par le protéasome via des mécanismes d'ubiquitination (Costes et al., 2009). Cette dégradation est corrélée à l'apparition du répresseur transcriptionnel ICER (Inducible cAMP Early Repressor), qui est un produit alternatif issu de la transcription du gène *crem* et reconnu en tant qu'antagoniste endogène de CREB (Mayr and Montminy, 2001; Salvi and Abderrahmani, 2014). D'un point de vue

physiologique, ICER permet de réguler l'activité de CREB et donc d'éviter une transcription exacerbée des gènes sous son contrôle (Salvi and Abderrahmani, 2014). En condition d'hyperlipidémie et d'hyperglycémie chronique, la réduction de la masse fonctionnelle des cellules bêta pancréatiques corrèle avec une augmentation de l'expression d'ICER (Salvi and Abderrahmani, 2014). Ainsi, une fine régulation de la balance CREB/ICER est nécessaire afin d'éviter une dérive vers un état pathologique.

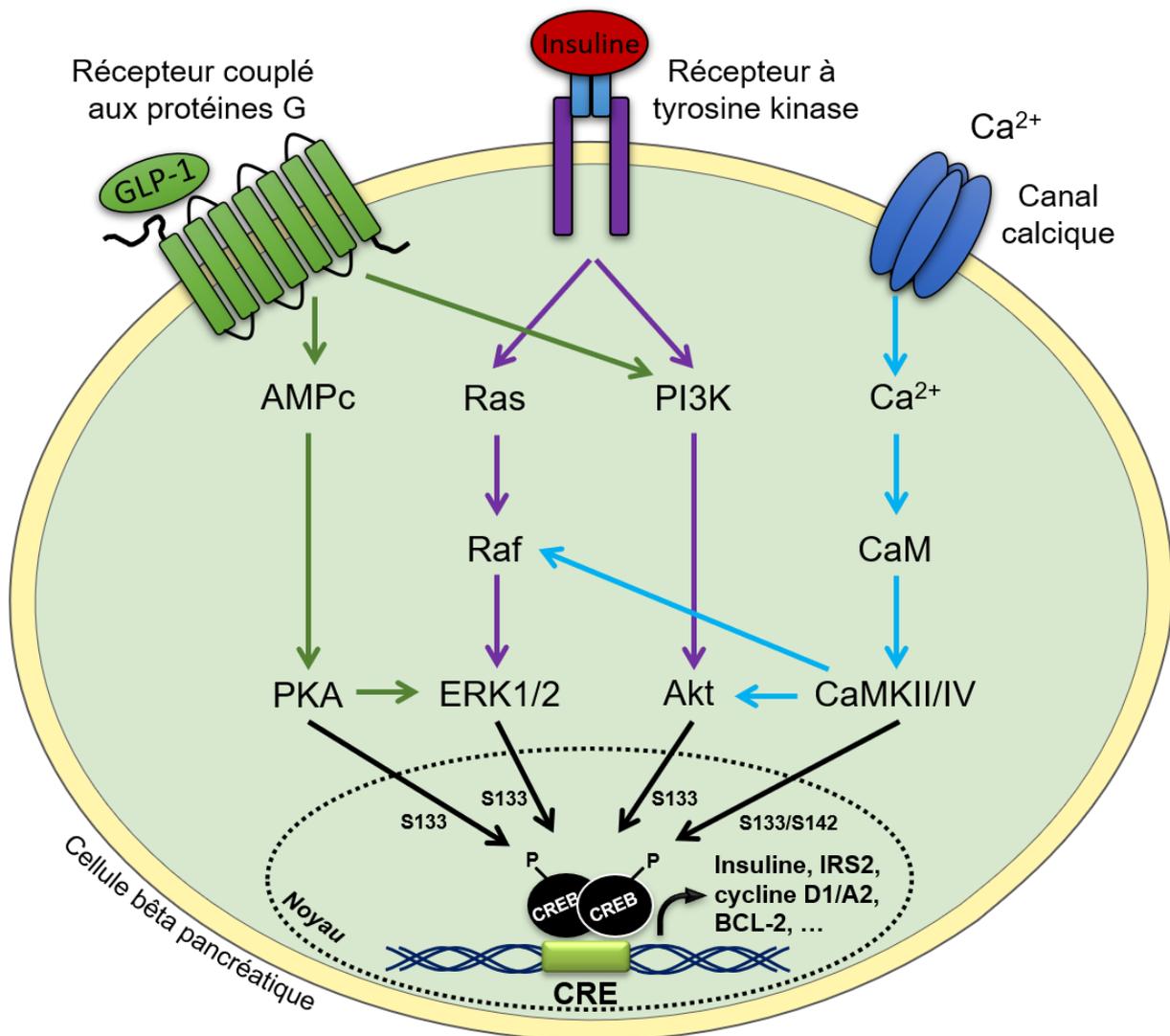


Figure 17 : Les principales voies de signalisation impliquées dans le maintien d'une masse bêta pancréatique fonctionnelle.

Les flèches représentent les principales signalisations intracellulaires impliquées dans l'activation du facteur de transcription CREB dans la cellule bêta pancréatique. Flèches vertes : Voies activées par les RCPG. Flèches violettes : Voies activées par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Flèches bleues : Voies activées par le calcium. PKA, ERK1/2, Akt et CaMKII/IV activent CREB par la phosphorylation de sa sérine 133 (S133). CaMKII peut aussi inhiber l'activité CREB en phosphorylant sa sérine 142 (S142).

III/ La prise en charge actuelle du diabète de type 2

A) La modification du mode de vie

1. L'alimentation

De nos jours, la prise en charge des patients prédiabétiques ou diabétiques commence le plus souvent par une modification du comportement alimentaire, en réduisant les apports hautement caloriques ainsi que les aliments avec un fort index glycémique.

Parmi les régimes généralement conseillés, on retrouve des régimes de type méditerranéen ou végétarien, qui sont associés à un risque plus faible de développer un diabète de type 2 (American Diabetes Association, 2021). Ces régimes sont généralement peu caloriques et riches en acides gras insaturés de type oméga 3. En effet, comme le montre l'essai PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) mené sur 3541 hommes et femmes présentant un risque cardiovasculaire élevé, un régime méditerranéen enrichie en huile d'olive extra vierge (riche en oméga 3) a réduit le risque relatif de développer un diabète de type 2 d'environ 40 %, en comparaison à un régime contrôle (Salas-Salvadó et al., 2014). Ces conclusions corrélaient avec d'autres données qui montrent que des régimes à faible teneur en glucides, végétarien ou encore de type DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) sont également associés à un risque plus faible de développer un diabète (Evert et al., 2019).

Chez la femme enceinte, il est également recommandé d'adapter l'alimentation par l'adoption d'un régime contenant à la fois tous les macro et micronutriments (vitamines, fibres, protéines, ...) essentiels à la croissance du fœtus, ainsi que des aliments à faible index glycémique et à faible teneur en graisses saturées. Cela permet de prévenir le développement d'un diabète gestationnel (Rasmussen et al., 2020). Outre le risque pour la future mère, un régime diabéto-gène semble associé à un risque plus élevé de macrosomie fœtale (>4kg à la naissance) (Vally et al., 2017) et prédisposerait également les nouveau-nés à l'obésité ainsi qu'aux troubles métaboliques liés à l'obésité à l'âge adulte (van Poppel and Desoye, 2020).

Si l'efficacité d'un type de régime dépend avant tout de sa compatibilité avec le profil métabolique de chaque patient, il est indéniable que la perte de poids chez les personnes en surpoids ou obèses a un effet significatif sur la progression de la pathologie. En effet, une étude clinique réalisée en 2013 sur des personnes obèses et insulino-résistantes montre

qu'une perte de 5% de la masse corporelle a significativement amélioré leur sensibilité à l'insuline (Trussardi Fayh et al., 2013).

2. L'exercice physique

En complément de l'alimentation, l'activité physique permet également de prévenir ou de ralentir l'apparition du diabète. Elle améliore la sensibilité à l'insuline et diminue la masse grasse abdominale (Fedewa et al., 2014; Knowler et al., 2002). Les dernières directives de l'OMS préconisent, par semaine, entre 150 et 300 minutes d'activité physique d'intensité modérée, ou 75 à 150 minutes d'activité physique d'intensité vigoureuse. Chez les enfants et les adolescents, environ 60 minutes d'activité physique d'intensité modérée à vigoureuse par jour est recommandée (Bull et al., 2020). Le type d'exercice ou d'activité physique doit cependant être adapté au profil du patient, surtout si le diabète est déjà déclaré et accompagné de complications (atteinte coronarienne, hypertension, ...). Parmi les principaux types d'exercices, on retrouve les exercices aérobiques qui sont caractérisés par une intensité faible à modérée sur une longue durée (endurance, marche, ...). A l'inverse, les exercices anaérobiques sont eux intenses et sur des courtes durées (sprint, entraînement fractionné). De manière générale, l'entraînement aérobique présente de nombreuses vertues pour le pratiquant car il améliore la circulation sanguine, le système immunitaire, la densité mitochondriale et les capacités cardiorespiratoires (Colberg et al., 2016). Chez des personnes atteintes de diabète de type 2, ce type d'exercice améliore la sensibilité à l'insuline et réduit la pression artérielle. Il entraîne également une diminution des taux plasmatiques de triglycérides et d'hémoglobine glyquée (HbA1c), qui sont des biomarqueurs de l'état diabétique. Il est aussi associé à un risque plus faible de décès (Colberg et al., 2016). Puisque le muscle est responsable d'environ 80 % de l'absorption de glucose après un repas, l'autre approche en cas de diabète de type 2 consiste à pratiquer des exercices de renforcement et/ou de croissance musculaire (Pesta et al., 2017). Ce type d'entraînement améliore la tolérance au glucose, la force musculaire et la sensibilité à l'insuline (Colberg et al., 2016). En effet, un essai clinique mené sur des personnes diabétiques montre qu'un entraînement musculaire de 30 minutes, trois fois par semaine pendant six semaines, augmente le niveau protéique du transporteur au glucose GLUT4 et améliore la signalisation à l'insuline dans le muscle squelettique (Holten et al., 2004). Des exercices de flexibilité et d'équilibre (tai chi,

yoga, ...) peuvent aussi être proposés en complément et s'adressent principalement à une classe plus âgée de la population (Colberg et al., 2016).

Si l'efficacité d'un type d'entraînement versus un autre dépend principalement du profil du patient, la réduction de la masse grasse lors d'un effort physique (quel qu'il soit) améliore en conséquence l'état inflammatoire généralement retrouvé chez des personnes diabétiques ou prédiabétiques. Néanmoins, en fonction du stade pathologique, la modification du style de vie doit s'accompagner d'un traitement médicamenteux.

B) Les traitements médicamenteux actuels

1. Les insulino-sensibilisants

Cette classe d'agents hypoglycémisants regroupe des molécules qui améliorent la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques telles que la metformine ou les glitazones. La metformine est un antidiabétique de la famille des biguanides, commercialisé en France depuis 1979. Si son mécanisme d'action principal consiste à réduire la production hépatique de glucose, elle améliore également le captage et l'utilisation de glucose par le muscle, elle inhibe l'absorption intestinale de glucose et favorise la production de GLP-1 (Feingold, 2020; Gong et al., 2012). La metformine inhibe sélectivement le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale et par conséquent, empêche la respiration cellulaire (El-Mir et al., 2000). Au niveau hépatique, ce mécanisme entraîne une baisse de la production d'ATP, ce qui diminue la néoglucogénèse et active l'AMP kinase (AMPK). Une fois activée, l'AMPK réduit l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogénèse et la lipogénèse, et favorise l'oxydation des acides gras (bêta-oxydation) ainsi que la signalisation à l'insuline (Gong et al., 2012). La metformine n'entraîne ni prise de poids, ni hypoglycémie. En plus de ces effets antidiabétiques, la metformine exercerait une protection contre les complications cardiovasculaires, le cancer et certaines maladies neurodégénératives (Feingold, 2020; Rotermund et al., 2018). La metformine n'étant pas métabolisée par l'organisme mais excrétée dans l'urine telle qu'elle, elle est déconseillée aux personnes avec des pathologies rénales (Gong et al., 2012; Sanchez-Rangel and Inzucchi, 2017). Bien qu'elle soit assez bien tolérée par l'organisme, des effets secondaires ont été observés sur le long terme tels que des troubles gastrointestinaux, une carence en vitamine B12, de l'anémie et dans des cas très rares, une acidose lactique (Aroda and Ratner, 2018; Feingold, 2020). Bien qu'au départ, la monothérapie avec la metformine

soit efficace, la détérioration progressive de la glycémie au cours du temps nécessite bien souvent l'ajout d'un autre agent antidiabétique (Feingold, 2020).

2. Les inhibiteurs de la réabsorption du glucose

Les inhibiteurs du co-transporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2) sont des agents hypoglycémisants utilisés depuis peu de temps pour le traitement du diabète de type 2. Les SGLT2, localisés dans le rein au niveau du tubule proximal, sont responsables de la réabsorption de plus de 90% du glucose filtré (Fioretto et al., 2016). Ainsi cette nouvelle approche thérapeutique favorise l'excrétion du glucose dans l'urine (glycosurie) via l'inhibition de la réabsorption du glucose par les tubules rénaux, entraînant en conséquence une baisse de la glycémie (Hsia et al., 2017). A noter que cet effet hypoglycémiant est donc complètement indépendant de l'état fonctionnel des cellules bêta pancréatiques ainsi que du niveau d'insulinosensibilité des tissus cibles de l'insuline, ce qui en fait une alternative intéressante pour des personnes avec un stade diabétique avancé, mais possédant cependant une fonction rénale préservée. Une méta analyse, regroupant 66 essais cliniques d'au moins 12 semaines menés sur des personnes diabétiques, montre que les inhibiteurs des SGLT2 diminuent les taux d'HbA1c (Monami et al., 2018). L'étude révèle aussi que l'effet des sulfonyles est supérieur à celui des inhibiteurs des SGLT2 à 12 semaines, ce qui n'est plus le cas à 24 et à 52 semaines, où les effets des 2 classes d'antidiabétiques sur les taux d'hémoglobine glyquée semblent plutôt similaires. En revanche, après 104 semaines de traitement, l'effet des inhibiteurs des SGLT2 sur la réduction du taux d'HbA1c apparaît supérieur à l'effet des sulfonyles (Monami et al., 2018). Ainsi, en comparaison à d'autres traitements, l'efficacité des inhibiteurs des SGLT2 semble stable et ce, au moins jusqu'à deux ans de traitement. L'utilisation de ces inhibiteurs en co-traitement avec d'autres agents hypoglycémisants (metformine, sulfonyles, insuline, ...) semble avoir le même effet sur la diminution du taux d'HbA1c que leur utilisation en monothérapie (Feingold, 2020). Outre l'effet sur la réabsorption du glucose par le rein, ce type d'agent antidiabétique induit une perte de poids, diminue la pression sanguine (ce qui peut être dû à la perte de poids), réduit les risques d'accidents cardiovasculaires liés au diabète (pour certains d'entre-eux) et améliore la fonction rénale (Feingold, 2020; Kosiborod et al., 2017; Tahrani et al., 2016). La prise d'inhibiteurs des SGLT2 peut cependant avoir des effets secondaires délétères plus ou moins

importants en fonction du type d'inhibiteur utilisé. De manière générale, le principal effet secondaire est une augmentation de l'incidence d'infections génitales (mycoses) et d'infections urinaires. Ce type de traitement est également associé à une baisse de la pression sanguine (dû à l'effet diurétique de ces agents antidiabétiques), mais aussi à une augmentation du risque d'acidocétose diabétique, d'amputations, d'ostéoporose et de fractures osseuses et de lésions rénales aiguës (conséquence de l'hypovolémie et l'hypotension induites par le traitement) (Lupsa and Inzucchi, 2018).

3. Les insulino-sécréteurs gluco-indépendants

Les sulfamides hypoglycémiantes, ou sulfonylurées, sont une classe de molécules utilisée depuis plus de 60 ans comme agents hypoglycémiantes dans le traitement du diabète de type 2. Ils agissent sur la cellule bêta pancréatique et déclenchent la sécrétion d'insuline (Sola et al., 2015). En effet, les sulfonylurées se lient à la sous-unité SUR1 des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K-ATP), ce qui entraîne la fermeture du canal. L'augmentation de la concentration de K^+ dans le cytoplasme dépolarise la membrane plasmique et entraîne l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage, favorisant ainsi l'exocytose des granules d'insuline (Proks et al., 2002). Les sulfonylurées de première génération (acetoexamide, chlorpropamide, tolazamide et tolbutamide) ont une faible affinité pour les canaux K-ATP et ne sont quasiment plus utilisés en clinique. Ils ont depuis été remplacés par des sulfonylurées dits de deuxième génération (glibenclamide, glipizide et glimepiride), plus affins (Feingold, 2020). Cependant, quelle que soit la génération, l'effet des sulfonylurées sur la sécrétion d'insuline étant complètement indépendant du glucose, l'hypoglycémie grave constitue le principal risque de ce type de traitement (Sola et al., 2015). Parmi les autres effets secondaires on retrouve la prise de poids, la rétention d'eau (1ère génération seulement), ou encore dans des cas plus rares, une rétention de la bile dans le foie (cholestase intrahépatique) ainsi que des réactions cutanées (Feingold, 2020). De plus, certains sulfonylurées interagissent également avec les sous-unités SUR2 des canaux K-ATP, exprimés de façon importante dans le cœur ainsi que dans le muscle. Ainsi, bien que ce point fasse débat, de plus en plus d'études descriptives ont associé la prise de sulfonylurées à un risque élevé d'accidents cardiovasculaires et de décès (Azoulay and Suissa, 2017; Pladevall et al., 2016). La durabilité de l'effet bénéfique des sulfonylurées sur la glycémie décroît dans le temps et dépend surtout

de l'état de la masse cellulaire bêta fonctionnelle. Ainsi, en fonction de l'avancement du stade pathologique ou du temps de traitement, un autre type d'agent antidiabétique peut être donné en remplacement ou en co-traitement avec les sulfonylurées (Feingold, 2020).

4. Les insulino-sécréteurs de type incrétine

Ce type de traitement s'inspire des propriétés des incrétones endogènes telles que le GLP1 ou le GIP qui jouent un rôle important dans le contrôle de la glycémie (Nauck and Meier, 2018). Physiologiquement, la demi-vie du GIP ou du GLP-1 endogène est très courte (1-7min), puisqu'ils sont dégradés très rapidement par une enzyme, la dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) (Mentlein et al., 1993). Chez les personnes atteintes de diabète de type 2, cet effet incrétine est défaillant (Nauck and Meier, 2016). Cependant, alors que la cellule bêta pancréatique des diabétiques reste sensible au GLP1, elle ne répond plus au GIP (Nauck et al., 1993). Cela a permis l'élaboration de deux grandes approches thérapeutiques, les inhibiteurs des DPP-IV (prise orale) et les analogues au GLP1 résistants à la dégradation (injectables en sous cutanée). Les inhibiteurs des DPP-IV (DPP-IVi) (Vildagliptine, Sitagliptine, saxagliptine, ...) préviennent la dégradation du GLP1 et du GIP endogènes, ce qui favorise la sécrétion d'insuline et inhibe la libération de glucagon de manière dépendante du glucose (Ahrén, 2019). La perte de la sécrétion d'insuline et l'hypersécrétion de glucagon étant des caractéristiques qui favorisent le développement du diabète de type 2, les DPP-IVi semblent donc plutôt adaptés dans des phases précoces de la pathologie (Ahrén, 2019). En effet, un essai clinique mené sur des personnes diabétiques révèle qu'un traitement de 12 semaines avec des DPP-IVi restaure partiellement la sensibilité de la cellule bêta au GIP (Aabo et al., 2015). Également, une méta-analyse récente regroupant 58 essais cliniques menés sur des personnes diabétiques montre qu'en comparaison à un placebo, l'utilisation des DPP-IVi diminue les taux d'hémoglobine glyquée, réduit la glycémie à jeun et peut, selon le type de DPP-IVi utilisé, entraîner une perte de poids (Ling et al., 2019). Si ce traitement semble moins efficace que la metformine, les inhibiteurs des SGLT2 ou encore des sulfonylurées à court terme, les DPP-IVi sont globalement bien tolérés par l'organisme (Feingold, 2020). Ils diminuent la pression sanguine et ne semblent pas avoir d'incidence sur la fonction cardiaque (Ahrén, 2019). En revanche, les DPP-IVi peuvent avoir, dans de rares cas, des effets secondaires plus ou moins graves, parmi lesquels un risque de développer une pancréatite aiguë, un risque d'hypoglycémie quand ils

sont utilisés en complément d'un autre traitement et des douleurs articulaires (arthralgie) (Feingold, 2020; Sesti et al., 2019). Enfin, l'autre conséquence majeure de cette thérapie est qu'elle entraîne une accumulation importante et persistante de GLP-1 et de GIP dans la circulation sanguine, ce qui réduit la glycémie à jeun (Davies et al., 2020).

L'utilisation d'agonistes des récepteurs au GLP-1 (GLP-1R) (Exenatide, Liraglutide, Semaglutide, ...) constitue l'autre grande approche des traitements basés sur l'effet incrétine. Alors que les DPP-IVi potentialisent l'effet des incrétines endogènes, les agonistes des GLP-1R (ou GLP-1Ra) miment artificiellement les effets du GLP-1. Ainsi, ces deux thérapies sont intéressantes car elles augmentent la sécrétion d'insuline uniquement en présence de glucose et inhibent la sécrétion de glucagon. Cependant, la stimulation des GLP-1R par les analogues réduit, en plus, la production de glucose hépatique, ralentit la vidange gastrique et améliore la satiété (Drucker and Nauck, 2006). Cet effet peut être dû au fait que la quantité d'agonistes injectés est supérieure à la quantité de GLP-1 endogène maintenue par les DPP-IVi, ce qui stimule donc plus efficacement les GLP-1R (Gilbert and Pratley, 2020). L'utilisation de ligands des GLP-1R chez des patients diabétiques diminue légèrement leur glycémie à jeun et améliore leur tolérance au glucose en réduisant leur glycémie postprandiale. Les études cliniques montrent aussi une baisse des niveaux d'hémoglobine glyquée (1-2%) ainsi qu'une perte de poids. Cela est variable en fonction de la durée du traitement et de l'agoniste utilisé (Drucker and Nauck, 2006; Tran et al., 2018). Il existe différents GLP-1Ra qui se distinguent notamment par leur homologie avec le GLP-1, leur temps de demi-vie, leurs effets sur le contrôle de la glycémie, sur la perte de poids, mais également par leur tolérance et leurs effets secondaires sur l'organisme (Davies et al., 2020). Parmi eux, l'exenatide, une version synthétique de l'exendine-4, qui est le premier agoniste injectable des GLP-1R à avoir été autorisé en 2005 par la FDA (2006 en Europe) pour le traitement du diabète de type 2 (Nauck et al., 2021). L'exendine-4 possède un puissant effet incrétine. C'est un peptide initialement isolé à partir des sécrétions salivaires d'un lézard (le Monstre de Gila), qui partage 53% d'homologie avec le GLP1 humain et qui résiste à la dégradation par les enzymes DPP-IV (Dalle et al., 2013). Bien que l'exendine-4 soit plus stable que le GLP-1 avec une demi-vie d'environ 33 minutes après injection (Edwards et al., 2001), elle a initialement été catégorisée comme un agoniste à action courte et nécessite deux injections par jour pour être efficace (Nauck et al., 2021). D'autres versions plus stables ont été développées. Ces dérivés dits « à action

longue » maintiennent l'effet bénéfique de l'exendine-4 sur le contrôle de la glycémie grâce à des injections sous-cutanées hebdomadaires (Nauck et al., 2021).

Ce type de traitement est une approche très efficace, car il peut à la fois potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, mais aussi favoriser la néogénèse, la prolifération, ainsi que la survie des cellules bêta (Costes et al., 2021; Dalle et al., 2013). Par exemple, l'exendine-4 protège la cellule bêta de l'apoptose induite par la cytokine diabéto-gène IL-1 β en interférant avec la voie pro-apoptotique JNK (Ferdaoussi et al., 2008). Elle est aussi capable de protéger la cellule bêta d'un stress du RE (Jiang and Wan, 2018) et d'un stress oxydatif (Li et al., 2013). Le traitement à l'exendine-4 induit également la prolifération des cellules bêta grâce à l'expression de la cycline A2 (Song et al., 2008). Ces effets protecteurs et prolifératifs impliquent l'activation de la PKA et des voies Akt et ERK1/2 (Rowlands et al., 2018).

De manière intéressante, les agonistes du GLP-1R ont des effets bénéfiques au niveau cérébral. Ils protègent les neurones de l'apoptose, réduisent le stress oxydatif et favorisent la plasticité synaptique ainsi que la prolifération neuronale (Holst et al., 2011). De plus, l'exendine-4 réduit la prise alimentaire ainsi que la masse corporelle en augmentant l'expression du peptide anorexigène pro-opiomelanocortine (POMC) sécrété par les neurones du noyau arqué hypothalamique (ou ARC) de rats (Yang et al., 2014). Cet effet peut s'expliquer par l'activation de la voie IRS-1/PI3K/AKT dans la région de l'ARC, en réponse à un traitement d'exendine-4 (Yang et al., 2017).

Les principaux effets secondaires de cette thérapie sont des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, constipation, diarrhée, ...) ainsi qu'une augmentation de la fréquence cardiaque (Consoli and Formoso, 2015). Il est à noter que certains rapports d'analyse chez l'Homme et d'études animales ont mis en garde sur l'utilisation à long terme des agonistes du GLP-1R et indiquent un risque accru de pancréatites qui peuvent dégénérer en cancer du pancréas (Elashoff et al., 2011). Il est malgré tout difficile de conclure sur le risque réel car des méta-analyses plus récentes ne montrent aucune association significative entre l'utilisation d'agonistes du GLP-1R et le risque de développer une pantréatite et un cancer du pancréas (Abd El Aziz et al., 2020; Singh et al., 2020b). Ces possibles effets secondaires étant encore vigoureusement débattus, ils méritent cependant d'être considérés.

Molécules thérapeutiques	Effets principaux	Efficacité à diminuer la glycémie	Autres bénéfices notables	Inconvénients et risques principaux
Metformine	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Production hépatique de glucose ↗ Absorption périphérique du glucose 	Elevée	<ul style="list-style-type: none"> - Peu cher - Pas d'hypoglycémie - Utilisé depuis longtemps - Pas de prise de poids - Possible protection contre les complications cardiovasculaires, le cancer et certaines maladies neurodégénératives 	<ul style="list-style-type: none"> - Troubles gastro-intestinaux - Déficience en vitamine B12 - Acidose lactique (rare) - Possible altération de la fonction rénale
Sulfonurées	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Sécrétion d'insuline 	Elevée	<ul style="list-style-type: none"> - Peu cher - Action rapide - Utilisé depuis longtemps 	<ul style="list-style-type: none"> - Risque d'hypoglycémie - Indépendant de la glycémie - Prise de poids - Action limitée dans le temps - Possibles risques cardiovasculaires
Inhibiteurs des SGLT2	<ul style="list-style-type: none"> ↘ Réabsorption du glucose 	Moyenne	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de poids - Pas d'hypoglycémie - Réduit les risques cardiovasculaires - Améliore la fonction rénale - Diminue la pression sanguine 	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement coûteux - Mycose génitale - Infections urinaires - Risque d'acidocétose diabétique - Lésions rénales aiguës - Ostéoporose - Gangrène de Fournier (rare)
Inhibiteurs des DPP-IV	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Sécrétion d'insuline 	Moyenne	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de prise de poids - Pas d'hypoglycémie - Baisse de la pression sanguine 	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement coûteux - Pancréatite aiguë - Arthrose - Douleurs articulaires - Dermatoses bulleuses (rare) - Troubles gastro-intestinaux
Agonistes des GLP-1R	<ul style="list-style-type: none"> ↗ Sécrétion d'insuline 	Elevée	<ul style="list-style-type: none"> - Réduit la prise alimentaire (perte de poids) - Pas d'hypoglycémie - Action longue - Réduit les risques cardiovasculaires (liraglutide et semaglutide) - Thérapie prometteuse contre certaines maladies neurodégénératives 	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement coûteux - Troubles gastro-intestinaux - Augmente la fréquence cardiaque - Suspicion de cancer du pancréas et de la thyroïde - Possible risque de pancréatite

Figure 18 : Tableau récapitulatif des effets des thérapies utilisées classiquement contre le diabète de type 2. Modifié d'après (Feingold, 2020).

Ces traitements qui miment les propriétés du GLP-1 endogènes ont prouvé leur efficacité dans le traitement du diabète de type 2. Ainsi, s'inspirer des propriétés de molécules physiologiques permet une thérapie ciblée et efficace, mais qui n'exclue pas les effets secondaires. En effet, ces agonistes synthétiques étant résistants à la dégradation par la DDP-IV, leur niveau circulant est maintenu sur des temps plus long que celui de la molécule endogène. De plus, leur posologie a été établie et ajustée uniquement en fonction de l'amélioration des constantes métaboliques (HbA1c, glycémie, ...) et leur concentration sanguine pourrait de ce fait, être très largement supérieure à la concentration physiologique du GLP-1. En somme, ces molécules miment les effets de l'analogue endogène mais en surstimulant son récepteur et pendant des temps qui peuvent être hors de la fenêtre physiologique des entéro-peptides. Cela peut en partie expliquer les différents effets secondaires de cette thérapie.

Ainsi, l'usage d'une approche thérapeutique mieux maîtrisée d'un point de vue des doses utilisées, mais qui conserve les effets bénéfiques des agonistes du GLP-1 sur la survie et la fonction de la cellule bêta, serait idéale.

IV/ Le propeptide de la sortiline et ses dérivés, une approche innovante contre le diabète de type 2

A) La sortiline ou récepteur 3 à la neurotensine (NTSR3)

1. Généralités

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 acides aminés retrouvé dans le système nerveux central (SNC) ainsi que dans la périphérie. Depuis sa découverte et sa purification à partir de l'hypothalamus bovin (Carraway and Leeman, 1973) puis du tractus gastro-intestinal bovin (Kitabgi et al., 1976), de nombreuses études l'ont associé à une grande variété de mécanismes physiologiques. En effet, dans le SNC, la neurotensine a été montrée comme un régulateur du système dopaminergique (Binder et al., 2001), glutamatergique (Ferraro et al., 2008), cholinergique et GABAergique (Petkova-Kirova et al., 2008). La neurotensine a aussi des propriétés analgésiques qui impliquent des mécanismes indépendants des récepteurs aux

opiacées (Clineschmidt and McGuffin, 1977; Clineschmidt et al., 1979, 1982). Toujours au niveau cérébral, la neurotensine exerce des effets anorexigènes qui permettent de réguler l'appétit, ce qui a une incidence logique sur la masse corporelle (Pour revue voir (Schroeder and Leininger, 2018)). En plus de ces propriétés centrales, la neurotensine agirait comme une hormone au niveau des tissus périphériques et plus particulièrement du pancréas endocrine (Mazella et al., 2012). En effet, alors qu'à de faibles concentrations en glucose la neurotensine stimule la sécrétion de somatostatine, de glucagon et d'insuline, elle inhibe la libération de ces trois peptides lorsque le taux de glucose est élevé (Béraud-Dufour et al., 2010; Dolais-Kitabgi et al., 1979). Les effets de la neurotensine dépendent surtout du type de récepteur activé, parmi lesquels NTSR1 (NeuroTenSin Receptor 1), NTSR2 et NTSR3/Sortiline, tous exprimés dans la cellule bêta pancréatique. Par exemple, de par sa liaison au NTSR2, la neurotensine protège la cellule bêta pancréatique de l'apoptose induite par la cytokine pro-inflammatoire et diabéto-gène IL-1 β via l'activation de la voie PKA (Coppola et al., 2008). Cette protection est dépendante de la présence de la sortiline (Béraud-Dufour et al., 2009).

2. Structure et distribution

La sortiline est une protéine d'environ 100 kDa initialement purifiée dans le cerveau et identifiée premièrement comme une protéine d'adressage, puis comme un récepteur membranaire de haute affinité pour la neurotensine ($K_d=0,3nM$) (Mazella et al., 1989, 1998; Petersen et al., 1997; Zsürger et al., 1994). Alors que les deux autres récepteurs NTSR1 et NTSR2 sont couplés aux protéines G (Chalon et al., 1996; Mazella et al., 1996; Tanaka et al., 1990), la sortiline appartient à la famille des récepteurs de type I VPS10P (Vacuolar protein sorting 10 protein) (Petersen et al., 1997). Cette famille de récepteurs (composée également de SorLA, SorCS1,2 et 3) est caractérisée par la présence d'un seul segment transmembranaire et d'un domaine VPS10p homologue à celui de la protéine vacuolaire VPS10 de la levure, suivi par une séquence constituée de 10 cystéines conservées (domaine 10CC). L'extrémité N-terminale comporte un peptide signal et un propeptide délimité du reste de la protéine par un site de clivage par la protéine convertase furine. L'extrémité intracellulaire, en C-terminal, est impliquée dans l'internalisation du récepteur (Figure 19) (Mazella et al., 1998; Westergaard et al., 2004).

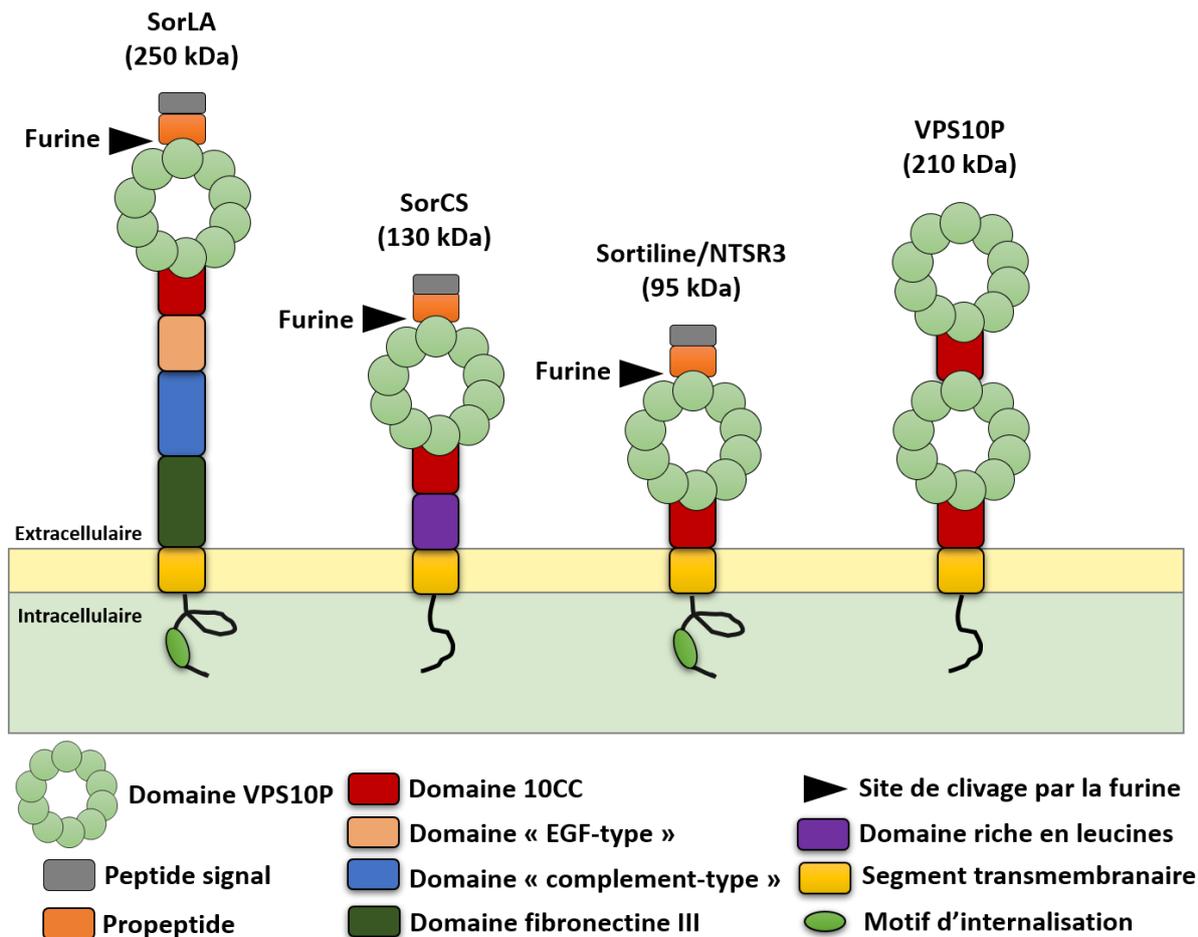


Figure 19 : Représentation schématique de la famille des récepteurs au domaine VSP10P. Les membres de cette famille de récepteurs (SorLA, Sortilin et SorCS) présentent des caractéristiques structurales communes telles qu'un domaine VPS10 riche en cystéines auquel est accolée une séquence de 10 cystéines conservées (domaine 10CC). Ils possèdent également un peptide signal et un propeptide qui est délimité du reste de la protéine par un site de clivage par la furine. Cette famille n'est constituée que d'un seul segment transmembranaire ainsi que d'une courte queue cytoplasmique. SorLA et sortiline portent un motif d'internalisation hexapeptidique consensus (F/Y)ENTL(F/Y). Modifié d'après (Mazella, 2001).

La particularité structurale de la sortiline est que les cystéines du segment VSP10 sont reliées par des ponts disulfures et forment un motif en forme de boucle (Quistgaard et al., 2009). Cette structure composée de 10 feuillets bêta forme un tunnel qui contient de nombreux sites de liaison, dont celui de la neurotensine (Figure 20) (Quistgaard et al., 2009, 2014).

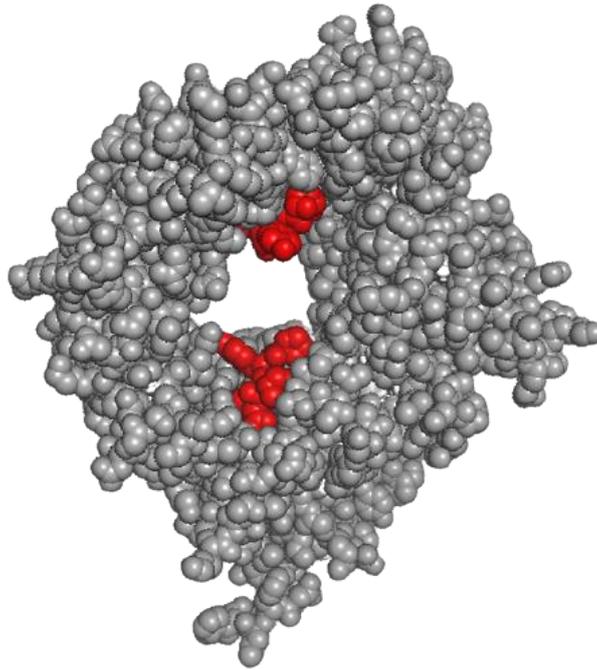


Figure 20 : Modélisation structurale du domaine extracellulaire de la sortiline.

La structure du domaine extracellulaire de la sortiline a été déterminée à une résolution de 2Å par cristallographie, en présence de son ligand la neurotensine (Quistgaard et al., 2009). Cela a révélé deux sites de liaison peptidique au sein du tunnel du domaine en hélice bêta. La sortiline est représentée en gris et la neurotensine en rouge sur son site de liaison. D'après (Blondeau et al., 2019).

La sortiline est fortement exprimée dans le SNC, en particulier dans le gyrus denté, l'hippocampe et le cortex cérébral (Hermans-Borgmeyer et al., 1999). Elle est également exprimée dans de nombreux tissus périphériques tels que le cœur, la moelle épinière, les yeux, les muscles squelettiques, les testicules, le pancréas, le placenta, la prostate ou encore dans l'intestin grêle (Mazella, 2001; Petersen et al., 1997). Au niveau cellulaire, seulement 5 à 10% de la sortiline est présente à la membrane plasmique, alors que l'essentiel de la protéine est situé dans les vésicules intracellulaires de transport et du trans-Golgi (Morris et al., 1998; Petersen et al., 1997).

La sortiline peut exister sous une forme soluble (Navarro et al., 2002). Sa partie juxtamembranaire extracellulaire comporte un site reconnu par la métalloprotéase transmembranaire ADAM10 (Evans et al., 2011). Après clivage, la partie extracellulaire de la sortiline est libérée dans le milieu (Evans et al., 2011) et peut se lier à certains partenaires comme la neurotensine (Navarro et al., 2002).

3. Rôles biologiques de la sortiline

La sortiline possède de multiples fonctions biologiques. Elle agit comme récepteur ou co-récepteur de différents ligands, régule le trafic cellulaire en adressant de nombreuses protéines soit vers la membrane plasmique, soit vers les lysosomes et peut, sous sa forme soluble, activer des voies de signalisations intracellulaires (Lefrancois et al., 2003; Massa et al., 2013; Mazella and Vincent, 2004; Willnow et al., 2008). Il est important de noter que la petite taille de l'extrémité C-terminale cytoplasmique de la sortiline ne lui permet pas de déclencher un signal intracellulaire par elle-même (Mazella and Vincent, 2004). De fait, la compréhension des rôles biologiques de la sortiline passe par l'identification de ses partenaires protéiques (ligands, récepteurs, canaux, ...).

La figure 21 montre que la sortiline interagit avec des classes de ligands particulières parmi lesquelles des neuropeptides, des cytokines, des facteurs de croissance du SNC ou encore des glycoprotéines impliquées dans le transport des lipides. Cela permet de se représenter une partie de ses rôles physiologiques possibles. Un certain nombre d'entre-eux sont développés ci-dessous.

Ligands	Poids moléculaires	Affinités pour la sortiline (Kd)	Références
Neurotensine	~1,7 kDa	~0,3 nM	(Mazella et al., 1989, 1998)
Propeptide (PE) de la sortiline	~4,8 kDa	~20 nM	(Petersen, 1999)
Spadine	~1,8 kDa	~8 nM	(Mazella et al., 2010)
Lipoprotéine lipase (LPL)	~50 kDa	~26 nM	(Nielsen et al., 1999)
proNGF (Nerve Growth Factor)	~27 kDa	~5 nM	(Nykjaer et al., 2004)
NGF mature	~13 kDa	~90 nM	(Nykjaer et al., 2004)
proBDNF(Brain-Derived Neurotrophic Factor)	~14 kDa	~0,4 nM	(Teng, 2005)
Apo lipoproteine A5	~41 kDa	~350 nM	(Nilsson et al., 2008)
Apo lipoproteine B100	~500 kDa	-	(Kjolby et al., 2010)
Apo lipoproteine E3	~34 kDa	~44 nM	(Carlo et al., 2013)
Apo lipoproteine E4	~34 kDa	~114 nM	(Carlo et al., 2013)
Progranuline (PGRN)	~68,5 kDa	~15,4 nM	(Hu et al., 2010)
APP (Amyloid Precursor Protein)	~110 kDa	-	(Yang et al., 2013)
Interféron- α (INF- α)	~20 kDa	~550 nM	(Yabe-Wada et al., 2016)
Interféron- γ (INF- γ)	~20 kDa	~1 nM ~2,6 μ M	(Mortensen et al., 2014) (Yabe-Wada et al., 2016)
Interleukine-6 (IL-6)	~23,7 kDa	~7 nM ~1,1 μ M	(Mortensen et al., 2014) (Yabe-Wada et al., 2016)
Interleukine-10 (IL-10)	~17 kDa	~286,6 nM	(Yabe-Wada et al., 2016)
Interleukine-12 (IL-12)	~70 kDa	~13,6 nM	(Yabe-Wada et al., 2016)
Interleukine-17A (IL-17A)	~35 kDa	~334,8 nM	(Yabe-Wada et al., 2016)

Figure 21 : Tableau récapitulatif des différents ligands de la sortiline/NTSR3.

Le rôle de récepteur et de co-récepteur

La viabilité des cellules neuronales et non-neuronales : La sortiline est capable de moduler la viabilité neuronale en agissant comme co-récepteur des pro-neurotrophines proNGF (Nerve Growth Factor) et proBDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Nykjaer and Willnow, 2012). Les neurotrophines sont des facteurs de croissance essentiels pour la fonction et le développement du système nerveux (Teng et al., 2010). Leurs effets biologiques sont transmis suite à leur fixation sur un complexe de récepteurs spécifiques formé par l'assemblage du récepteur p75NTR (p75 NeuroTrophin Receptor ; récepteur commun à toutes les neurotrophines) avec les récepteurs à activité tyrosine kinase TrkA, TrkB ou TrkC (Nykjaer and Willnow, 2012). Les formes immatures des neurotrophines (les pro-neurotrophines)

provoquent quant à elles l'apoptose des neurones et cet effet pro-apoptotique dépend de la présence de la sortiline. En effet, la sortiline est capable de lier les pro-domaines des proNGF et proBDNF, quand elle est en interaction avec le récepteur p75NTR, ce qui entraîne la mort des neurones en déclenchant une signalisation pro-apoptotique qui implique l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Arnett et al., 2007; Nykjaer et al., 2004; Teng, 2005). Ce mécanisme pro-apoptotique a également été observé dans les lymphocytes (Rogers et al., 2010). Ce complexe Sortiline/p75NTR a été mis en évidence dans les cellules endocrines du pancréas et des études menées sur des rats diabétiques révèlent une baisse du rapport d'expression NGF/proNGF dans le cerveau, ainsi qu'une augmentation de l'expression de p75NTR dans le pancréas (Polak et al., 1993; Soligo et al., 2015; Sposato et al., 2007). Ces données suggèrent donc que le complexe Sortiline/p75NTR pourrait participer à la destruction du système endocrine lors du diabète (Blondeau et al., 2019).

Le rôle d'adressage à la membrane

De manière générale, la protéine destinée à être adressée à la membrane est prise en charge par la sortiline au niveau du *trans*-Golgi, grâce à sa fixation au domaine VPS10 de cette dernière.

La sécrétion de cytokines : La sortiline possède de nombreuses fonctions au sein du système immunitaire, dont celle de favoriser la sécrétion de différentes cytokines dans différentes cellules telles que la microglie, les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les macrophages de type 1 ou encore les lymphocytes T (Talbot et al., 2019). En particulier dans ces cellules, elle est capable de lier et d'adresser vers les sites d'exocytose les cytokines pro-inflammatoires interféron- γ (INF- γ) et les interleukine-6, 12 et 17A, la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 (IL-10) et enfin l'interféron- α (INF- α) qui est une cytokine dite anti-virale, c'est-à-dire qui bloque la réplication virale (Mortensen et al., 2014; Yabe-Wada et al., 2016). Dans les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (Natural Killer), la sortiline régule également la libération de granzyme A, qui est une enzyme cytotoxique qui entraîne la destruction des cellules ou microorganismes cibles (Herda et al., 2012). Ces données montrent que la sortiline est importante dans le maintien d'une réponse immunitaire compétente.

Le transport du glucose : De plus en plus d'études soulignent l'importance de la sortiline dans les mécanismes qui maintiennent l'homéostasie du glucose. Dans les adipocytes et les cellules musculaires, la sortiline colocalise avec le transporteur au glucose GLUT4 dans des vésicules spécifiques dont la translocation vers la membrane plasmique est dépendante de l'insuline (Bogan and Kandror, 2010). Une fois à la membrane, les transporteurs GLUT4 assurent le transport du glucose extracellulaire vers le cytosol de la cellule. Une étude réalisée sur des adipocytes montre que la déplétion de la sortiline diminue le temps de demi-vie de GLUT4 et bloque son accès aux compartiments vésiculaires sollicités en réponse à l'insuline. A l'inverse, l'expression de la sortiline dans les préadipocytes qui n'expriment pas la protéine de manière endogène, restaure les niveaux de GLUT4 dans la cellule en empêchant sa dégradation par les lysosomes (Pan et al., 2017). GLUT4 est alors réorienté par transport rétrograde vers le trans-Golgi, où il est recyclé dans des vésicules spécialisées puis re-adressé à la membrane plasmique sous l'effet de l'insuline. La sortiline est donc capable de conférer aux cellules non-différenciées, la capacité de transporter le glucose en réponse à une stimulation de l'insuline, une fonction normalement restreinte aux adipocytes (Kandror, 2018; Pan et al., 2017). La sortiline participerait donc au transport régulé de GLUT4 vers la surface des cellules. Ces résultats corroborent d'autres données montrant une diminution de l'expression de la sortiline dans des cas d'obésité et de diabète (Ai et al., 2012; Kaddai et al., 2009; Keller et al., 2008). Cependant, de manière surprenante les souris KO pour la sortiline assimilent mieux le glucose dans les tests de tolérance à l'insuline, que les souris sauvages (Rabinowich et al., 2015).

La régulation de l'excitabilité membranaire : Le potentiel de membrane joue un rôle essentiel dans la fonction de nombreuses cellules excitables telles que les neurones et la cellule bêta pancréatique. De manière intéressante, la sortiline est impliquée dans l'adressage à la membrane des canaux potassiques de fond TREK-1 (TWIK-related potassium channel 1) dans ces deux types cellulaires (Hivelin et al., 2016; Mazella et al., 2010). Ces canaux participent au contrôle du potentiel de repos de la membrane et préparent la cellule à des stimuli dépolarisants (Kim and Kang, 2015). La délétion du gène de la sortiline *Sort1* chez des souris diminue la présence de TREK-1 à la membrane plasmique des neurones et augmente

leur potentiel de membrane (Moreno et al., 2018). Au niveau comportemental, les souris *Sort1*^{-/-} présentent également un comportement plus anxieux que les souris sauvages et sont résistantes à la dépression (Moreno et al., 2018). Cet aspect pathologique est abordé dans la partie suivante.

Le rôle d'adressage vers le lysosome

En plus de sa fonction d'adressage à la membrane, la sortiline est impliquée dans le tri des cargaisons lysosomales (Amengual et al., 2018; Lefrancois et al., 2003; Nielsen, 2001; Nielsen et al., 1999). Cette propriété implique le motif peptidique situé sur la partie C-terminale cytoplasmique de la sortiline (Figure 19), reconnu par différentes protéines de tri cellulaire comme GGA2 (Golgi associated, Gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2), une protéine d'adressage et de trafic entre le *trans*-Golgi et les endosomes (Nielsen, 2001).

La sortiline intervient notamment dans la dégradation lysosomale des protéines mal-repliées. La reconnaissance de ces protéines semble se faire par le domaine VPS10, néanmoins, on ne sait pas comment se fait la distinction entre une protéine correctement repliée et une protéine mal-repliée (Jørgensen et al., 1999; Sun and Brodsky, 2019). Cette fonction de la sortiline est importante car elle permet d'éviter une aggrégation pathologique de ces protéines mal-repliées comme on peut l'observer dans les maladies neurodégénératives d'Alzheimer et de Parkinson. Ce point est détaillé dans la partie suivante.

Le rôle de la sortiline soluble

De manière intéressante, la forme soluble de la sortiline a des propriétés biologiques. Par exemple, des études réalisées sur une lignée cellulaire de cancer du côlon humain (HT29) montrent que la sortiline soluble augmente la concentration intracellulaire de calcium et active la voie de survie PI3K (Massa et al., 2013). De plus, sa liaison sur les HT29 altère l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, en modifiant l'architecture des desmosomes et en diminuant l'expression de certaines intégrines (Massa et al., 2014). Ces propriétés pourraient ainsi jouer un rôle important dans l'agressivité de certains cancers, en favorisant le développement de métastases. D'autres études ont par la suite associé la présence de

sortiline soluble avec certaines pathologies cérébrales, cardiaques et métaboliques, ce qui sera abordé dans la partie suivante (Buttenschøn et al., 2015; Goettsch et al., 2018).

4. Dérégulation et pathologies associées

La sortiline étant impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques, une dérégulation de son expression ou de sa structure peut avoir des conséquences délétères qui favorisent l'apparition de certaines pathologies.

Les pathologies cérébrales

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative, causée entre autres par l'accumulation de la protéine bêta amyloïde dans le cerveau, ce qui entraîne une perte progressive de la mémoire et de certaines fonctions cognitives (Perl, 2010). L'apolipoprotéine E (apoE) est une glycoprotéine capable de lier les protéines bêta amyloïdes, ainsi que la sortiline. Une fois liées, la sortiline internalise APOE et l'adresse vers les lysosomes, ce qui participe en conséquence à la destruction des dépôts toxiques bêta-amyloïdes (Carlo, 2013). De plus, la sortiline régule le trafic de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein), le précurseur de la protéine bêta amyloïde. APP lie la partie C-terminale (motif d'internalisation) de la sortiline, ce qui entraîne sa dégradation par la voie lysosomale (Yang et al., 2013). Ce mécanisme régule donc la distribution et la quantité d'APP dans la cellule et permet d'éviter l'accumulation pathologique de la protéine bêta amyloïde.

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui entraîne des déficits moteurs et qui est causée par une mort progressive des neurones dopaminergiques situés dans la substance noire (Simon et al., 2020). L'origine de cette pathologie est due à la formation d'aggrégats toxiques de la protéine alpha-synucléine dans l'environnement extracellulaire (Simon et al., 2020). Alors que la formation du complexe sortiline/p75NTR est associée à la mort neuronale (Nykjaer et al., 2004), ces deux protéines sont surexprimées dans des souris transgéniques qui expriment une forme autosomique dominante et pathologique de alpha-synucléine (Szegő et al., 2013). En revanche, lors du développement de la maladie

de Parkinson, l'expression neuronale de la sortiline prévient le mauvais repliement des protéines causé par la surrégulation du facteur d'initiation de la transcription EIF4G1 (Dhungel et al., 2015). Bien qu'opposées, ces données nous indiquent que la sortiline est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires qui régissent le devenir positif ou négatif de la cellule en fonction de la protéine à laquelle elle se lie et du contexte physiologique.

La dépression est un trouble de l'humeur qui est souvent caractérisé par une altération de l'homéostasie sérotoninergique dans le SNC (Jans et al., 2007). De manière intéressante, la délétion du gène de la sortiline (*Sort1*^{-/-}) chez la souris entraîne un phénotype résistant à la dépression (Heurteaux et al., 2006; Mazella et al., 2018; Moreno et al., 2018). En effet, l'absence de la sortiline induit une diminution du canal TREK-1 à la membrane plasmique des neurones, ce qui modifie l'excitabilité cellulaire et dépolarise la membrane plasmique de ces cellules (Moreno et al., 2018). Egalement, la délétion de la sortiline augmente l'activité des neurones du raphé dorsal (DRN), ce qui indique une efficacité accélérée de la neurotransmission (Moreno et al., 2018). L'augmentation de l'activité des neurones du DRN est associée à la libération de sérotonine (5-HT), qui représente le neurotransmetteur le plus abondant de ces structures (Michelsen et al., 2008; Teissier et al., 2015). Cela peut alors expliquer ce phénotype de résistance à la dépression observé chez les animaux *Sort1*^{-/-}. De manière similaire, la délétion du gène TREK-1 (*Kcnk2*^{-/-}) chez des souris entraîne une résistance à la dépression (Heurteaux et al., 2006). Les rôles biologiques et physiologiques du canal TREK-1 sont détaillés dans le chapitre suivant.

Une plus grande concentration de la forme soluble de sortiline dans le sang de patients en dépression sévère par rapport à des personnes saines a été mise en évidence (Buttenschøn et al., 2015). Le rôle de la sortiline soluble dans la dépression pourrait être associé à un dérèglement de l'équilibre pro-neurotrophine et neurotrophine (BDNF et pro BDNF) (Buttenschøn et al., 2015). En faveur de ce modèle, on observe une augmentation de proBDNF chez les patients en dépression sévère (Zhou et al., 2013).

Les pathologies métaboliques

L'athérosclérose est une maladie artérielle chronique qui se caractérise par des dépôts de lipides (plaques d'athéromes) sur la paroi interne des vaisseaux sanguins (Glass and Witztum, 2001). Ces plaques réduisent, voire bloquent complètement le flux sanguin, ce qui peut entraîner des problèmes cardiaques ou des AVC selon la zone touchée. La formation de ces dépôts lipidiques résulte d'un taux plasmatique élevé de cholestérol LDL (Low Density Lipoprotein) et de triglycérides, ainsi que d'une baisse du cholestérol HDL (High Density Lipoprotein). De nombreuses études associent la présence de la sortiline avec une baisse des niveaux plasmatiques de LDL, ce qui diminue le risque d'incidents cardiovasculaires (Conlon, 2019; Musunuru et al., 2010). Néanmoins, le rôle de la sortiline dans le métabolisme lipidique reste encore très controversé. En effet, l'inactivation spécifique dans le foie de souris du gène codant pour la sortiline (*Sort1*), augmente les taux plasmatiques de LDL chez ces animaux (Musunuru et al., 2010). Cet effet serait dû à une augmentation de la sécrétion de l'apolipoprotéine B (apoB100) qui est un constituant essentiel des vésicules de LDL et est capable d'interagir avec la sortiline (Musunuru et al., 2010). Les auteurs suggèrent que la liaison de la sortiline à l'apoB100 dans l'appareil de Golgi, favoriserait la dégradation lysosomale de l'apoB100 et donc des vésicules de LDL (Musunuru et al., 2010).

Ces résultats sont cependant en contradiction avec des données qui montrent que l'inactivation de *Sort1* dans les hépatocytes de souris améliore le profil lipidique d'animaux nourris avec une alimentation de type occidental (riche en graisses saturées) puisque ces souris *Sort1*^{-/-} présentent des concentrations plasmatiques de cholestérol et de LDL plus faibles que les souris contrôles (Chen et al., 2019). La sortiline favoriserait l'absorption de LDL par les macrophages et serait donc responsable de leur transformation en cellules spumeuses (gonflées de LDL oxydés) dans des conditions d'hyperlipidémie (Patel et al., 2015). Alors que physiologiquement, les macrophages récupèrent les LDL circulants et les dégradent par voie lysosomiale (Moore et al., 2013), sous forme spumeuse ils peuvent s'accumuler dans l'espace sous-endothélial des vaisseaux sanguins et progressivement les obstruer. Ainsi, la délétion de la sortiline chez des souris prévient le développement de l'athérosclérose induite par une alimentation riche en graisses saturées (Patel et al., 2015). Bien qu'ici la sortiline semble délétère, ces données nous montrent surtout que les mécanismes qui apparaissent

bénéfiques dans des conditions physiologiques, peuvent s'emballer, se déréguler et être associés à des processus pathologiques.

Outre son rôle dans la régulation des lipides, des études ont montré une diminution de l'expression de la sortiline dans des tissus insulino-sensibles de souris et d'humains obèses et diabétiques (Kaddai et al., 2009; Li et al., 2015). L'environnement inflammatoire observé en condition d'obésité et de diabète joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la sortiline. En effet, la cytokine diabéto-gène TNF-alpha diminue l'expression de la sortiline (ARNm et protéine) dans des lignées cellulaires adypocytaires et dans des tissus adipeux et musculaires de souris et d'humains (biopsies) (Hivelin et al., 2017; Kaddai et al., 2009). Dans ce sens, une étude récente menée chez l'homme révèle qu'une diminution des taux circulants de sortiline est associée à des profils métaboliques défavorables chez les sujets atteints de diabète de type 2 (Demir et al., 2020). En revanche, une autre étude a montré que des patients diabétiques présentaient des taux plasmatiques de sortiline supérieurs à des individus non-diabétiques (Oh et al., 2017). Le rôle de la sortiline dans la pathologie du diabète est donc complexe et mérite d'être plus amplement étudié. Il se pourrait notamment que son expression soit différente en fonction du tissu étudié, mais aussi du stade ou du degré de sévérité de la pathologie.

B) Le canal TREK-1, un partenaire essentiel de la sortiline

1. Généralités sur TREK-1

Les canaux TREK-1 (TWIK-related potassium channel 1) appartiennent à la grande famille des K2P (canaux à deux domaines pores). Ces canaux potassiques de fond participent au maintien du potentiel de repos et permettent aux cellules de répondre efficacement à un potentiel d'action (Kim and Kang, 2015). Afin d'être fonctionnels, les K2P doivent dimériser. Chaque monomère est constitué de quatre segments transmembranaires (M1, M2, M3 et M4), ainsi que d'extrémités N-term et C-term cytoplasmiques (Figure 22). La particularité de ces canaux provient de leurs deux domaines à deux pores (P1 et P2). En effet, une fois le canal dimérisé, les deux domaines pores de chaque monomère forment une structure qui agit comme un filtre qui ne laisse passer que les ions K⁺ (Djillani et al., 2019).

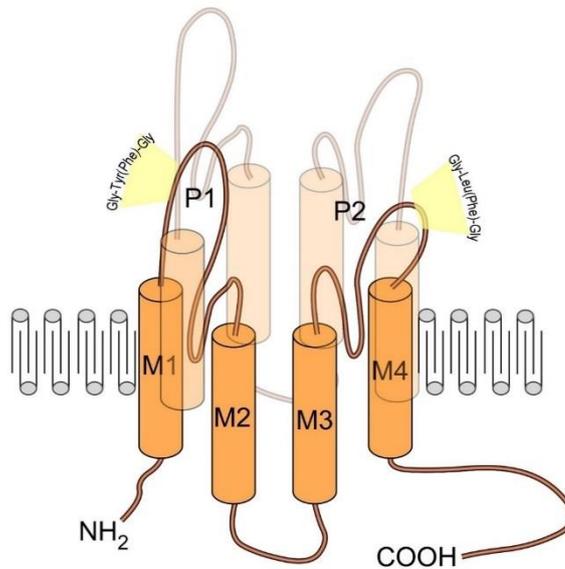


Figure 22 : Schéma de la structure commune à TREK-1 et aux autres canaux K2P.

Les K2P s'assemblent en dimères. Chaque monomère est composé de 4 segments transmembranaires (M1-M4), de domaines à 2 pores (P1 et P2) ainsi que de deux extrémités N-term et C-term cytoplasmiques. Chaque pore possède une signature unique dans sa séquence, Gly-Tyr(Phe)-Gly pour P1 et Gly-Leu(Phe)-Gly pour P2. D'après (Djillani et al., 2019).

Bien que majoritairement exprimé dans le cerveau, TREK-1 est également présent dans la périphérie, dans des organes comme l'estomac, le muscle squelettique, la prostate, le rein ou encore le pancréas (Medhurst et al., 2001). Partageant 28% d'homologie de séquence avec le canal TWIK-1, TREK-1 a été cloné pour la première fois dans le cerveau de souris (Fink et al., 1996).

2. La régulation de TREK-1

L'ouverture ou la fermeture du canal TREK-1 est régulé par de nombreux stimuli physiques et chimiques. En effet, des expériences de patch-clamp ont démontré que l'étirement de la membrane induit, de manière réversible, l'ouverture du canal TREK-1 (Maingret et al., 1999; Patel et al., 1998). Cette ouverture réversible du canal TREK-1 a également été observée lorsque le pH intracellulaire s'acidifie (Maingret et al., 1999), que la température augmente progressivement (Maingret et al., 2000a) ou encore en présence de phospholipides ou de lipides polyinsaturés (acide arachidonique, l'acide docosahexaénoïque, l'acide alpha-linolénique) (Blondeau et al., 2007; Lauritzen, 2000; Maingret et al., 2000b; Patel et al., 1998). TREK-1 est également modulé physiologiquement par des stimuli intracellulaires. Par exemple, la protéine kinase G (PKG), activée par l'oxyde nitrique, phosphoryle la sérine 351 de la partie C-Terminale (cytoplasmique) de TREK-1, ce qui active le canal, c'est-à-dire

l'ouvre (Koh et al., 2001; Murbartián et al., 2005). La PKA et la PKC activées par des récepteurs couplés aux protéines G, inhibent l'activité de TREK-1 en phosphorylant sa sérine 333 (PKA) et sa sérine 300 (PKA et PKC) (Murbartián et al., 2005; Patel et al., 1998). Le canal TREK est également capable de dimériser avec d'autres K2P, ce qui peut moduler son activité. Par exemple, il a récemment été montré qu'une forme tronquée du canal TRESK, un K2P fréquemment associé à la migraine, s'hétérodimérise avec TREK-1 et TREK-2 et provoque leur fermeture (Djillani et al., 2019; Royal et al., 2019). Ces différentes propriétés procurent au canal TREK un rôle physiopathologique important notamment dans l'épilepsie, l'AVC, la douleur, la dépression et l'homéostasie du glucose, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle intéressante (Alloui et al., 2006; Djillani et al., 2019; Heurteaux et al., 2004, 2006; Hivelin et al., 2016).

3. Les outils pharmacologiques de TREK-1

Parmi les différents outils pharmacologiques capables de moduler l'activité du canal TREK-1 on retrouve les activateurs (ouvrent le canal) et les inhibiteurs (ferment le canal). Ces molécules conduisent respectivement soit à une hyperpolarisation, soit à une dépolarisation de la membrane plasmique. Cependant, le mode d'action sur TREK-1 de la plupart des drogues citées ci-dessous n'est pas connu. De plus, la majorité de ces molécules ne sont pas sélectifs de TREK-1 et peuvent donc moduler l'activité du canal de façon directe ou indirecte, en agissant sur la fluidité membranaire, le cytosquelette, ou encore en activant des canaux ou des protéines kinases. Il est important de noter que l'étude récente d'un cristal de TREK-1 en présence de deux activateurs (ML335 et ML402) a révélé un domaine de liaison situé au sein du filtre de sélectivité du canal (Lolicato et al., 2017). Ce domaine pourrait ainsi constituer un site de liaison à d'autres molécules.

Les activateurs des canaux TREK-1 : Parmi ces agents pharmacologiques, on retrouve des anesthésiques volatils tels que le chloroforme, l'halothane, l'isoflurane ou l'éther diéthylique (Patel et al., 1999). Les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique, l'acide docosahexaénoïque et l'acide linoléique activent également TREK-1 et sont associés à des mécanismes neuroprotecteurs (Blondeau et al., 2007; Lauritzen, 2000). Il a récemment été montré que des stabilisateurs de l'humeur couramment utilisés pour le traitement des

troubles bipolaires tels que le chlorure de lithium, la gabapentine, le valproate et la carbamazépine, activent le canal TREK-1 et peuvent en plus, pour certains (LiCl et la carbamazépine), augmenter l'expression du canal (Kim et al., 2017). Des anti-inflammatoires non-stéroïdiens de la famille des fénamates (acide niflumique, acide flufénamique et acide méfénamique) activent TREK, mais de façon moins importante que le BL-1249, une molécule dérivée du tétrazole et qui présente une structure similaire au fénamates (Tertyshnikova et al., 2005; Veale et al., 2014). Enfin, l'acide caféique ainsi que ML67, ML335 et ML402 (molécules issues d'un ciblage de plus de 106000 molécules) ont été identifiés comme des activateurs de TREK-1 (Djillani et al., 2019). Le riluzole est une molécule neuroprotectrice aux propriétés anticonvulsives, sédatives et anti-ischémiques (Duprat et al., 2000). Il est décrit comme un modulateur de TREK-1 car il entraîne une activation transitoire de TREK-1 (~30 secondes) suivie d'une puissante inhibition du canal après 90 secondes de traitement (Duprat et al., 2000). Les auteurs de cet article attribuent cet effet inhibiteur à l'activation de la PKA (Duprat et al., 2000; Patel et al., 1998).

Les inhibiteurs de TREK-1 : Parmi eux, on retrouve des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) prescrits en cas de dépression tels que la fluoxétine (Prozac), la paroxétine, le citalopram et l'escitalopram, mais également des antipsychotiques comme le chlorpromazine et le loxapine (Djillani et al., 2019; Kennard et al., 2005). D'autres molécules initialement décrites comme des antagonistes des canaux calciques comme l'amlodipine et le nifedipine (analogues des 1,4-dihydropyridines) peuvent inhiber les courants TREK-1 (Busquet et al., 2010). De plus, le SID1900 (effet antidépresseur sur des rats) mais aussi le 3-n-butylphthalide (NBP) et son analogue, le lig-4-4, ont été identifiés comme des inhibiteurs des canaux TREK-1 (Djillani et al., 2019). Enfin, le propeptide (PE) issu de la maturation de la sortiline ainsi que ses dérivés synthétiques la Spadine et la Mini-Spadine, sont des inhibiteurs sélectifs des canaux TREK-1 (Djillani et al., 2017; Mazella et al., 2010). Il est également important de noter qu'en plus d'être les seules molécules connues sélectives de TREK-1, la Spadine et la Mini-Spadine possèdent de fortes affinités pour le canal (IC_{50}) de l'ordre du nanomolaire (~40-60 nM et ~0,12 nM respectivement), contre du micromolaire pour toutes les autres drogues citées ci-dessus (Fluoxétine ~19 μ M, Citalopram ~100 μ M, ...) (Kennard et al., 2005; Kim et al., 2017). Les propriétés physiques et biologiques du PE et de ses analogues seront détaillées dans la partie IV-C-3 et 4.

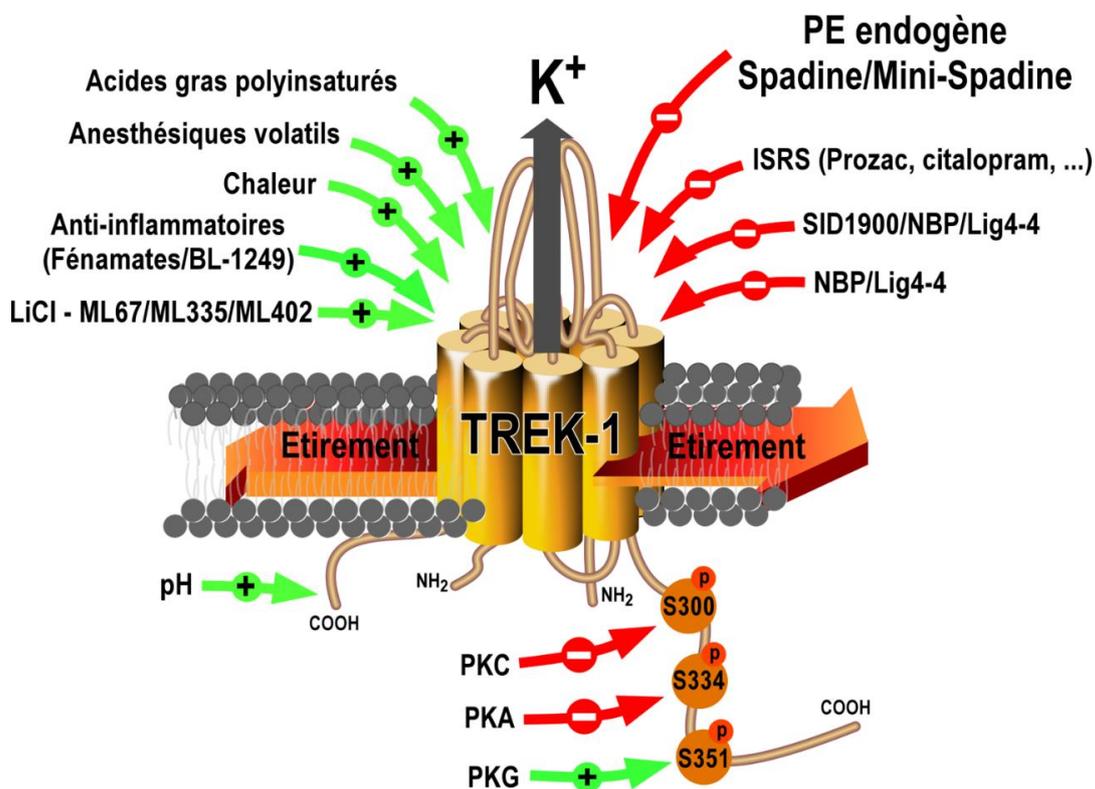


Figure 23 : Les régulations physiologiques et pharmacologiques de TREK-1.

L'activité du canal TREK-1 est régulée par de nombreux stimuli physiologiques et molécules pharmacologiques. Les flèches vertes correspondent aux activateurs de TREK-1 et les flèches rouges correspondent aux inhibiteurs de TREK-1. Modifié à partir de (Heurteaux et al., 2011).

4. Les rôles physiologiques et pathologiques de TREK-1

Depuis sa découverte, de nombreuses études ont démontré le rôle majeur de TREK-1 dans certains mécanismes physiologiques et ont associé sa dysfonction ou son absence à différentes pathologies, à la fois au niveau central et périphérique.

TREK-1 dans le système nerveux central (SNC)

Une étude réalisée en 2004 a révélé l'implication de TREK-1 dans la neuroprotection contre l'épilepsie, ainsi que dans l'ischémie du cerveau et de la moelle épinière, sur un modèle de souris dont le gène *Kcnk2* codant pour TREK-1, a été inactivé (Heurteaux et al., 2004). Ainsi, les souris TREK-1 KO sont plus vulnérables que les souris sauvages au déclenchement de crise d'épilepsie et elles présentent une plus grande sensibilité à l'ischémie (cérébrale et de la

moelle épinière), avec un taux de survie post-ischémie beaucoup plus faible que pour les souris sauvages (Heurteaux et al., 2004). Cette étude révèle aussi que les souris TREK-1 KO sont résistantes à l'anesthésie induite par des anesthésiques volatils tels que le chloroforme et l'halothane (Heurteaux et al., 2004; Patel et al., 1999).

TREK-1 joue également un rôle dans la perception de la douleur. En effet, les souris TREK-1 KO ont une hypersensibilité aux stimuli thermiques, ainsi qu'une hyperalgésie thermique et mécanique dans des conditions qui miment l'inflammation (Alloui et al., 2006).

Comme mentionné précédemment, cette lignée de souris est aussi résistante à la dépression et leur comportement est similaire à celui de souris traitées avec des antidépresseurs classiques comme la fluoxétine (Heurteaux et al., 2006). Enfin, la délétion de TREK-1 montre une augmentation de la libération de sérotonine par les neurones du noyau raphé dorsal et une augmentation de la neurogénèse induite par un traitement chronique aux antidépresseurs (Heurteaux et al., 2006). Ces résultats ont été renforcés par la découverte quelques années plus tard de la Spadine (dérivé synthétique du propeptide de la sortiline), un inhibiteur spécifique du canal TREK-1 (Mazella et al., 2010). En effet, le traitement de souris à l'aide de la Spadine montre un effet antidépresseur dès 4 jours de traitement qui est comparable à celui présenté par des souris TREK-1 KO (Mazella et al., 2010). La Spadine est donc considérée comme le premier peptide antidépresseur d'origine endogène à action rapide (Mazella et al., 2010). Les propriétés biologiques de la Spadine seront détaillées dans la partie suivante.

TREK-1 dans la périphérie

Dans le cœur, TREK-1 est exprimé chez la souris et le rat, dans les ventricules et les oreillettes (Liu and Saint, 2004; Wiedmann et al., 2021). Chez l'homme, des échantillons obtenus à partir de patients ayant subi une opération à cœur ouvert, révèlent des niveaux importants d'ARNm de TREK-1 dans le tissu ventriculaire (Wiedmann et al., 2021). Une étude menée sur des souris a montré que la délétion spécifique de TREK-1 dans des cardiomyocytes entraîne un problème cardiaque en réponse à un stress. En effet, l'exercice physique provoque chez ces souris une bradycardie sinusale accompagnée de fréquents épisodes de pauses sinusales (Unudurthi et al., 2016). Au niveau électrique, les cardiomyocytes TREK-1 KO

présentent une baisse des courants potassiques de fond en comparaison aux cellules saines, ainsi qu'un potentiel de membrane diastolique maximal anormalement dépolarisé (Unudurthi et al., 2016; Wiedmann et al., 2021). Cependant, les souris TREK-1 KO non-stimulées par l'exercice physique, ne présentent pas de modification intrinsèque de la fréquence cardiaque (Unudurthi et al., 2016). De manière intéressante, une mutation ponctuelle hétérozygote de TREK-1 a été identifiée chez un patient atteint d'un trouble ventriculaire RVOT (Right Ventricular Outflow Tract) et cette mutation procure au canal une hypersensibilité à l'étirement ainsi qu'une plus grande perméabilité aux ions sodiques (Decher et al., 2017).

De nombreux canaux K₂P sont exprimés dans d'autres organes de la périphérie comme le pancréas endocrine et en particulier dans la cellule bêta sécrétrice d'insuline (Dadi et al., 2014b; Hivelin et al., 2016; Kang et al., 2004; Mazella et al., 2010; Vierra et al., 2015). Ces canaux jouent un rôle majeur dans le couplage potentiel de membrane-sécrétion d'insuline, suggérant des fonctions essentielles dans le contrôle de la glycémie. Ainsi, de plus en plus d'études s'intéressent à la possible implication de ces canaux dans le développement du diabète. Par exemple, il a été montré sur des cellules bêta primaires de souris que la délétion ou l'inhibition du canal TASK-1 augmente significativement la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, ce qui améliore la tolérance au glucose (Dadi et al., 2014b). Une autre étude démontre que la délétion du gène codant pour le canal TALK-1 sur des souris entraîne une dépolarisation de la membrane des cellules bêta, une augmentation de l'influx de Ca²⁺ dans les îlots et une augmentation de la seconde phase de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Vierra et al., 2015). Ainsi, les souris TALK-1 KO sont résistantes à l'élévation de la glycémie à jeun induite par un régime riche en graisses (Vierra et al., 2015). En ce qui concerne les canaux TREK-1, le laboratoire a récemment montré sur des lignées cellulaires bêta pancréatiques (MIN6) et sur des îlots pancréatiques de souris que l'inhibition spécifique de TREK-1 par la Spadine, dépolarise la membrane de la cellule (~12mV) et augmente la libération d'insuline en présence de concentration stimulante de glucose (Hivelin et al., 2016). De plus, des souris traitées avec la Spadine présentent une meilleure tolérance au glucose que des souris contrôles, ainsi qu'une sécrétion accrue d'insuline induite par le glucose (Hivelin et al., 2016). Ces travaux révèlent d'une part et pour la première fois, le rôle important du canal TREK-1 dans l'homéostasie du glucose, mais soulignent d'autre part le caractère innovant de l'approche pharmacologique utilisée.

La partie suivante de ce manuscrit s'intéresse tout particulièrement aux propriétés biologiques et pharmacologiques de cette nouvelle classe de peptides, qui tient son origine de la maturation de la sortiline.

C) Le propeptide ou PE endogène

1. Le PE, un produit de maturation de la sortiline

La sortiline est produite sous une forme immature, la pro-sortiline, qui est ensuite clivée par la furine dans les compartiments tardifs du Golgi via sa liaison à la séquence consensus RWRR (Mazella et al., 1998). Ce clivage permet d'une part de rendre la sortiline mature fonctionnelle et conduit d'autre part à la libération d'un peptide de 44 acides aminés appelé propeptide (Figure 24) (Petersen, 1999). Le PE lie la sortiline avec une grande affinité ($K_d \sim 20\text{nM}$) de manière dépendante du pH, ce qui empêche la fixation de RAP et de la neurotensine (Petersen, 1999). Ce mécanisme de compétition évite également une fixation prématurée des différents ligands sur la sortiline, prévenant ainsi une activation précoce de certaines voies de signalisation (Petersen, 1999; Westergaard et al., 2004). Des dosages sériques du PE ont révélé une concentration de 10nM chez la souris (Mazella et al., 2010) et d'environ 18-20nM chez l'homme (Devader et al., 2017; Roulot et al., 2018).

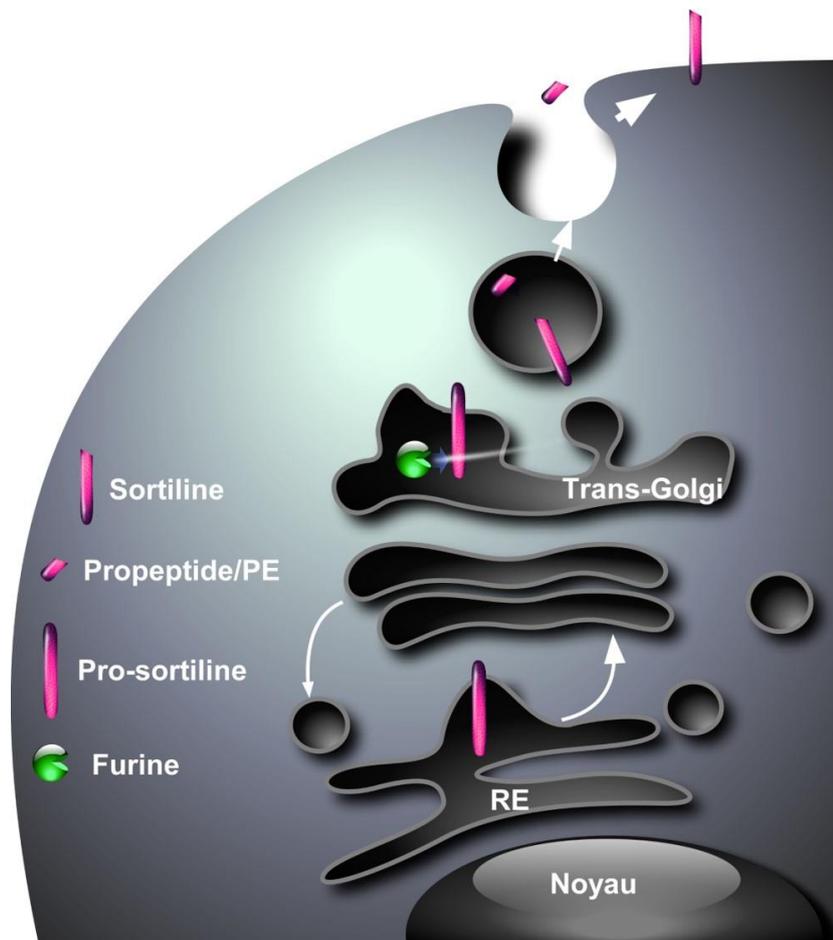


Figure 24 : La production du propeptide de la sortiline.

La sortiline est produite sous une forme immature et non-fonctionnelle, la pro-sortiline. Dans le compartiment tardif du Golgi (trans-Golgi) la furine, qui est une protéase à sérine, se fixe à la pro-sortiline et la clive au niveau de la séquence consensus RWRR. Ce processus de maturation permet de rendre la sortiline fonctionnelle et libère un peptide de 44 acides aminés, le propeptide (PE), dans le milieu extracellulaire lors de la fusion des vésicules avec la membrane plasmique. Modifié d'après (Mazella et al., 2018).

2. Pharmacologie du PE et de ses dérivés synthétiques

L'implication de TREK-1 dans de nombreuses pathologies suscite un effort de recherche soutenu dans le développement de drogues pouvant moduler les courants générés par ce canal (Djillani et al., 2019). Après avoir découvert que la délétion du canal TREK-1 induit un phénotype résistant à la dépression chez des souris (Heurteaux et al., 2006), les équipes du Dr Mazella et du Dr Heurteaux ont cherché à savoir si la sortiline/NTSR3 pouvait avoir un rôle dans l'adressage de TREK-1 à la membrane et donc potentiellement dans la dépression. Dans une étude publiée en 2010, les deux équipes montrent que la sortiline et TREK-1

interagissent et colocalisent dans des neurones corticaux de souris (Mazella et al., 2010). De plus, le PE inhibe les courants TREK-1 en présence d'acide arachidonique (Figure 25) (Mazella et al., 2010).

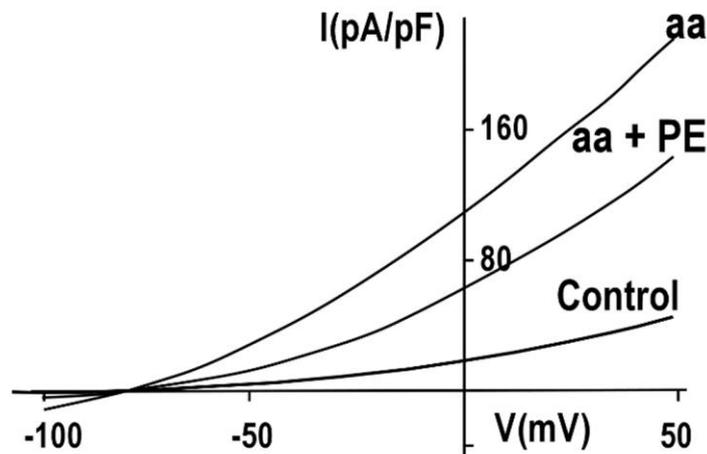


Figure 25 : Effet du propeptide (PE) sur l'activité de TREK-1.

Le graphe représente les courbes I/V des courants TREK-1. Les mesures de courant sur cellules entières sont réalisées sur des cellules COS-7 surexprimant TREK-1, en présence de bloqueurs de canaux potassiques. Les courants ont été enregistrés après activation de TREK-1 par 10 μ M d'acide arachidonique (aa) et d'aa + propeptide (PE, 500 nM) (Mazella et al., 2010).

La caractérisation structure-fonction du PE a permis le développement d'un analogue appelé Spadine (Mazella et al., 2010). La Spadine est composée de la séquence de fixation du PE endogène (17-28) dans laquelle s'ajoute la séquence 12-16 (APLRP) qui permet de maintenir la contrainte conformationnelle du peptide (Figure 26) (Mazella et al., 2010). Tout comme le PE endogène, la Spadine est capable de lier et d'inhiber le canal TREK-1 avec une affinité d'environ 10 nM (Mazella et al., 2010). De manière intéressante, les autres canaux K2P (TREK-2, TRAAK, TASK et TRESK) ainsi que les canaux potassiques hERG, impliqués dans la fonction cardiaque, sont tous insensibles à la Spadine (Moha Ou Maati et al., 2012). Alors que la Spadine est un puissant antidépresseur à action rapide, ses effets biologiques s'estompent *in vivo* après 7 heures (Mazella et al., 2010). Ainsi, dans un objectif thérapeutique, des analogues et dérivés de la Spadine ont été synthétisés pour améliorer leur stabilité *in vivo* (Djillani et al., 2017; Veysiere et al., 2015). L'étude des produits de dégradation de la Spadine dans la circulation sanguine a permis d'identifier un peptide court de 7 acides aminés correspondant à la séquence 22-28 du PE (Djillani et al., 2017). Avec un IC_{50} d'environ 0,12

nM, ce peptide appelé Mini-Spadine possède une affinité pour TREK-1 environ 300 fois supérieure à la Spadine (IC₅₀ ~40-60 nM) (Djillani et al., 2017). La Mini-Spadine est stable *in vivo* pendant environ 23 heures (vs 7 heures pour la Spadine) et comme la Spadine, elle est spécifique des canaux TREK-1 (Djillani et al., 2017; Moha Ou Maati et al., 2012). La Spadine et la Mini-Spadine possèdent donc des propriétés pharmacologiques très intéressantes et constituent également de formidables outils pour étudier les propriétés biologiques du PE endogène.

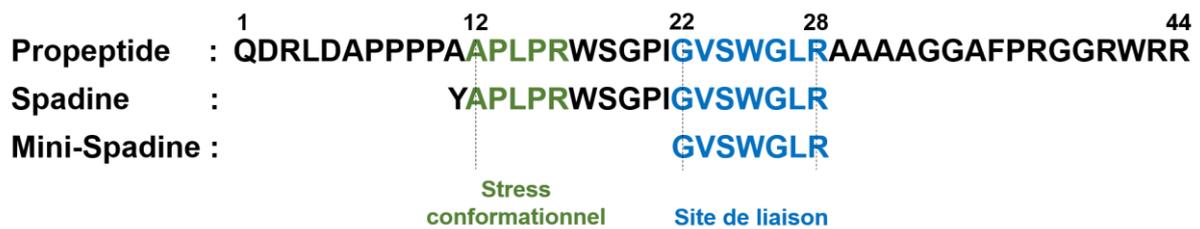


Figure 26 : Les séquences peptidiques du propeptide, de la Spadine et de la Mini-Spadine. Comparatif des séquences peptidiques du propeptide et de ses deux dérivés synthétiques, la Spadine et la Mini-Spadine. En vert : la séquence permettant le maintien conformationnel de la protéine. En bleu : la séquence de liaison au canal TREK-1 qui permet son inhibition. Modifié d'après (Djillani et al., 2017).

D) Les propriétés bénéfiques du PE et de ses dérivés

1. Les effets au niveau central

Grâce à l'utilisation de la Spadine, les équipes du Dr Mazella et du Dr Heurteaux ont montré les propriétés antidépressives du PE (Mazella et al., 2010). Il s'agit du premier effet pharmacologique décrit du PE endogène. Dans cette étude, les souris traitées de manière aiguë, subchronique et chronique par la Spadine, présentent le même comportement résistant à la dépression que les souris TREK-1 KO (Heurteaux et al., 2006; Mazella et al., 2010). Aussi, les effets de la Spadine sont comparables à ceux de la fluoxétine (Prozac) et apparaissent après seulement 4 jours de traitement, contre habituellement 3-4 semaines pour les antidépresseurs ISRS (Mazella et al., 2010).

La caractérisation de la Mini-Spadine a montré qu'elle présente les mêmes propriétés antidépressives comportementales que la Spadine dans un modèle de dépression identique (TREK-1 KO) et dans un modèle de dépression post ischémie cérébrale (AVC) (Djillani et al.,

2017; Pietri et al., 2019). De plus, la Spadine augmente d'un facteur 2 les décharges électriques des neurones sérotoninergiques en comparaison aux souris non-traitées et ce, de manière comparable à ce qui a été observé dans le modèle de souris TREK-1 KO (Heurteaux et al., 2006; Mazella et al., 2010). La Spadine favorise l'expression de la neurotrophine de survie BDNF dans l'hippocampe et le cortex préfrontal de souris. Aussi, Spadine et Mini-Spadine stimulent la genèse de nouveaux neurones (neurogenèse) via des mécanismes prolifératifs. De façon concomitante, cela augmente l'expression de PSD-95 et de la synapsine, qui sont des protéines impliquées dans la structure et la fonction synaptique (Devader et al., 2015; Djillani et al., 2017; Mazella et al., 2010; Pietri et al., 2019).

En comparaison à des souris non-traitées, l'utilisation de Mini-Spadine sur des souris ayant subies une ischémie cérébrale prévient la perte de poids post-ischémie, améliore les déficits moteurs et cognitifs et protège les neurones dopaminergiques de la mort induite par l'ischémie (Pietri et al., 2019). Les effets neuroprotecteurs de la Spadine et de son analogue s'expliquent notamment par les voies de signalisation activées par le traitement. En effet, l'application de Spadine sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris, dépolarise la membrane plasmique d'environ 12mV et active la voie proliférative ERK et la voie de survie Akt (Devader et al., 2015). La Spadine active le facteur de transcription CREB dans des neurones hippocampiques (Mazella et al., 2010). CREB est un facteur de transcription essentiel dans la plasticité et la survie neuronale et dont la dérégulation est associée à de nombreuses pathologies comme la dépression, Alzheimer, Parkinson ou encore Huntington (Sakamoto et al., 2011).

Il a récemment été montré que des patients qui souffrent d'un trouble dépressif majeur possédaient un taux sérique de PE plus faible que celui de personnes non-dépressives (~18nM vs ~24nM) (Devader et al., 2017). Cependant, chez les patients qui répondent au traitement par des antidépresseurs, le taux sérique normal de PE est rétabli (Devader et al., 2017; Mazella et al., 2018). Concernant les patients dépressifs qui ne répondent pas aux antidépresseurs, le traitement par électroconvulsion entraîne une forte augmentation de la concentration de PE dans le sang, mais là encore, seulement chez les patients répondant à cette thérapie (Roulot et al., 2018). Ces données indiquent donc que le PE pourrait servir de marqueur biologique de l'état dépressif et aussi d'indicateur de rémission de la pathologie (Mazella et al., 2018).

2. Les effets sur la périphérie

Bien que la majorité des études ait été réalisée au niveau du système nerveux central, de plus en plus d'articles révèlent un rôle physiologique bénéfique du PE dans la périphérie. En effet, la découverte de taux d'expression de la sortiline anormalement élevés dans certaines pathologies comme le cancer ou les troubles cardiovasculaires, a orienté certaines recherches vers l'étude du trafic de la sortiline vers les vésicules extracellulaires (VE). Ces structures sont impliquées dans la communication cellule-cellule et permettent d'éliminer des déchets cellulaires (protéines, lipides ou ARNs) (Itoh et al., 2018; van Niel et al., 2018). La sortiline est capable d'homodimériser, par la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre les résidus cystéine 783, ce qui provoque l'adressage de ce complexe vers les VE (Itoh et al., 2018). L'homodimère de sortiline entraîne avec lui la phosphatase alcaline non-spécifique des tissus (PANT) ce qui favorise la calcification vasculaire. En effet, si cette protéine a de nombreux rôles physiologiques, dont celui de la clairance des microbes au niveau du tractus digestif, l'augmentation de sa présence dans le sang est associée à une inflammation accrue et à une augmentation de la calcification vasculaire pouvant conduire à l'athérosclérose (Brichacek and Brown, 2019). La formation d'homodimères de sortiline favorise donc par ce biais, la calcification vasculaire (Goettsch et al., 2016; Itoh et al., 2018).

De manière intéressante, le PE inhibe l'homodimérisation de la sortiline (Itoh et al., 2018). Cela montre que le propeptide endogène peut réguler la fonction de la sortiline en empêchant la formation d'un complexe pathogène, ce qui peut constituer une approche thérapeutique intéressante dans le traitement de pathologies associées aux VE (Itoh et al., 2018).

La présence de TREK-1 et de la sortiline dans les cellules bêta pancréatiques a soulevé le rôle possible du PE dans l'homéostasie glucidique (Hivelin et al., 2016; Mazella et al., 2010). Ainsi, des expériences menées sur la lignée de cellules bêta pancréatiques MIN6-B1 ont montré que l'inhibition de TREK-1 par 10nM de Spadine dépolarise la membrane plasmique de ~12 mV et augmente la concentration intracellulaire de calcium de manière indépendante de la PKA (Hivelin et al., 2016). De plus, la Spadine (100nM) potentialise la sécrétion d'insuline déclenchée par le glucose (16,7mM) ou le KCl (30mM) dans des îlots pancréatiques de souris et dans des MIN6-B1, grâce à la dépolarisation membranaire et à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Hivelin et al., 2016). Il est à noter que sans

sécrétagogue, la Spadine n'a pas d'effet sur la libération d'insuline (Hivelin et al., 2016). Les expériences IPGTT (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test) *in vivo* montrent également que le traitement par la Spadine améliore la tolérance au glucose des souris et que cet effet corrèle avec une augmentation significative de la concentration d'insuline plasmatique (Hivelin et al., 2016). Ces données révèlent pour la première fois l'effet incrétine de la Spadine et suggèrent que le PE endogène serait un acteur important de l'homéostasie glucidique. Elles placent également la Spadine comme un agent thérapeutique potentiel original pour le traitement du diabète de type 2.

Le but principal de ma thèse est de compléter ces données et d'identifier le rôle du PE endogène et de ses dérivés dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique.

LES OBJECTIFS DE LA THESE

Lorsque j'ai rejoint le laboratoire des Drs Catherine Heurteaux et Jean Mazella en 2018, l'équipe venait de démontrer l'effet incrétine *in vitro* et *in vivo* de l'analogue du PE endogène, la Spadine (Hivelin et al., 2016). Ces résultats ont permis de renforcer l'hypothèse de départ du laboratoire selon laquelle le PE endogène jouerait un rôle important dans l'homéostasie glucidique (Mazella et al., 2012) et ils placent également les canaux potassiques TREK-1 comme des régulateurs de la sécrétion d'insuline et la Spadine comme un antidiabétique potentiel innovant.

La diminution de la masse cellulaire bêta pancréatique fonctionnelle est un paramètre clé du déclenchement et de l'évolution du diabète de type 2. Ainsi, l'objectif principal de mon doctorat a été de poursuivre la caractérisation du rôle du PE endogène dans l'homéostasie glucidique et d'évaluer le potentiel pharmacologique de ses deux analogues synthétiques (Spadine et Mini-Spadine) sur la survie des cellules bêta pancréatiques. Pour cela, nous avons utilisé une lignée de cellules bêta pancréatiques de rat, les INS-1E.

Ce projet de thèse consiste premièrement à étudier l'effet biologique du PE et de ses dérivés sur la survie cellulaire. Pour cela nous avons évalué le potentiel protecteur des peptides en présence de deux inducteurs de l'apoptose aux fenêtres d'actions bien distinctes, la staurosporine (stress aigu) et l'IL-1 β (stress chronique).

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués en analysant les voies de signalisation activées, ainsi qu'en étudiant l'effet du PE et de ses dérivés sur le facteur de transcription CREB, dont l'activité est associée à des effets bénéfiques sur la survie et la fonction cellulaire.

RESULTATS ET DISCUSSION

Projet : Rôle du propeptide de la sortiline et de ses dérivés, dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique

A) Contexte de l'étude

Dans un monde où la prévalence du diabète ne cesse d'augmenter, il devient urgent d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques innovantes. Les précédents travaux du laboratoire ont révélé les propriétés antidépressives du propeptide endogène et ont identifié la Spadine et la Mini-Spadine comme des peptides neuroprotecteurs, favorisant la sécrétion de sérotonine, la prolifération et la survie neuronale, via l'inhibition spécifique du canal TREK-1 (Devader et al., 2015; Djillani et al., 2017; Mazella et al., 2010; Pietri et al., 2019). En plus de ces effets bénéfiques au niveau central, l'identification de TREK-1 dans la cellule bêta pancréatique a soulevé la question du possible rôle du PE sur l'homéostasie glucidique (Mazella et al., 2010). Ainsi, en 2016, le laboratoire a démontré sur des lignées bêta endocrines et des îlots pancréatiques de souris qu'en réponse au glucose seulement, l'inhibition de TREK-1 par la Spadine dépolarise suffisamment la membrane plasmique pour entraîner une augmentation de la concentration cytosolique de calcium et potentialise la libération d'insuline (Hivelin et al., 2016). De plus, l'administration de Spadine à des souris 20 minutes avant une injection de glucose a permis d'améliorer leur tolérance au glucose (Hivelin et al., 2016). Cet effet incrétine n'est pas sans rappeler celui de l'exendine-4, un agoniste des récepteurs au GLP-1 qui fait partie des traitements de référence utilisés en clinique pour le traitement du diabète de type 2. Alors que les effets de l'exendine-4 sont médiés par un récepteur aux protéines G, le mécanisme d'action du PE et de ses dérivés semble passer par une voie atypique et originale, où le potentiel de membrane et le calcium occupent un rôle central. En plus de la propriété de potentialisateur, l'exendine-4 favorise la prolifération et protège la cellule bêta pancréatique de l'apoptose via des voies de signalisation dépendantes de la PKA (Ferdaoussi et al., 2008; Jhala et al., 2003; Song et al., 2008). Le maintien d'une masse pancréatique fonctionnelle est l'approche thérapeutique optimale dans le traitement du diabète de type 2. Fort de ce constat et par analogie aux effets protecteurs du PE et de ses

dérivés observés sur le neurone, nous avons émis l'hypothèse que ces molécules pourraient avoir aussi un rôle bénéfique dans les mécanismes de survie de la cellule bêta pancréatique.

B) Résultats

Sortilin-derived peptides promote pancreatic beta-cell survival through CREB signaling pathway

Guillaume Daziano^a, Nicolas Blondeau^a, Sophie Béraud-Dufour^a, Amar Abderrahmani^b, Carole Rovère^a, Catherine Heurteaux^a, Jean Mazella^a, Patricia Lebrun^{#, 1, *} and Thierry Coppola^{#, 1, *}

^aUniversité Côte d'Azur, CNRS, IPMC, Sophia Antipolis, F-06560, France

^b Université Lille, CNRS, Centrale Lille, Université Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520-IEMN, F-59000 Lille, France

¹These co-authors share the position of last author.

*Corresponding authors: Thierry Coppola and Patricia Lebrun

CNRS, IPMC, 660 route des Lucioles, Sophia Antipolis,
06560, Valbonne, France.

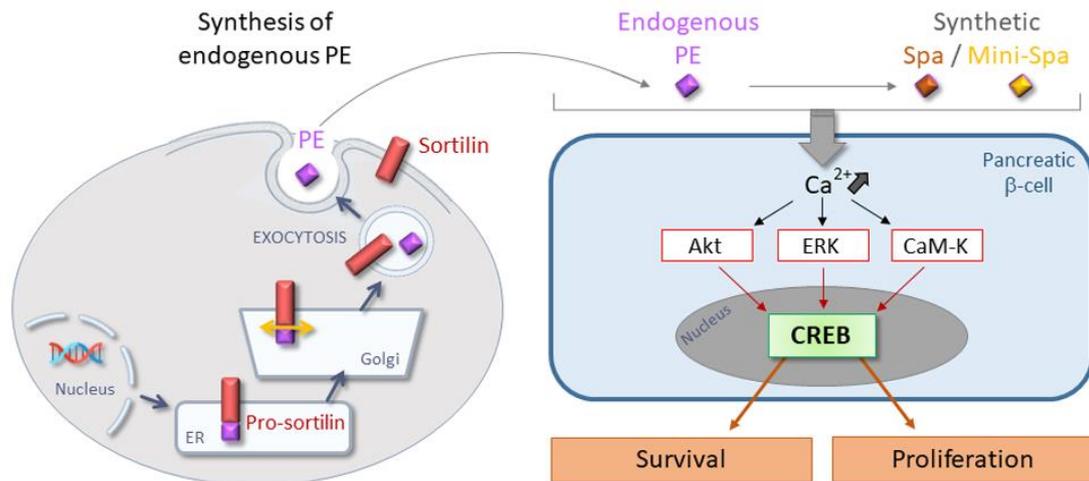
Email addresses : Coppola@ipmc.cnrs.fr and Lebrun@ipmc.cnrs.fr

Pharmacological Research _ Volume 167, May 2021, 105539

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105539>

Published online 15 March 2021

Graphical abstract



Origin of endogenous PE, actions and mimetics. The PE is an endogenous propeptide generated from the maturation of pro-sortilin to sortilin. Its secretion in extracellular compartment endows PE with a physiological role, that is a protective effect on pancreatic beta-cells by increasing calcium content and activating Akt, ERK and CaM-kinases pathways. These effects are reproduced by synthetic PE derivatives named Spadin and Mini-Spadin. All these signaling pathways converge to CREB activation that triggers the beneficial actions of PE and derivatives on beta-cells.

Abbreviations

Adenosine diphosphate (ADP)
Adenosine triphosphate (ATP)
ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP})
B-cell lymphoma 2 (Bcl2)
Beta cell mass (BCM)
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)
 Ca^{2+} /calmodulin kinases (CaMK)
cAMP dependent protein kinase (PKA)
cAMP response element binding protein (CREB)
CREB-responsive elements (CRE)
cyclic AMP (cAMP)
Exendin-4 (Ex-4)
Extracellular signal-regulated kinase (ERK)
Fetal calf serum (FCS)
Insulin receptor substrate 2 (IRS2)
GLP-1 receptor agonist (GLP-1RA)
Glucagon like peptide 1 analogues (GLP-1)
Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)
Horse Radish Peroxidase (HRP)
Neurotensin receptor-3 (NTR3)
Nuclear factor-kappa B (NF- κ B)
Protein kinase A (PKA)
Phosphate buffered saline (PBS)
Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)
Rat Insulinoma-1E cells (INS-1E)
Spadin (Spa)
Sortilin propeptide (PE)
TWIK1-related K^+ channel (TREK-1)

Two-pore domain potassium channel (K2P)

Type 2 diabetes (T2D)

Voltage dependent calcium channel (VDCC)

ABSTRACT

Deterioration of insulin secretion and pancreatic beta-cell mass by inflammatory attacks is one of the main pathophysiological features of type 2 diabetes (T2D). Therefore, preserving beta-cell mass and stimulating insulin secretion only in response to glucose for avoiding the hypoglycemia risks, are the most state-of-the-art option for the treatment of T2D. In this study we tested two correlated hypothesis that 1/ the endogenous peptide released from sortilin, known as PE, that stimulates insulin secretion only in response to glucose, protects beta-cells against death induced by cytokines, and 2/ Spadin and Mini-Spadin, two synthetic peptides derived from PE, that mimic the effects of PE in insulin secretion, also provide beneficial effect on beta-cells survival. We show that PE and its derivatives by inducing a rise of intracellular calcium concentration by depolarizing the membrane protect beta-cells against death induced by Interleukin-1 β . Using biochemical, confocal imaging and cell biology techniques, we reveal that the protective effects of PE and its derivatives rely on the activation of the CaM-Kinase pathway, and on the phosphorylation and activation of the transcription factor CREB. In addition, Mini-Spadin promotes beta-cell proliferation, suggesting its possible regenerative effect. This study highlights new possible roles of PE in pancreatic beta-cell survival and its derivatives as pharmacological tools against diabetes.

KEYWORDS: Beta-cell protection; Calcium influx; CREB activation; Neuropeptide; Sortilin-released propeptide

1. Introduction

Insulin is a hormone produced and released by pancreatic beta-cells to regulate glucose homeostasis. Imbalance of insulin secretion and the tissue needs caused by insulin resistance leads to diabetes, one of the deadliest diseases worldwide. In diabetes, glucose-induced

insulin secretion (GSIS) of beta-cells is impaired. In addition, the loss of insulin secretion is exacerbated by the loss of beta-cell mass (BCM) that is estimated of 30-50% in long-term disease, resulting from increased beta-cell apoptosis and possibly dedifferentiation.

Major mechanisms coupling diabetes development to impaired GSIS and the loss of BCM involve alteration of positive signaling pathways. Among them, CREB by its anti-apoptotic and trophic effects plays a central role in beta-cell survival and growth (1-4) and a decrease in its expression leads to beta-cell dysfunction and death (3). Induction of CREB is a key mechanism from which glucagon-like peptide 1 (GLP-1) exerts its incretin physiological action and therefore its mimetics that are used as antidiabetic drugs, ameliorate beta-cell function and preserves BCM (5, 6). This suggests that endogenous molecules that induce the expression and/or CREB activation support beta-cell function and preserve BCM, and are of potential therapeutic interest against diabetes.

In beta-cells, both insulin secretion and CREB activation are directly dependent on cytosolic calcium concentration and therefore linked to ion channels. The voltage-dependent calcium channels (VDCC), which enable calcium entry into the cell in response to glucose-induced depolarization, stimulate CREB phosphorylation (7). Beside of VDCC, beta-cells also express two-pore domain channel (K2P) TREK-1 (8, 9).

TREK-1, a background K(+) channel that plays a major role in setting the resting membrane potential of many cell types, is inhibited by an endogenous peptide of 44 amino acids (Gln1-Arg44) (10). This sortilin-released peptide (PE) also known as neurotensin receptor-3 (NTR3) propeptide results from the cleavage of the precursor form of NTR3/sortilin by furin (11) and is detectable in the bloodstream advocating for a potential physiological importance (10).

With respect to glucose homeostasis, in insulin-secreting beta cells INS-1E, PE induces a 20% increase of calcium response (12). A synthetic analogue, we have generated to investigate PE physiological, known as Spadin (Spa), that reproduces the inhibitory action of PE on TREK-1 (10), potentiates glucose-induced insulin secretion (8). Therefore, beyond being a useful tool to investigate the physiological role of PE, the development and optimization of Spadin-based peptides may constitute a potential opportunity in search of new antidiabetics acting on the membrane potential of pancreatic beta-cell (13).

Targeting membrane potential of pancreatic beta-cell is already a well-accepted therapeutic strategy for type 2 diabetes, as exemplified by the use of glucagon like peptide 1 analogues (GLP-1) (14, 15). GLP-1 synergizes insulin secretion only in a context of

hyperglycemia (16) by modulation of the membrane potential and its correlated Ca²⁺ signaling pathways (17). Indeed, GLP-1 exerts its effects by binding to a G-protein coupled receptor (GLP-1R) at the surface of the pancreatic beta-cells inducing downstream signaling pathways such as activation of cAMP dependent protein kinase (PKA) that are also known as potent triggers of growth factor cascades and cell survival signal pathways (6). This dual effect on insulin secretion by both ameliorating beta-cell function and BCM preservation makes the GLP-1 mimetics the most advanced antidiabetic drugs on the market.

Interestingly, Spa activates the CREB pathway galvanizing growth factor cascades in brain, thereby leading to increased synaptogenesis and neurogenesis and showing antidepressive effect (10, 18, 19). As a similar activation of the CREB pathway should demonstrate beneficial effect on pancreatic beta-cells, we investigated the role of PE and the therapeutic potential of its derivatives Spa and Mini-Spa in the beta-cell protection against apoptotic cell death by Interleukin-1 β (IL-1 β and staurosporine. Indeed, to propose innovative option, beside Spa, we also tested its new synthesized derivative that has an increased affinity for TREK-1 receptor and a higher stability *in vivo*. This potent derivative is a shortened Spa analog, defined as Mini-Spa (PE-(22-28)), which has a 400-fold higher affinity for TREK-1 than Spa (20).

In this study, we provide the evidence that endogenous PE may play a major protective role on pancreatic beta-cells in triggering the phosphorylation and activation of CREB. Moreover, such beta-cell protection against apoptotic cell death, phosphorylation and activation of CREB were also reproduced by Spa and Mini-Spa. Beyond elucidated a physiological role of PE, our finding may pave the way for the identification of a new class of antidiabetics.

2. Material and methods

2.1. Cell culture, transfection and pharmacological treatments

The insulin-secreting cell line INS-1E (21) was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 UI/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 0.1mM sodium pyruvate and 0.001% β -mercaptoethanol. Transient transfection experiments were performed using the Lipofectamin 3000 transfection Kit (Invitrogen). Ex-4, Staurosporine, IL-1 β , LY294002, H89 PKA inhibitor and CaM-Kinases inhibitor KN93 were purchased from Sigma

Aldrich (St Quentin Fallavier, France). INS-1E were exposed to different peptides at the following concentrations: PE (100 nM), Spadin (Spa, 10 or 100 nM), Mini-Spadin (Mini-Spa, 10 nM), Ex-4 (100 nM) in the presence of IL-1 β (10 ng/mL) during 48h or Staurosporine (1 μ M) during 2h, PI3-kinase pathway inhibitor LY294002 (1 μ M), H89 (1 μ M) and KN93 (1 μ M).

All experiments were performed in triplicate on at least three independent experiments (three different cell passages), in a minimum of 2 plates per plating period. In all experiments, 3-4 wells within each 12-well plate were devoted to vehicle control, in order to minimize inter-plate variability.

2.2. Caspase assay

Caspase 3/7 activity was measured using the Caspase-Glo 3/7 assay system (#G8090) (Promega France). In brief, INS-1E cells were seeded in 96-well plates and incubated with PE (100 nM), Spa (100 nM), Mini-Spa (10nM) or Ex-4 (100nM), in the presence of apoptosis inducers IL-1 β (10 ng/mL, during 48h) or Staurosporine (1 μ M, during 2h). Activity of caspase 3/7 was measured in cell lysate by the production of aminoluciferin and its subsequent consumption by luciferase. This generates a luminescent signal proportional to caspase activity. Experimental procedure was performed following the manufacturer's guidelines. Results are expressed as arbitrary units (AU) of luminescent signal normalized by protein amount (μ g) in each sample.

2.3. CREB transcriptional activity assays

CREB transcriptional activity was measured using the Granuphilin promoter Luciferase construct (Gra-Luc) described in (2). In this construct, the human Granuphilin promoter containing CREB-Responsive Elements (CRE) has been subcloned upstream of the luciferase coding sequence. The plasmid was introduced into beta-cells by transient transfection using the Lipofectamin 3000 transfection Kit (Invitrogen). CREB activity was measured using the Luciferase Assay System (E1500) (Promega France), according to the manufacturer's protocol. CREB activity is proportional to the luminescent signal and results are expressed as % or fold of control condition.

2.4. Measurement of cytosolic calcium

The Fura-2AM loading protocol was previously described (22). Loaded cells were visualized under an inverted epi-fluorescence microscope (AxioObserver, Carl Zeiss, France) using a Fluar 40x/1.3 oil immersion objective. The intracellular Fura-2AM was sequentially excited at 340 and 380 nm with a Xenon arc-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 band-pass filter. Fluorescence images were acquired every 10 seconds on an EMCCD camera (Cascade 512, Roper Scientific, Evry, France). Calcium images were analyzed with MetaMorph, Metafluor software (Universal Imaging). Fura-2AM fluorescence intensity is expressed as change relative to the initial fluorescence ratio (F₃₄₀/F₃₈₀). A minimum of 5 to 7 cells per field has been analysed in a minimum of 3 to 5 experiments for each condition.

2.5. Immunocytochemistry

INS-1E cells seeded on glass coverslips coated with 2 mg/ml poly-L-Lysine were incubated for 24 hours in RPMI 1640 medium supplemented with the indicated concentrations of peptides. The cells were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated for 2h with the first antibody diluted in PBS (rabbit polyclonal Anti-Phospho (Ser133) CREB (1:500) or mouse monoclonal Anti-BrdU (1:7000), BD France), pH 7.5, 0.1% goat serum, 0.3% Triton-X-100 and 20 mg/ml bovine serum albumin (BSA). The coverslips were then incubated for 30 min with the secondary antibody and mounted for confocal microscopy (Zeiss LSM780). The images shown are representative of 3 independent experiments. Characteristics of antibodies used for immunocytochemistry are detailed in Suppl table 1 in Supplementary material section.

2.6. Western blot analysis

Solubilized proteins from beta-cells were loaded at 50 µg in Laemmli sample buffer, separated on 10% SDS PAGE gels and then transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked and incubated with antibodies directed against phosphorylated or total forms of Akt (1:1000) and ERK1/2 (1:1000) (Cell Signaling, Ozyme, France), overnight at 4°C. Afterwards, membranes were incubated 45 min with secondary antibody (adapted for species of first antibody) coupled to Horse Radish Peroxidase (HRP). Protein bands were revealed, and images acquired with FX Fusion (Vilber) and analyzed with the ImageJ software (US NIH, Bethesda,

MD, United States) (Schneider et al., 2012). Original Western Blots can be found as Supplementary material (Suppl S1: INS-1E treated with 100nM PE; Suppl S2: INS-1E treated with 100nM Spadin; Suppl S3: INS-1E treated with 10nM Mini-Spadin). Characteristics of antibodies used for Western Blotting are detailed in Suppl table 1 in Supplementary material section.

2.7. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay

Proliferation of INS-1E cells was assessed using a BrdU incorporation assay. INS-1E cells that were seeded in 12-wells plates at the density of 12×10^4 cells/well onto poly-L Lysine coated coverslips were incubated with or without the different peptides for 24h (Spa 100nM, Mini-Spa 10nM or Ex-4 100nM) and exposed to 10 μ M BrdU for the last 2h. Next, they were fixed with 4% formaldehyde and permeabilized with 1% Triton X100. Proliferative BrdU positive cells were revealed by immunocytochemistry. The number of BrdU positive cells has been normalized per total cell number and results are expressed as fold over control.

3. Results

3.1. PE, Spa and Mini-Spa reduce apoptosis of beta cells submitted to cytotoxic conditions.

To investigate the protective effect of PE and its synthetic analogues Spa and Mini-Spa, the peptides were co-cultured together with the cytotoxic and diabetogenic agent IL-1 β and compared to that of Ex-4 (100 nM) known to protect INS-1E cells against apoptosis induced by IL-1 β (23). Measurement of caspase-3/7 activity indicated that exposure of cells to IL-1 β for 48h strongly enhanced caspase-3/7 activity (125.4 ± 1.1 AU/ μ g protein) as compared to control condition (64.4 ± 6.0 AU/ μ g protein) (Fig. 1A).

Application of PE (100 nM, which was the maximal physiological circulating concentration we have measured) drastically dampens caspase-3/7 activity of INS-1E cells (95.7 ± 5.3 AU/ μ g protein) in response to IL-1 β (125.4 ± 1.1 AU/ μ g protein). This decrease in IL-1 β -induced caspase-3/7 activity was also afforded by its synthetic derivatives Spa (100 nM) and Mini-Spa (10 nM) (respectively 113.7 ± 4.3 and 104.6 ± 4.6 AU/ μ g protein). Moreover, the reduction of IL-1 β -induced caspase-3/7 activity by PE, Spa and Mini-Spa was similar to the one observed in presence of Ex-4 (108.2 ± 6.3 AU/ μ g protein).

As this experimental setting suggested there could be a difference in the intensity of protection by PE and its analogue Spa, we investigated the protective effects of PE, Spa and Mini-Spa in a harsher model of apoptosis caused by Staurosporine (Fig. 1B).

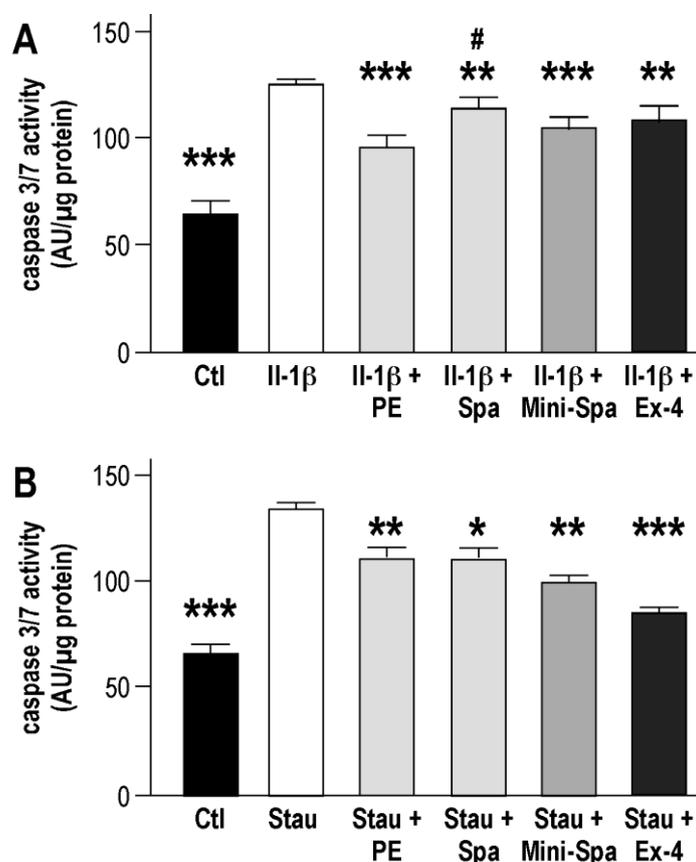


Fig. 1. PE, Spa and Mini-Spa prevent beta cells apoptosis induced by IL-1β and Staurosporine cytotoxic challenges. INS-1E cells were cultured under serum deprivation (Ctl) and treated or not with PE (100 nM), Spa (100 nM), Mini-Spa (10 nM) or Ex-4 (100 nM) in the presence of IL-1β (10 ng/mL) during 48h (A) or Staurosporine (1 μM) during 2h (B). The analysis of caspase-3/7 activity identifies a significant reduction of caspase-3/7 activity, normally induced by IL-1β (A) and staurosporine (B), in presence of PE, Spa or Mini-Spa. Values expressed in arbitrary units are the mean ± SEM of 3 independent experiments (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 different from IL-1β-stimulated condition; #p < 0.01 different from PE condition). Results are expressed as Arbitrary Units (luminescent signal) normalized by the amount of protein (μg).

Incubation of INS-1E cells with Staurosporin for 2h induced a 2-fold increase of caspase-3/7 activity (Ctl: 60.1±8.3 AU/μg prot vs Stau: 137.0±3.5 AU/μg prot) (Fig. 1B). We found that caspase-3/7 activation caused by staurosporine was prevented by PE (115.9±6.6 AU/μg protein) and by both derivatives Spa (117.7±6.9 AU/μg protein) and Mini-Spa (108.4±9.0 AU/μg protein). The reduction of caspase-3/7 activation by Ex-4

(101.3±6.4 AU/μg protein) and the three peptides were similar (Fig. 1B). These data indicated that PE and its derivatives Spa and Mini-Spa protect beta cells from apoptosis induced by different cytotoxic challenges.

3.2. PE, and its derivatives, Spa and Mini-Spa, activate the Akt and ERK survival and proliferative pathways in INS-1E beta cells.

Since ERK1/2 control the phosphorylation and protein level of CREB and play a key role in glucose-mediated pancreatic β-cell survival (24), we first investigated the influence of PE, Spa and Mini-Spa on Phosphatidyl Inositol 3-kinase (PI3K) and MAP kinases pathways by measuring the phosphorylation level of Akt and ERK1/2, respectively. Concerning the PI3-kinase pathway, PE (100 nM), Spa (10 nM) and Mini-Spa (10 nM) exerted a strong activation on both kinases in INS-1E cells (Fig. 2A). The effects of the native peptide PE and its two derivatives (Spa and MiniSpa) on Akt and ERK were different. The PE effect on the phosphorylation of the two kinases was faster than Spa and Mini-Spa. PE induced phosphorylation as early as 5 min after stimulation, whereas PE derivatives showed a maximal Akt and ERK1/2 phosphorylation at 20 min that returned to basal level after 30 min (Fig. 2A). This result suggests that PE and its derivatives Spa and Mini-Spa protect cells *via* activation of the Akt and ERK pathways.

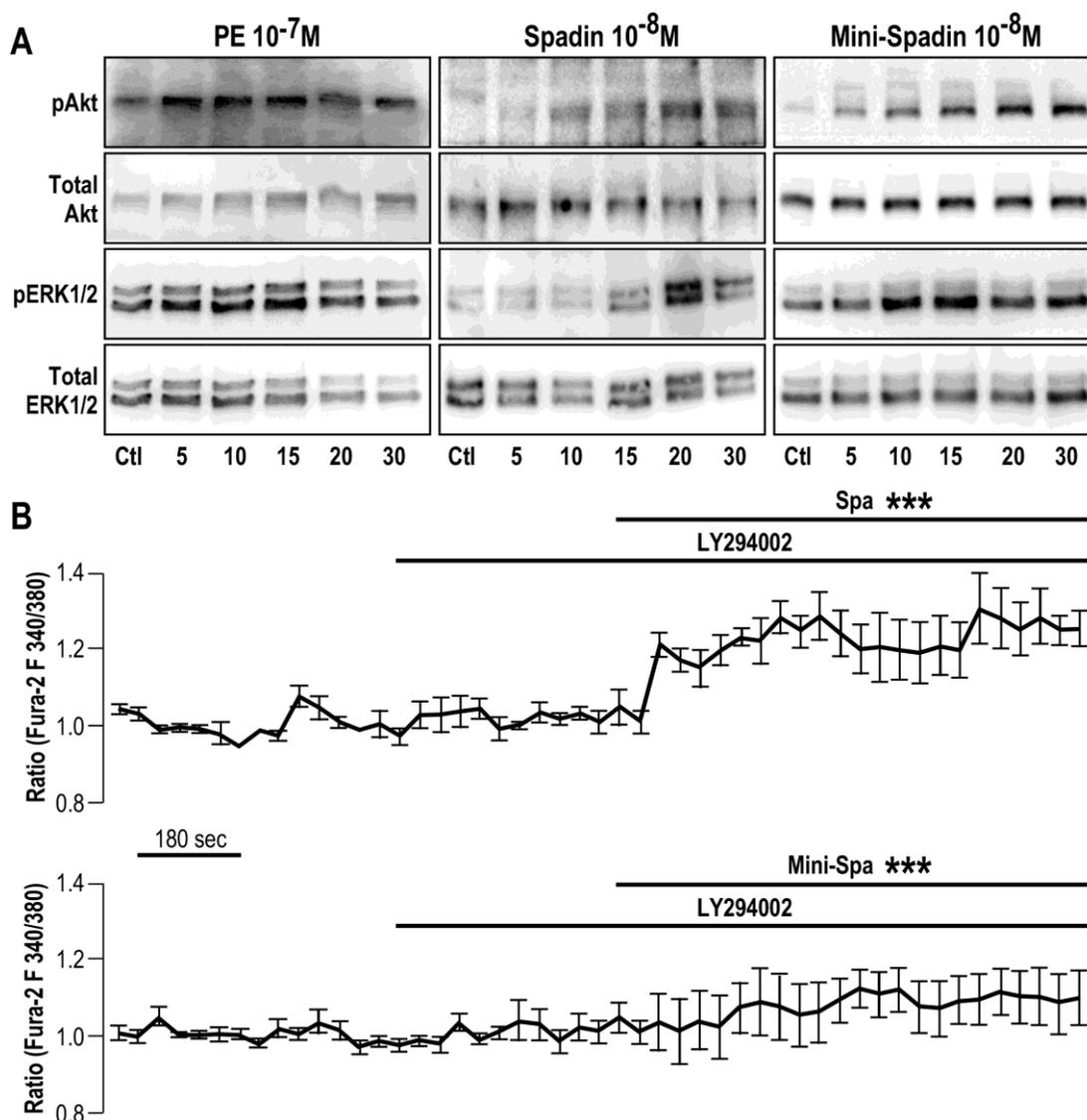


Fig. 2. PE, Spa and Mini-Spa activate ERK and Akt signaling pathways and induce calcium influx in INS-1E cells. (A) Representative Western blots of INS-1E cells stimulated by 100 nM of PE, 10 nM of Spa or Mini-Spa during 5 to 30 min. The Akt and ERK1/2 phosphorylation (pAkt and pERK1/2) was evaluated by immunoblotting and normalized by labelling the same blot with antibodies directed against total Akt or total ERK1/2 (3 distinct experiments). (B) Cytosolic calcium variations were analyzed measuring the Fura-2AM absorbance ratio (340/380) of INS-1E cells in response to the PI3-kinase pathway inhibitor LY294002 (1 μM) and a subsequent exposition to Spa (100 nM) or Mini-Spa (10 nM). (***) $p < 0.001$ compared to LY294002 condition alone.

As PE, Spa- and Mini-Spa induce membrane depolarization and calcium influx (8, 20), we then investigated whether Akt activation by Spa or Mini-Spa accounts for the rise of calcium influx. To do so, intracellular calcium of cells cultured with Spa or Mini-Spa was measured in the presence of the PI3K/Akt inhibitor (LY294002). LY294002 failed preventing

an increase of the intracellular calcium concentration by Spa (100 nM) (1.23 ± 0.01 for Spa+LY vs 1.02 ± 0.01 for LY294002 condition or 1.00 ± 0.01 for basal condition) and Mini-Spa (10 nM) (1.09 ± 0.01 for Mini-Spa+LY vs 1.01 ± 0.01 for LY294002 condition and 1.00 ± 0.01 for basal condition) (Fig. 2B). This result demonstrates that the activation of the PI3K/Akt pathway in response to Spa or its derivative occurs downstream of the Ca^{2+} influx and not the opposite.

3.3 PE and its derivatives prevent stress-induced decrease of phosphorylation level and transcriptional activity of CREB factor.

As CREB is regulated by AKT (25) and ERK1/2 and Akt are directly involved in cell fate modulation (26), we investigated whether PE, Spa or Mini-Spa application could induce activation of CREB, a well-known marker of cell survival (6, 27). To achieve this, we cultured INS-1E cells with Spa or Mini-Spa in a serum-deprived condition, a well-accepted model for inducing stress and subsequent death in INS-1E cells (22, 26). CREB activity was monitored by measuring its transcriptional activity on *SYTL4*, also called Granuphilin. The *SYTL4* gene contains the cAMP responsive elements that bind CREB (1, 28). We therefore investigated whether PE, Spa and Mini-Spa could promote CREB transcriptional activation by following the expression level of luciferase as reporter under the control of the human Granuphilin promoter (Gra-Luc).

Figure 3A shows that PE ($85.00\% \pm 6.59$) prevents the reduction in CREB activity normally induced by the serum deprivation (-FCS: $54.70\% \pm 1.86$), and with a similar intensity than the protection achieved by Ex-4 (-FCS+ Ex-4: $80.61\% \pm 3.50$) used as positive control for its capacity to stimulate CREB activity (29). This protection was also achieved by the PE-derivatives Spa ($64.87\% \pm 1.95$) or Mini-Spa ($79.44\% \pm 3.57$), suggesting that PE benefit may be reproduced by its synthetic derivatives.

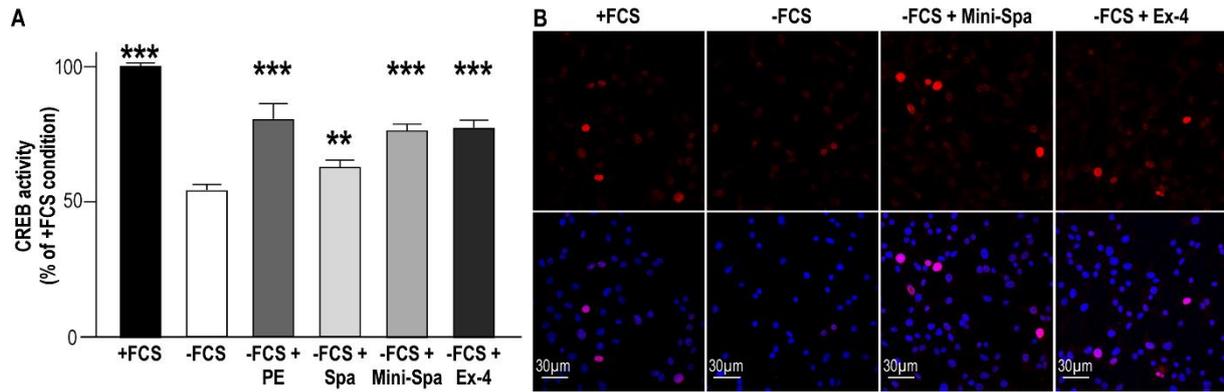


Fig. 3. PE, Spa and Mini-Spa maintain CREB activity in INS-1E challenged by serum-deprivation. (A) INS-1E cells were transiently transfected with the Gra-Luc plasmid, incubated 24h in the presence or absence of serum and treated or not with PE (100 nM), Spa (100 nM), Mini-Spa (10nM), or Ex-4 (100 nM). Results are mean \pm SEM of (at least) 5 independent experiments (17 for +/- SVF and Spa, 11 for Mini-Spa, 13 for Ex-4 and 5 for PE) and values are expressed as % of CREB activity. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to -FCS condition). (B) Immunofluorescent staining was used to evaluate the number of pCREB positive cells (phospho-CREB (Ser133, in red) and Hoescht 33342 (in blue)). The images shown are representative of 3 independent experiments.

Moreover the dose used and amplitude of the CREB activity protection suggest that Mini-Spadin (10nM) effects are improved in comparison with that of Spadin (100nM), in agreement with its better specificity and affinity for TREK-1 channel (20).

As exemplified with Mini-Spa, immunostaining shows that the PE-derivatives induced protection of CREB activity revealed by Luciferase activity of Gra-Luc in correlation with an increased level of phosphorylation on CREB Ser¹³³ (25) (Fig. 3B). Interestingly, an increased number of pCREB-positive cells was observed in presence of Mini-Spa (55%) as compared to the -FCS condition (32% of pCREB positive cells). The increase factors induced by Mini-Spa (1.72) and by Ex-4 (1.84) were comparable. It therefore suggested that PE-derivatives similarly to what has been already demonstrated for GLP-1 and analogues, may protect beta cells by promoting CREB phosphorylation.

3.4. PE, Spa and Mini-Spa induce transcriptional CREB activity through CaM-Kinases pathway

Our previous results suggested that PE, Spa and Mini-Spa triggered beneficial effects on beta cell survival and that CREB phosphorylation induced by Spa and Mini-Spa rely on a Ca^{2+} -dependent signaling pathway. We then went further in the comprehension of the protective mechanism(s) induced by PE and derivatives, investigating their effect on two distinct pathways of CREB activation: the cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA) pathway and the well-known non-canonical pathway activated by calcium, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases (CaM-Kinases) (30-33). INS-1E cells transfected with the Gra-Luc construct were incubated with PE (100nM), Spa (100nM), Mini-Spa (10 nM) or Ex-4 (100 nM), in presence of the PKA inhibitor H89 or the CaM-Kinases inhibitor KN93 to decipher the pathways triggered by PE and its synthetic derivatives. Figure 4A shows that the inhibition of the PKA pathway failed to block the protective effect of PE, Spa and Mini-Spa on CREB activity (PE: 1.25 ± 0.08 , Spa: 1.15 ± 0.03 , Mini-Spa: 1.11 ± 0.02 vs H89: 1.00 ± 0.01 , in fold of CREB activity). However, as expected, inhibition of PKA abolished the sole improvement of CREB activity by Ex-4 (Ex-4: 0.99 ± 0.03 vs H89: 1.00 ± 0.01 , in fold of CREB activity).

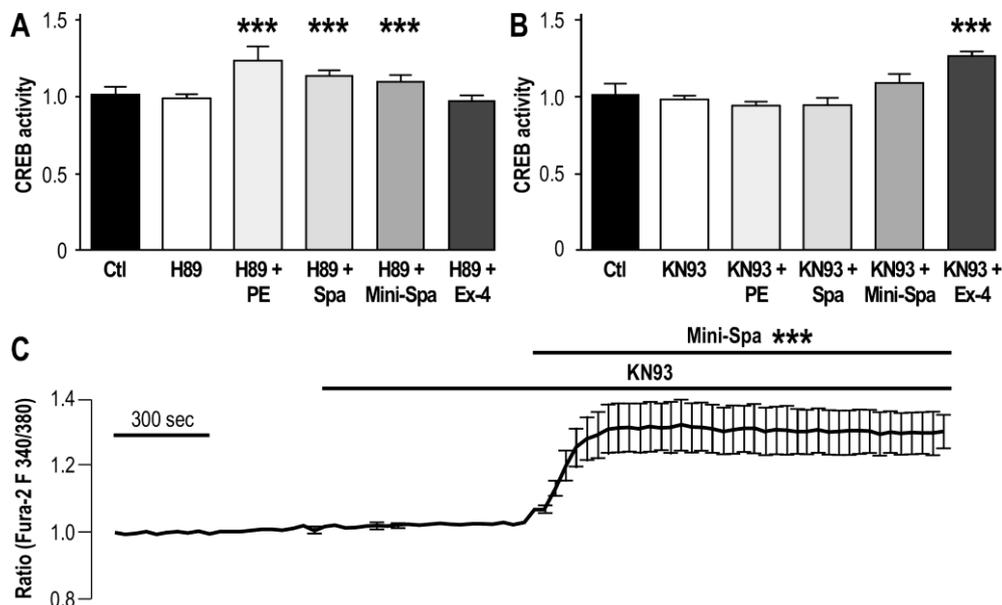


Fig. 4. CaM-Kinases, but not cAMP-dependent PKA pathway mediates the effect of PE, Spa and Mini-Spa on CREB activity. (A) INS-1E cells were transiently transfected with the Gra-Luc plasmid, incubated 24h under serum deprivation in presence of PE (100 nM), Spa (100 nM), Mini-Spa (10 nM) or Ex-4 (100 nM) and exposed to (A) H89 (1 μ M) or (B) KN93 (1 μ M). *** $p < 0.001$ compared to H89 or KN93 condition respectively. Values expressed in fold of basal CREB are mean \pm SEM of all the experiments done (3 to 6 independent experiments) per condition.

*(C) Cytosolic calcium variations were analysed by measuring the Fura-2AM absorbance ratio (340/380) of INS-1E cells in response to the CaM-Kinases inhibitor KN93 and a subsequent exposure to Spa (100 nM) or Mini-Spa (10 nM). *** $p < 0.001$ compared to KN93 condition.*

In contrast, the inhibition of the cAMP-dependent Protein Kinases (CaM-Kinases) pathway by KN93 suppressed the protective stimulation of CREB activity induced by PE, Spa and Mini-Spa (PE: 0.96 ± 0.02 ; Spa: 0.97 ± 0.04 and Mini-Spa: 1.11 ± 0.06 vs KN93: 1.00 ± 0.02 , in fold of CREB activity) without affecting the beneficial effect of Ex-4 (Ex-4: 1.28 ± 0.04 vs KN93: 1.00 ± 0.02 , in fold of CREB activity, Figure 4B).

To further get insight on the correlation between the protective action by Spa and Mini-Spa and the involvement of CaM-Kinases pathway, we investigated whether the protective action of Mini-Spa was the consequence and not the origin of the calcium influx. Figure 4C shows that the presence of the CaMK inhibitor KN93 failed to inhibit the increase of the intracellular calcium concentration induced by Mini-Spa (Mini-Spa+KN93: 1.58 ± 0.02 vs KN93: 1.04 ± 0.01). These results strongly suggest that Mini-Spa protective effects rely on CaMK activation by a mechanism that does not involve PKA, thereby differing from GLP-1 receptor agonists action.

3.5. Mini-Spadin protects from inhibition of INS-1E cells proliferation by serum deprivation.

Akt/CREB pathway also controls an essential feature of beta-cell proper physiology that is cell growth (6). As individuals with type 2 diabetes could benefit from agents that preserve or expand beta cell mass (34), we investigated the potential of both PE synthetic derivatives to prevent inhibited proliferation of serum-starved beta-cells. Using BrdU incorporation experiments in serum starved cells incubated for 24 hours with Spa and Mini-Spa, the results presented in Figure 5A and 5B show that Spa failed to maintain INS-1E cell proliferation under serum deprivation (-FCS) (Spa: 0.26 ± 0.03 vs -FCS: 0.27 ± 0.03 , in fold of +FCS condition). In contrast, Mini-Spa and as expected, Ex-4 (35), had similar protective effects on INS-1E cell proliferation in serum deprived condition (Mini-Spa: 0.46 ± 0.05 and Ex-4: 0.53 ± 0.05 , in fold of +FCS condition).

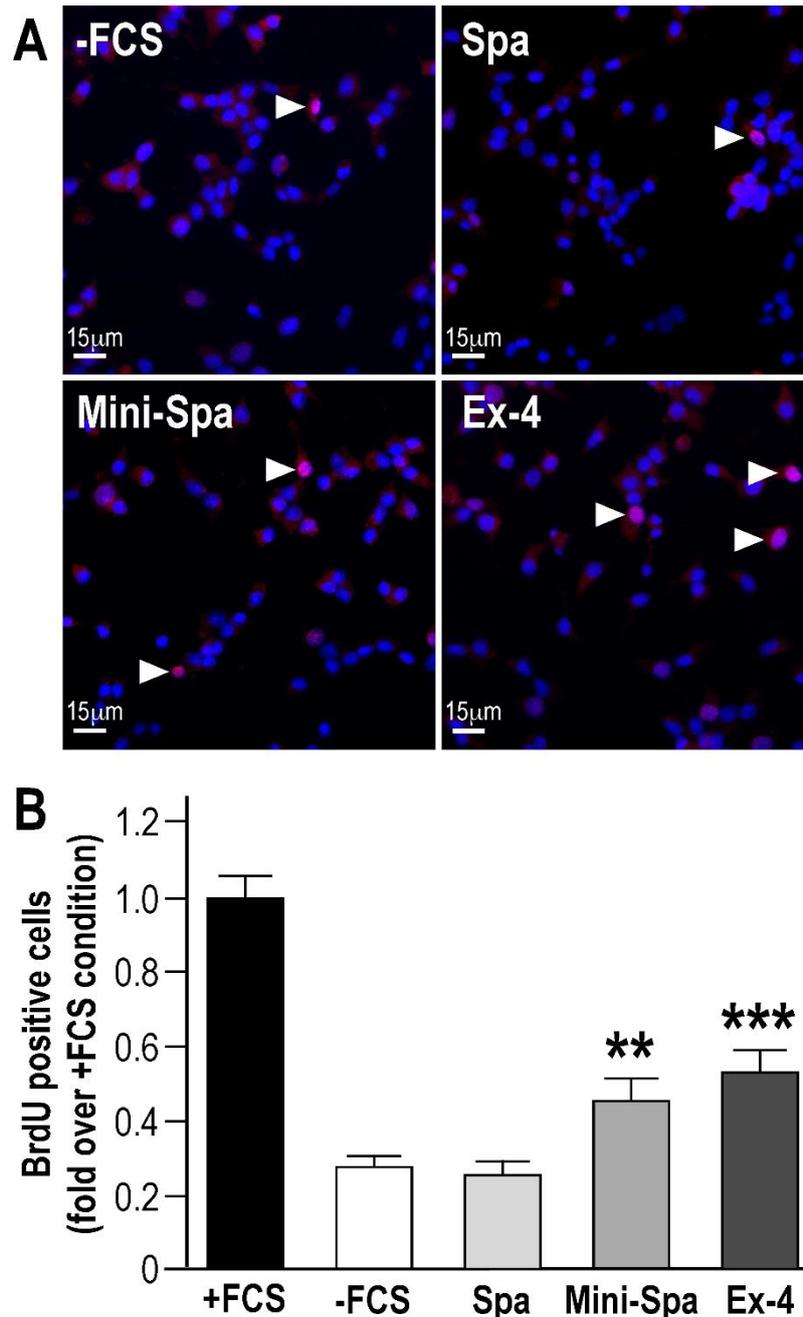


Figure 5. Mini-Spa protects INS-1E cells proliferation from inhibition by serum deprivation. (A) Serum-deprived INS-1E were treated 24h with Spa (100 nM), Mini-Spa (10 nM) or Ex-4 (100 nM). BrdU (10 μ M) was added the last 2 hours of the treatment and nuclei were labeled using Hoescht 33342 (blue). The microscopy images are from a representative experiment out of 3 independent experiments. (B) The quantitation of the BrdU positive cells ratio (red, white arrows) on the total cells (blue) is shown. The values expressed as fold over +FCS condition are the mean \pm SEM of 3 independent experiments (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ different from -FCS condition).

4. Discussion

The PE derivative Spa is now emerging as a promising peptide for the treatment of depression (10). The anti-depressive effect of Spa relies on the modification of the neuron morphology (36) and activation of the CREB pathway (10). Beside of treating depression, Spa may also be insightful for moving forward about the understanding of mechanisms modulating insulin secretion. We previously showed that Spa potentiates glucose-induced insulin secretion in cell and animal models (8). The level of potentiation of insulin secretion by Spa was seen as comparable with the one triggered by GLP-1 receptor agonists, including Exendin-4, which are currently used as antidiabetic drugs (37). As a considerable effort is placed for making Spadin-analogs usable in clinics against depression, gaining evidence for their potential in another clinical application is of high interest. Another important point was to confirm that it was possible to work on the synthetic PE analog to ameliorate its efficiency. Indeed, the shorten formulation of Spadin that present an improved *in vivo* stability and bioavailability, and a reduced manufacturing cost as compared to the lead Spa, Mini-Spa rivals Exendin at a concentration 10 times lower. However, future investigation is required for confirming this hypothesis, which would move forward about the clinical interest of these molecules for diabetes. Herein, we provide the evidence that Spa and its short derivative Mini-Spa protect beta cells against apoptotic death caused by IL-1 β or staurosporine in a mechanism involving the PI3/Akt pathway. Akt and other MAPKs including ERK, PKA and CaMK stimulate the phosphorylation and thereby, the activation of the transcription factor CREB (38). Once activated, CREB is pivotal for regulating the expression of genes required for the secretory function (1). Impairment of the CREB activity as observed in response to a diabetogenic environment such as chronic hyperglycemia, leads to a profound defect in beta-cell function (1, 39). Therefore using an *in vitro* model of chronic exposure of INS-1E cells or rat or human islets to high glucose that also result in a decrease CREB protein expression (3) would have probably been more representative of the physiological condition rather than using a serum deprivation model to reveal the beneficial effect of PE and derivatives on CREB. Nonetheless, our findings indicate that the effect of the PE-derived peptides is a consequence of the increase in intracellular calcium influx able to generate a sufficiently robust intracellular signal for activating CREB via CaMK, but not via PKA. Because, CaMK-II and IV play a crucial role in the beta-cells and neurons function, it is possible that they account for the effects of Spa and Mini-Spa on CREB (40, 41). We also demonstrate that blocking PI3K/Akt or CaMK

pathways does not prevent intracellular calcium increase, while blocking the protective effect of Spa and Mini-Spa. This suggests that the intracellular calcium influx could be the upstream key for inducing CaMK/CREB pathway and finally beta-cell survival induced by Spa and Mini-Spa. Such mechanism has also been raised in neurons (2, 20), indicating a conserved function of the PE derivatives in neuroendocrine cells. As Spa causes beta-cell depolarization, which is a key event that promotes calcium influx in beta cells, it is tempting to speculate a role of the plasma membrane potential in the CREB activation. This idea may also be supported by the effect on the membrane potential of GLP-1 receptor agonist that potently activates CREB (17, 38). By linking small depolarization events induced by PE and its derivatives leading to variations of internal calcium, and CREB pathways, the present work also highlights a parallel between protective pathways already described in neurons and those we now describe in beta-cells. This is in line with the increasing number of studies showing that several anti-hyperglycemic agents play a neuroprotective and anti-inflammatory role by reducing insulin resistance or by directly acting on brain (42). Indeed, most anti-diabetic drugs, when consumed orally or injected, can enter the brain through the blood-brain barrier, which makes them perfect candidates for bidirectional therapy associating diabetes and co-morbidity like vascular or neuronal diseases.

Beyond the importance of the therapeutic aspect of identifying new synthetic peptides with antidiabetic potential, the present work also highlights that circulating level of an endogenous peptide could protect beta cells against apoptotic death caused by IL-1 β that is known to play a key role in the decline of BCM in diabetes. Altogether with PE positive influence on the level of protective signaling pathway in beta pancreatic cells our results suggest the possible contribution of PE in resistance to diabetes. Therefore, it would be interesting to evaluate whether alteration of PE level may be a factor associated with a diabetes diagnosis and whether physiological ways known to prevent or delay the onset of T2D, like healthy diet, regular physical activity influence PE circulating level. Future investigation is required for confirming this hypothesis, which would move forward on the understanding of mechanisms regulating insulin secretion.

5. Conclusion

Endogenous PE generated from sortilin and its derivatives play key roles in triggering insulin secretion by modulating beta-cell membrane potential (8, 36). The present work highlights an original mechanism: small depolarization events link the effects of PE and its derivatives to PI3K/Akt and CREB on pancreatic beta-cells.

As CaMKII/CREB signaling is often associated with several cellular beneficial effects, the activation of the CaMK and CREB pathway by PE and its derivatives Spa and Mini-spa should contribute to their anti-apoptotic and proliferative effect in beta pancreatic cells. Altogether the present study provides novel mechanistic evidence that the PE derivatives may be new promising peptides for improving insulin secretion and for preserving beta-cell mass in T2D.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr. M. Borsotto for his skillful technical support and advices with the electrophysiology of Spa and its derivatives.

Funding

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-SAMA-0002-VASPAC and ANR-13-RPIB-0002 MEDINCOD) and the French Government for the "Investments for the Future" LabEx ICST #ANR-11 LabEx 0015". We also thank the LabEx ICST for its fellowship to G.D.

Authors' contributions

G.D., P.L. and T.C. performed the experiments. G.D., S.B., C.R., N.B., P.L. and T.C. analyzed the data. G.D., N.B., A.A., C.R., C.H., J.M., P.L. and T.C. wrote the paper.

Disclosures/Conflict of interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Abderrahmani A, Cheviet S, Ferdaoussi M, Coppola T, Waeber G, Regazzi R. ICER induced by hyperglycemia represses the expression of genes essential for insulin exocytosis. *EMBO J.* 2006;25(5):977-986.
2. Dalle S, Quoyer J, Varin E, Costes S. Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic beta -cells. *Curr Mol Pharmacol.* 2011;4(3):187-195.
3. Costes S, Vandewalle B, Turrel-Cuzin C, Broca C, Linck N, Bertrand G, Kerr-Conte J, Portha B, Pattou F, Bockaert J, Dalle S. Degradation of cAMP-responsive element-binding protein by the ubiquitin-proteasome pathway contributes to glucotoxicity in beta-cells and human pancreatic islets. *Diabetes.* 2009;58(5):1105-1115.
4. Chepurny OG, Hussain MA, Holz GG. Exendin-4 as a stimulator of rat insulin I gene promoter activity via bZIP/CRE interactions sensitive to serine/threonine protein kinase inhibitor Ro 31-8220. *Endocrinology.* 2002;143(6):2303-2313.
5. Gautier JF, Choukem SP, Girard J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism.* 2008;34:S65-S72.
6. Jhala US, Canettieri G, Srean RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev.* 2003;17(13):1575-1580.
7. Wheeler Damian G, Groth Rachel D, Ma H, Barrett Curtis F, Owen Scott F, Safa P, Tsien Richard W. CaV1 and CaV2 Channels Engage Distinct Modes of Ca²⁺ Signaling to Control CREB-Dependent Gene Expression. *Cell.* 2012;149(5):1112-1124.
8. Hivelin C, Beraud-Dufour S, Devader C, Abderrahmani A, Moreno S, Moha Ou Maati H, Djillani A, Heurteaux C, Borsotto M, Mazella J, Coppola T. Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. *J Diabetes Res.* 2016;2016:3142175.
9. Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(5):F793-801.
10. 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 JL, Heurteaux C, Borsotto M. Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol.* 2010;8(4):e1000355.
11. Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, Moestrup SK, Madsen P. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* 1999;18(3):595-604.

12. Béraud-Dufour S, Abderrahmani A, Noel J, Brau F, Waeber G, Mazella J, Coppola T. Neurotensin is a regulator of insulin secretion in pancreatic beta-cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42(10):1681-1688.
13. Blondeau N, Beraud-Dufour S, Lebrun P, Hivelin C, Coppola T. Sortilin in Glucose Homeostasis: From Accessory Protein to Key Player? *Front Pharmacol*. 2018;9:1561.
14. Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(6):525-536.
15. Seino Y, Min KW, Niemoeller E, Takami A, Investigators EG-LAS. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the once-daily GLP-1 receptor agonist lixisenatide in Asian patients with type 2 diabetes insufficiently controlled on basal insulin with or without a sulfonylurea (GetGoal-L-Asia). *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(10):910-917.
16. Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W. Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *FASEB J*. 1998;12(12):1173-1182.
17. Holz GG, Leech CA, Habener JF. Activation of a cAMP-regulated Ca(2+)-signaling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17749-17757.
18. Devader C, Roulot M, Moreno S, Minelli A, Bortolomasi M, Congiu C, Gennarelli M, Borsotto M, Heurteaux C, Mazella J. Serum sortilin-derived propeptides concentrations are decreased in major depressive disorder patients. *J Affect Disord*. 2017;208:443-447.
19. Roulot M, Minelli A, Bortolomasi M, Maffioletti E, Gennarelli M, Borsotto M, Heurteaux C, Mazella J. Increased serum levels of sortilin-derived propeptide after electroconvulsive therapy in treatment-resistant depressed patients. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:2307-2312.
20. Djillani A, Pietri M, Moreno S, Heurteaux C, Mazella J, Borsotto M. Shortened Spadin Analogs Display Better TREK-1 Inhibition, In Vivo Stability and Antidepressant Activity. *Front Pharmacol*. 2017;8:643.
21. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*. 2004;145(2):667-678.
22. Beraud-Dufour S, Coppola T, Massa F, Mazella J. 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):2398-2402.

23. Ferdaoussi M, Abdelli S, Yang JY, Cornu M, Niederhauser G, Favre D, Widmann C, Regazzi R, Thorens B, Waeber G, Abderrahmani A. Exendin-4 Protects β -Cells From Interleukin-1-Induced Apoptosis by Interfering With the c-Jun NH₂-Terminal Kinase Pathway. *Diabetes*. 2008;57(5):1205-1215.
24. Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockaert J, Dalle S. ERK1/2 Control Phosphorylation and Protein Level of cAMP-Responsive Element-Binding Protein: A Key Role in Glucose-Mediated Pancreatic β -Cell Survival. *Diabetes*. 2006;55(8):2220-2230.
25. Brindle PK, Montminy MR. The CREB family of transcription activators. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(2):199-204.
26. Coppola T, Beraud-Dufour S, Antoine A, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2296-2302.
27. Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(1):139-146.
28. Coppola T, Frantz C, Perret-Menoud V, Gattesco S, Hirling H, Regazzi R. Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. *Mol Biol Cell*. 2002;13(6):1906-1915.
29. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-2157.
30. Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M, Feramisco JR. Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem*. 1993;127-128:179-186.
31. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(8):599-609.
32. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*. 1991;252(5011):1427-1430.
33. Wayman GA, Lee YS, Tokumitsu H, Silva AJ, Soderling TR. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*. 2008;59(6):914-931.
34. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metabolism*. 2018;27(1):57-67.
35. Buteau J. GLP-1 receptor signaling: effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab*. 2008;34 Suppl 2:S73-77.

36. Devader C, Khayachi A, Veysiere J, Moha Ou Maati H, Roulot M, Moreno S, Borsotto M, Martin S, Heurteaux C, Mazella J. In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant spadin. *Br J Pharmacol.* 2015;172(10):2604-2617.
37. Thorens B. Glucagon-like peptide-1 and control of insulin secretion. *Diabete Metab.* 1995;21(5):311-318.
38. Lee YS, Jun HS. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism.* 2014;63(1):9-19.
39. Cho IS, Jung M, Kwon KS, Moon E, Cho JH, Yoon KH, Kim JW, Lee YD, Kim SS, Suh-Kim H. Deregulation of CREB signaling pathway induced by chronic hyperglycemia downregulates NeuroD transcription. *PLoS One.* 2012;7(4):e34860.
40. Bok J, Wang Q, Huang J, Green SH. CaMKII and CaMKIV mediate distinct prosurvival signaling pathways in response to depolarization in neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2007;36(1):13-26.
41. Dadi PK, Vierra NC, Ustione A, Piston DW, Colbran RJ, Jacobson DA. Inhibition of pancreatic beta-cell Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II reduces glucose-stimulated calcium influx and insulin secretion, impairing glucose tolerance. *J Biol Chem.* 2014;289(18):12435-12445.
42. Nath M, Bhattacharjee K, Choudhury Y. Pleiotropic effects of anti-diabetic drugs: A comprehensive review. *European Journal of Pharmacology.* 2020;884:173349.

C) Discussion générale

Les précédents travaux du laboratoire ont permis d'identifier le PE endogène et ses dérivés synthétiques, la Spadine et la Mini-Spadine, comme des inhibiteurs spécifiques du canal TREK-1, présentant un potentiel prometteur pour le traitement de la dépression (Devader et al., 2015; Djillani et al., 2017; Mazella et al., 2010). Au niveau périphérique également, la Spadine a été décrite *in vitro* et *in vivo* comme un peptide incrétine, avec un effet comparable à celui de l'exendine-4, un antidiabétique couramment utilisé en clinique (Hivelin et al., 2016). Mes résultats complètent ainsi la précédente étude du laboratoire et montrent pour la première fois le rôle du PE endogène et de ses dérivés synthétiques sur la survie de la cellule bêta pancréatique. Nous démontrons en effet que l'ensemble de ces molécules protègent les cellules bêta de l'apoptose induite par la présence chronique de l'interleukine IL-1 β (48h), ainsi que par un choc toxique aigu induit par la staurosporine (2h). La protection observée en présence de staurosporine souligne notamment la rapidité d'action et la robustesse de l'effet des peptides. Nous montrons également que le PE endogène et ses dérivés activent les voies de signalisation prolifératives et protectrices ERK et Akt, ainsi que le facteur de transcription CREB via un mécanisme dépendant des calmodulines kinases. CREB est un facteur de transcription essentiel pour la fonction et la survie de la cellule bêta pancréatique et dont le déclin d'activité est associé à l'intolérance au glucose dans le diabète de type 2 (Abderrahmani et al., 2006; Favre et al., 2011). En effet, l'exposition chronique de cellules bêta pancréatiques à des concentrations élevées de glucose favorise la dégradation de CREB par le protéasome (Costes et al., 2009). De plus, cet effet corrèle avec l'apparition du répresseur transcriptionnel ICER (Inducible cAMP Early Repressor), qui est un antagoniste endogène de CREB et dont l'augmentation d'expression corrèle avec une réduction de la masse pancréatique fonctionnelle en condition d'hyperlipidémie et d'hyperglycémie chronique (Mayr and Montminy, 2001; Salvi and Abderrahmani, 2014). Le PE et ses dérivés ayant un effet positif sur CREB, nous nous sommes demandés si ces peptides étaient capables de maintenir l'activité transcriptionnelle de CREB en présence d'ICER. Ainsi, nous avons surexprimé ICER dans des cellules INS-1E et mesuré l'activité de CREB après 24h de traitement avec la Spadine (100nM), la Mini-Spadine (10nM) et l'exendine-4 (100nM) (Figure 27 ; Données non-publiées).

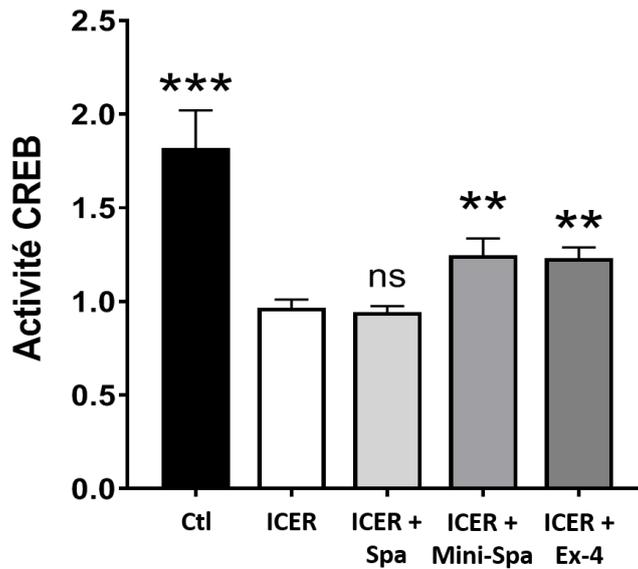


Figure 27 : La Mini-Spadine prévient la baisse d'activité CREB induite par la surexpression d'ICER dans des cellules INS-1E.

*Les cellules INS-1E ont été co-transfectées de manière transitoire avec le plasmide GraLuc et avec un plasmide conduisant à la surexpression d'ICER (1 molécule d'ICER pour 5 molécules de GraLuc). Après transfection, les cellules ont été cultivées pendant 24h sous privation de sérum et traitées ou non avec de la Spadine (100nM), de la Mini-Spadine (10nM) ou de l'exendine-4 (100nM). Les résultats, exprimés en ratio par rapport à la condition ICER en absence de peptides, correspondent à la moyenne ±SEM de 3 expériences indépendantes (ns : non-significatif, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ différent de ICER) (Données non-publiées).*

La figure 27 montre que la Mini-Spadine ($1,24 \pm 0,09$) prévient la diminution de l'activité CREB induite par la surexpression d'ICER ($0,96 \pm 0,04$) d'une manière comparable à l'exendine-4 ($1,23 \pm 0,05$). En revanche, l'application de Spadine ($0,94 \pm 0,03$) n'a aucun effet sur CREB. Cette différence peut s'expliquer par une meilleure affinité de la Mini-Spadine pour TREK-1 (~300 fois supérieure à celle de la Spadine) et donc une plus forte activation de CREB, comme observé dans la figure 3 de l'article. Il est à noter que la déplétion de sérum peut augmenter l'expression endogène d'ICER dans des lignées cellulaires bêta de type MIN6 (Inada et al., 2005). Ainsi, ces données préliminaires soulignent la robustesse de l'effet de la Mini-Spadine dans un modèle expérimental où l'expression de CREB est déjà diminuée par la déplétion de sérum et où, en plus, ICER est surexprimé.

Il est important de noter que certains effets bénéfiques de la Mini-Spadine relevés jusqu'ici sont comparables à ceux de l'exendine-4, mais à des concentrations dix fois plus faibles, ce qui renforce l'idée de son utilisation en tant qu'agent thérapeutique.

Nous pourrions compléter cette expérience en ciblant ICER endogène. En effet, le stress oxydatif, l'hyperglycémie chronique ou encore certains acides gras saturés comme le palmitate, augmentent l'expression endogène d'ICER, ce qui est associé à une perte de la masse cellulaire bêta ainsi qu'à un défaut de sécrétion d'insuline (Abderrahmani et al., 2006; Allagnat et al., 2008; Favre et al., 2011; Inada et al., 2004; Salvi and Abderrahmani, 2014). De fait, il serait intéressant d'évaluer la capacité du PE et de ses dérivés synthétiques à rétablir la balance CREB/ICER, dans des conditions mimant l'environnement pathologique diabétique qui augmentent l'expression endogène d'ICER et non à la suite d'une surexpression.

Le PE semble donc jouer un rôle important dans le maintien d'une masse bêta pancréatique fonctionnelle. Des données préliminaires réalisées au laboratoire montrent que la concentration de PE dans le sang augmente chez des souris obèses et diabétiques. Ainsi, il serait intéressant d'étudier les conséquences métaboliques d'une déplétion de PE par un anticorps chez des souris saines, résistantes à l'insuline (ob/ob) ou diabétiques (db/db), en réalisant des tests de tolérance au glucose (GTT) et à l'insuline (ITT), ainsi qu'en mesurant la glycémie, l'insulinémie ou encore le taux d'acides gras libres circulants.

Les patients insulino-résistants ou avec un diabète de type 2 déclaré présentent un défaut de maturation de pro-insuline en insuline mature, qui se traduit par un ratio sérique de pro-insuline/insuline anormalement élevé (Ferrannini et al., 2007; Mykkänen et al., 1999; Yoshioka et al., 1988; Zethelius et al., 2003). En particulier, les niveaux ARNm de la prohormone convertase (PC) 1/3 (enzyme impliquée dans la maturation de l'insuline) sont plus faibles dans des îlots humains de patients atteints de diabète de type 2, que dans des îlots de personnes saines (Strawbridge et al., 2011). Le même constat a été fait chez la souris, avec une expression de PC1/3 plus faible dans des îlots pancréatiques de souris diabétiques (db/db) que dans des îlots de souris saines (Wang et al., 2014). Ainsi, dans un modèle expérimental similaire, il serait intéressant de savoir si le PE et ses dérivés peuvent agir sur la maturation de l'insuline, en évaluant leur capacité à restaurer des niveaux de PC1/3 (ARNm et protéine) comparables à ceux retrouvés chez des individus sains, mais également en mesurant le ratio pro-insuline/insuline libéré. En faveur de cette hypothèse, le Liraglutide, un analogue du GLP-1, augmente les taux d'ARNm et de protéine de la PC1/3 dans des lignées cellulaires bêta

pancréatiques MIN6 (Wang et al., 2014). Egalement, le gène de la PC1/3 (*Pcsk1*) contient des sites CRE (Espinosa et al., 2008) et CREB3L1 (une isoforme de CREB) a été identifié comme un facteur de transcription du gène *Pcsk1* dans l'hypothalamus et dans les cellules corticotropes (Greenwood et al., 2020). Ainsi, nous pouvons imaginer que le PE et ses dérivés, de part leur action sur CREB, puissent favoriser l'expression de la PC1/3.

D) Conclusion et perspectives

En somme, nous montrons que le PE et ses dérivés sont capables de protéger la cellule bêta pancréatique de manière comparable à l'exendine-4, mais par un mécanisme original indépendant de la PKA. Cela permet d'envisager cette nouvelle classe de peptides protecteurs comme un complément aux approches thérapeutiques antidiabétiques déjà utilisées. Outre leur fort potentiel pharmacologique, la Spadine et la Mini-Spadine peuvent être utilisées comme des outils permettant d'étudier la fonction endogène du propeptide de la sortiline. Cette étude, en complément de la précédente (Hivelin et al., 2016), place le canal TREK-1 et le PE comme des acteurs endogènes impliqués dans l'homéostasie du glucose. Nous montrons ici que le PE initie des mécanismes cellulaires vertueux, où le potentiel de membrane et le calcium occupent un rôle crucial.

Les différentes données obtenues jusqu'ici suggèrent que le PE et ses dérivés pourraient avoir une action préventive ou curative dans le diabète et la dépression, qui sont deux pathologies souvent liées (Bădescu et al., 2016; Devader et al., 2015; Djillani et al., 2017; Hivelin et al., 2016; Mazella et al., 2010; Moha Ou Maati et al., 2012). A l'heure actuelle, nous ignorons quels sont les tissus qui contribuent le plus à la libération de PE et quelles pourraient être les conditions environnementales qui la contrôlent. Il a été décrit qu'un régime de type méditerranéen ainsi que la pratique d'une activité physique constituent une approche thérapeutique bénéfique dans la prise en charge du diabète et de la dépression (Colberg et al., 2016; Helgadóttir et al., 2017; Institut national de la santé et de la recherche médicale, 2019; Pesta et al., 2017; Salas-Salvadó et al., 2014; Sánchez-Villegas et al., 2006). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la capacité d'un régime alimentaire spécifique et/ou de différents types d'exercices physiques à moduler les taux de PE circulant dans des modèles de souris saines,

diabétiques et dépressives, en dosant le PE dans le sang. Cela permettrait d'une part de poursuivre la caractérisation de cette voie endogène et d'autre part, de trouver des conditions permettant de restaurer des concentrations physiologiques de PE dans le sang. Enfin, pour compléter ce point, il serait intéressant d'étudier dans un modèle *in vitro* les mécanismes impliqués dans la libération de PE dans le milieu extracellulaire, afin de déterminer si sa sécrétion est constitutive ou s'il s'agit d'un processus régulé.

Aussi, nous avons vu que la sortiline est une protéine qui possède de multiples ligands (Figure 21) et qui est impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques (cf introduction, parties IV-A-3). Dans certaines conditions pathologiques, l'expression de la sortiline ou de ses partenaires peut être augmentée, ce qui a des conséquences variables en fonction du tissu impliqué. Par exemple, on sait que la liaison des pro-neurotrophines proNGF et proBDNF sur le complexe sortiline-p75NTR induit la mort neuronale (Arnett et al., 2007; Nykjaer et al., 2004; Teng, 2005) et l'expression de certaines de ces protéines est augmentée dans des pathologies telles que Parkinson ou la dépression (Szegő et al., 2013; Zhou et al., 2013). Egalement, le système neurotensinergique a été montré comme étant impliqué dans la progression de nombreux cancers comme le cancer de la prostate, de la peau, du côlon, du pancréas ou encore du poumon (Wu et al., 2013). En particulier, dans bon nombre de ces cancers, l'expression de la sortiline, de la neurotensine et de NTSR1 est anormalement élevée (Wilson et al., 2016; Wu et al., 2013). La liaison de la neurotensine sur le complexe sortiline/NTSR1 déclenche son internalisation et active des voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, l'invasion et la migration cellulaire (Martin et al., 2002; Wu et al., 2013). Cela pourrait jouer un rôle important dans l'agressivité du cancer, en favorisant l'apparition de métastases.

Compte-tenu de ces résultats, il est intéressant d'envisager qu'en plus de son action sur TREK-1, le PE, en tant que ligand endogène de la sortiline, puisse faire compétition avec les pro-neurotrophines et/ou la neurotensine et réverser leurs effets délétères dans ces conditions pathologiques (Figure 28). Cela renforcerait l'idée que le PE agirait comme un frein biologique à une dérive vers un état pathologique. En faveur de cette hypothèse, le PE antagonise l'effet de la neurotensine sur la libération de cytokines et la migration de cellules

microgliales humaines et murines (Dicou et al., 2004; Martin et al., 2003). De plus, cela étendrait le spectre d'action thérapeutique de la Spadine et la Mini-Spadine et permettrait de les envisager comme des candidats potentiels dans ces pathologies.

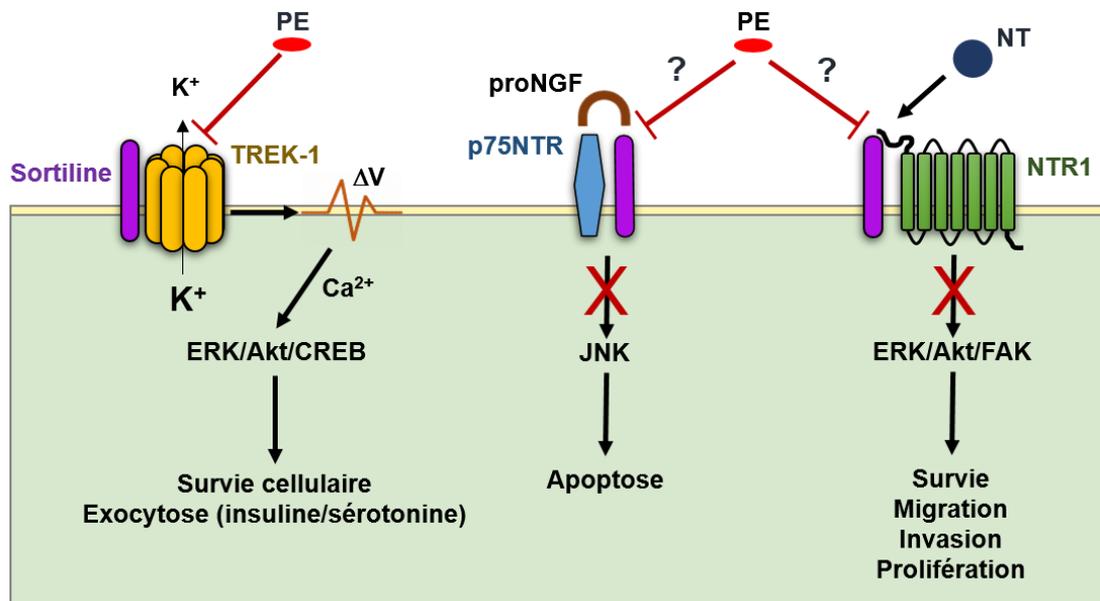


Figure 28 : Représentation schématique des possibles rôles du PE.

En plus d'inhiber les courants du canal TREK-1, le PE, en tant que ligand endogène de la sortiline, pourrait faire compétition avec le proNGF et la neurotensine et bloquer leurs effets intracellulaires (croix rouges). Cela serait notamment bénéfique dans des conditions pathologiques où ces complexes protéiques sont surexprimés et suractivés. PE : Propeptide ; NT : Neurotensine ; ΔV : Dépolarisation de la membrane plasmique ; NTR1 : Récepteur 1 de la neurotensine ; NGF : Nerve Growth Factor ; JNK : c-Jun N-terminal kinases ; FAK : Focal Adhesion Kinase ; ERK : Extracellular signal-regulated kinases.

Ainsi, ces résultats dans leur ensemble montrent que le PE se comporte comme une hormone. Sécrété par de nombreux tissus, il circule dans le sang et initie des mécanismes cellulaires vertueux par une voie atypique et originale, lui conférant un rôle protecteur au niveau central et périphérique. De plus, ses dérivés synthétiques la Spadine et de la Mini-Spadine, ne possèdent pas d'effets secondaires délétères. Ces propriétés en font donc de bons candidats thérapeutiques pour soigner en même temps le diabète et ses comorbidités. Cette approche suscite en effet un grand intérêt de nos jours alors que la plupart des concepts thérapeutiques dans chacune des pathologies ont montré leur limite. Le propeptide endogène PE est lui aussi très intéressant puisqu'il pourrait servir de marqueur biologique de l'état métabolique et serait un bon candidat préventif si l'on parvient à moduler ses niveaux circulants à la demande (jeûne, exercice physique, stress, alimentation, ...).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaboe, K., Akram, S., Deacon, C.F., Holst, J.J., Madsbad, S., and Krarup, T. (2015). Restoration of the insulinotropic effect of glucose-dependent insulinotropic polypeptide contributes to the antidiabetic effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 17, 74–81.
- Abd El Aziz, M., Cahyadi, O., Meier, J.J., Schmidt, W.E., and Nauck, M.A. (2020). Incretin-based glucose-lowering medications and the risk of acute pancreatitis and malignancies: a meta-analysis based on cardiovascular outcomes trials. *Diabetes Obes Metab* 22, 699–704.
- Abderrahmani, A., Cheviet, S., Ferdaoussi, M., Coppola, T., Waeber, G., and Regazzi, R. (2006). ICER induced by hyperglycemia represses the expression of genes essential for insulin exocytosis. *EMBO J.* 25, 977–986.
- Abdulreda, M.H., Caicedo, A., and Berggren, P.-O. (2013). A NATURAL BODY WINDOW TO STUDY HUMAN PANCREATIC ISLET CELL FUNCTION AND SURVIVAL. *CellR4 Repair Replace Regen Reprogram* 1, 111–122.
- Agardh, E., Allebeck, P., Hallqvist, J., Moradi, T., and Sidorchuk, A. (2011). Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 40, 804–818.
- Aguayo-Mazzucato, C., and Bonner-Weir, S. (2018). Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab* 27, 57–67.
- Ahrén, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion - Implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393–410.
- Ahrén, B. (2003). Neuropeptides and Insulin Secretion. In *International Textbook of Diabetes Mellitus*, DeFronzo, Ferraninni, Keen, and Zimmet, eds. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p. d0206.
- Ahrén, B. (2019). DPP-4 Inhibition and the Path to Clinical Proof. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10, 376.
- 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., et al. (2012). Activation of ER stress and mTORC1 suppresses hepatic sortilin-1 levels in obese mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1677–1687.
- Alejandro, E.U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., and Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med* 42, 19–41.
- Allagnat, F., Alonso, F., Martin, D., Abderrahmani, A., Waeber, G., and Haefliger, J.-A. (2008). ICER-1 γ Overexpression Drives Palmitate-mediated Connexin36 Down-regulation in Insulin-secreting Cells. *Journal of Biological Chemistry* 283, 5226–5234.

- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J* 25, 2368–2376.
- Almaça, J., Molina, J., Menegaz, D., Pronin, A.N., Tamayo, A., Slepak, V., Berggren, P.-O., and Caicedo, A. (2016). Human Beta Cells Produce and Release Serotonin to Inhibit Glucagon Secretion from Alpha Cells. *Cell Rep* 17, 3281–3291.
- Altarejos, J.Y., and Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 141–151.
- Amengual, J., Guo, L., Strong, A., Madrigal-Matute, J., Wang, H., Kaushik, S., Brodsky, J.L., Rader, D.J., Cuervo, A.M., and Fisher, E.A. (2018). Autophagy Is Required for Sortilin-Mediated Degradation of Apolipoprotein B100. *Circ Res* 122, 568–582.
- American Diabetes Association (2021). 3. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Dia Care* 44, S34–S39.
- Amisten, S., Salehi, A., Rorsman, P., Jones, P.M., and Persaud, S.J. (2013). An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacology & Therapeutics* 139, 359–391.
- Apicella, M., Campopiano, M.C., Mantuano, M., Mazoni, L., Coppelli, A., and Del Prato, S. (2020). COVID-19 in people with diabetes: understanding the reasons for worse outcomes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8, 782–792.
- Arnett, M.G., Ryals, J.M., and Wright, D.E. (2007). Pro-NGF, sortilin, and p75NTR: potential mediators of injury-induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. *Brain Res* 1183, 32–42.
- Aroda, V.R., and Ratner, R.E. (2018). Metformin and Type 2 Diabetes Prevention. *Diabetes Spectr* 31, 336–342.
- Azoulay, L., and Suissa, S. (2017). Sulfonylureas and the Risks of Cardiovascular Events and Death: A Methodological Meta-Regression Analysis of the Observational Studies. *Dia Care* 40, 706–714.
- Bădescu, S.V., Tătaru, C., Kobylinska, L., Georgescu, E.L., Zahiu, D.M., Zăgrean, A.M., and Zăgrean, L. (2016). The association between Diabetes mellitus and Depression. *J Med Life* 9, 120–125.
- Baeyens, L., Hindi, S., Sorenson, R.L., and German, M.S. (2016). β -Cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab* 18, 63–70.
- Balcazar Morales, N., and Aguilar de Plata, C. (2012). Role of AKT/mTORC1 pathway in pancreatic β -cell proliferation. *Colomb Med (Cali)* 43, 235–243.
- Bansal, P., and Wang, Q. (2008). Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295, E751–E761.

- Barazzoni, R., Gortan Cappellari, G., Ragni, M., and Nisoli, E. (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord* 23, 149–157.
- Barreto, S.G., Carati, C.J., Toouli, J., and Saccone, G.T.P. (2010). The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G10-22.
- Barron, C.C., Bilan, P.J., Tsakiridis, T., and Tsiani, E. (2016). Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* 65, 124–139.
- Batterham, R.L., Le Roux, C.W., Cohen, M.A., Park, A.J., Ellis, S.M., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2003). Pancreatic Polypeptide Reduces Appetite and Food Intake in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 3989–3992.
- Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287, 2570–2581.
- Benninger, R.K.P., Zhang, M., Head, W.S., Satin, L.S., and Piston, D.W. (2008). Gap Junction Coupling and Calcium Waves in the Pancreatic Islet. *Biophysical Journal* 95, 5048–5061.
- Bensellam, M., Jonas, J.-C., and Laybutt, D.R. (2018). Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *Journal of Endocrinology* 236, R109–R143.
- Béraud-Dufour, S., Coppola, T., Massa, F., and 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.
- Béraud-Dufour, S., Abderrahmani, A., Noel, J., Brau, F., Waeber, G., Mazella, J., and Coppola, T. (2010). Neurotensin is a regulator of insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1681–1688.
- Bertram, C., and Hass, R. (2008). Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem* 389, 211–220.
- Betts, J.G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J.E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J., Womble, M.D., Young, K.A., et al. (2013). *Anatomy & physiology*.
- Binder, E.B., Kinkead, B., Owens, M.J., and Nemeroff, C.B. (2001). Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev* 53, 453–486.
- Blondeau, N., Pétrault, O., Manta, S., Giordanengo, V., Gounon, P., Bordet, R., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2007). Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res* 101, 176–184.
- Blondeau, N., Béraud-Dufour, S., Lebrun, P., Hivelin, C., and Coppola, T. (2019). Sortilin in Glucose Homeostasis: From Accessory Protein to Key Player? *Frontiers in Pharmacology* 9.
- Bogan, J.S., and Kandror, K.V. (2010). Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 506–512.

- Böni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D.T., Prazak, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Ehses, J.A., Schuit, F.C., et al. (2009). Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology* *150*, 5218–5229.
- Boucher, J., Kleinridders, A., and Kahn, C.R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *6*, a009191–a009191.
- Bouzakri, K., Plomgaard, P., Berney, T., Donath, M.Y., Pedersen, B.K., and Halban, P.A. (2011). Bimodal effect on pancreatic β -cells of secretory products from normal or insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* *60*, 1111–1121.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., and Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* *179*, 77–79.
- Brereton, M.F., Vergari, E., Zhang, Q., and Clark, A. (2015). Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem* *63*, 575–591.
- Briant, L.J.B., Zhang, Q., Vergari, E., Kellard, J.A., Rodriguez, B., Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (2017). Functional identification of islet cell types by electrophysiological fingerprinting. *J R Soc Interface* *14*.
- Brichacek, A.L., and Brown, C.M. (2019). Alkaline phosphatase: a potential biomarker for stroke and implications for treatment. *Metab Brain Dis* *34*, 3–19.
- Bull, F.C., Al-Ansari, S.S., Biddle, S., Borodulin, K., Buman, M.P., Cardon, G., Carty, C., Chaput, J.-P., Chastin, S., Chou, R., et al. (2020). World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med* *54*, 1451–1462.
- Busquet, P., Khoi Nguyen, N., Schmid, E., Tanimoto, N., Seeliger, M.W., Ben-Yosef, T., Mizuno, F., Akopian, A., Striessnig, J., and Singewald, N. (2010). CaV1.3 L-type Ca²⁺ channels modulate depression-like behaviour in mice independent of deaf phenotype. *Int. J. Neuropsychopharm.* *13*, 499.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* *52*, 102–110.
- Butler, A.E., Cao-Minh, L., Galasso, R., Rizza, R.A., Corradin, A., Cobelli, C., and Butler, P.C. (2010). Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* *53*, 2167–2176.
- Buttenschøn, H.N., Demontis, D., Kaas, M., Elfving, B., Mølgaard, S., Gustafsen, C., Kaerlev, L., Petersen, C.M., Børghlum, A.D., Mors, O., et al. (2015). Increased serum levels of sortilin are associated with depression and correlated with BDNF and VEGF. *Transl Psychiatry* *5*, e677–e677.

- Campbell, J.E., and Drucker, D.J. (2013). Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. *Cell Metabolism* 17, 819–837.
- Campbell, J.E., and Drucker, D.J. (2015). Islet α cells and glucagon—critical regulators of energy homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 11, 329–338.
- Campbell, J.E., and Newgard, C.B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 142–158.
- Campbell, S.A., Golec, D.P., Hubert, M., Johnson, J., Salamon, N., Barr, A., MacDonald, P.E., Philippaert, K., and Light, P.E. (2020). Human islets contain a subpopulation of glucagon-like peptide-1 secreting α cells that is increased in type 2 diabetes. *Molecular Metabolism* 39, 101014.
- Cardone, M.H. (1998). Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation. *Science* 282, 1318–1321.
- Carlo, A.-S. (2013). Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease. *Prion* 7, 378–382.
- Carlo, A.-S., Gustafsen, C., Mastrobuoni, G., Nielsen, M.S., Burgert, T., Hartl, D., Rohe, M., Nykjaer, A., Herz, J., Heeren, J., et al. (2013). The pro-neurotrophin receptor sortilin is a major neuronal apolipoprotein E receptor for catabolism of amyloid- β peptide in the brain. *J Neurosci* 33, 358–370.
- Caro, J.F., Sinha, M.K., Raju, S.M., Ittoop, O., Pories, W.J., Flickinger, E.G., Meelheim, D., and Dohm, G.L. (1987). Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 79, 1330–1337.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248, 6854–6861.
- Cerasi, E., and Ktorza, A. (2007). Plasticité anatomique et fonctionnelle des cellules β du pancréas endocrine et diabète de type 2. *Med Sci (Paris)* 23, 885–894.
- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P., and Caput, D. (1996). Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Letters* 386, 91–94.
- Chapman, E.R., Hanson, P.I., An, S., and Jahn, R. (1995). Ca^{2+} regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 270, 23667–23671.
- Chen, C., Cohrs, C.M., Stertmann, J., Bozsak, R., and Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab* 6, 943–957.
- Chen, C., Li, J., Matye, D.J., Wang, Y., and Li, T. (2019). Hepatocyte sortilin 1 knockout and treatment with a sortilin 1 inhibitor reduced plasma cholesterol in Western diet-fed mice. *Journal of Lipid Research* 60, 539–549.

- Chen, H., Gu, X., Liu, Y., Wang, J., Wirt, S.E., Bottino, R., Schorle, H., Sage, J., and Kim, S.K. (2011). PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic β -cells. *Nature* *478*, 349–355.
- Clineschmidt, B.V., and McGuffin, J.C. (1977). Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *European Journal of Pharmacology* *46*, 395–396.
- Clineschmidt, B.V., McGuffin, J.C., and Bunting, P.B. (1979). Neurotensin: Antinociceptive action in rodents. *European Journal of Pharmacology* *54*, 129–139.
- Clineschmidt, B.V., Martin, G.E., and Veber, D.F. (1982). ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF NEUROTENSIN AND NEUROTENSIN-RELATED PEPTIDES. *Ann NY Acad Sci* *400*, 283–306.
- Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Batterham, R.L., Park, A., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2003). Oxyntomodulin Suppresses Appetite and Reduces Food Intake in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* *88*, 4696–4701.
- Colberg, S.R., Sigal, R.J., Yardley, J.E., Riddell, M.C., Dunstan, D.W., Dempsey, P.C., Horton, E.S., Castorino, K., and Tate, D.F. (2016). Physical Activity/Exercise and Diabetes: A Position Statement of the American Diabetes Association. *Dia Care* *39*, 2065–2079.
- Conlon, D.M. (2019). Role of sortilin in lipid metabolism: Current Opinion in Lipidology *30*, 198–204.
- Consoli, A., and Formoso, G. (2015). Potential side effects to GLP-1 agonists: understanding their safety and tolerability. *Expert Opinion on Drug Safety* *14*, 207–218.
- Coppola, T., Frantz, C., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Hirling, H., and Regazzi, R. (2002). Pancreatic beta-cell protein granuphilin binds Rab3 and Munc-18 and controls exocytosis. *Mol. Biol. Cell* *13*, 1906–1915.
- Coppola, T., Béraud-Dufour, S., Antoine, A., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2008). Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 2296–2302.
- Coppola, T., Beraud-Dufour, S., Lebrun, P., and Blondeau, N. (2019). Bridging the Gap Between Diabetes and Stroke in Search of High Clinical Relevance Therapeutic Targets. *Neuromol Med* *21*, 432–444.
- Corcoran, E.E., and Means, A.R. (2001). Defining Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascades in transcriptional regulation. *J Biol Chem* *276*, 2975–2978.
- Costes, S., Broca, C., Bertrand, G., Lajoix, A.-D., Bataille, D., Bockaert, J., and Dalle, S. (2006). ERK1/2 Control Phosphorylation and Protein Level of cAMP-Responsive Element-Binding Protein: A Key Role in Glucose-Mediated Pancreatic -Cell Survival. *Diabetes* *55*, 2220–2230.
- Costes, S., Vandewalle, B., Tourrel-Cuzin, C., Broca, C., Linck, N., Bertrand, G., Kerr-Conte, J., Portha, B., Pattou, F., Bockaert, J., et al. (2009). Degradation of cAMP-Responsive Element-Binding Protein by the Ubiquitin-Proteasome Pathway Contributes to Glucotoxicity in -Cells and Human Pancreatic Islets. *Diabetes* *58*, 1105–1115.

- Costes, S., Bertrand, G., and Ravier, M.A. (2021). Mechanisms of Beta-Cell Apoptosis in Type 2 Diabetes-Prone Situations and Potential Protection by GLP-1-Based Therapies. *Int J Mol Sci* 22, 5303.
- Crawford, T., Alfaro III, D., Kerrison, J., and Jablon, E. (2009). Diabetic Retinopathy and Angiogenesis. *CDR* 5, 8–13.
- Curry, D.L., Bennett, L.L., and Grodsky, G.M. (1968). Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused Rat Pancreas. *Endocrinology* 83, 572–584.
- Dadi, P.K., Vierra, N.C., Ustione, A., Piston, D.W., Colbran, R.J., and Jacobson, D.A. (2014a). Inhibition of Pancreatic β -Cell Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Reduces Glucose-stimulated Calcium Influx and Insulin Secretion, Impairing Glucose Tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 289, 12435–12445.
- Dadi, P.K., Vierra, N.C., and Jacobson, D.A. (2014b). Pancreatic β -Cell-specific Ablation of TASK-1 Channels Augments Glucose-stimulated Calcium Entry and Insulin Secretion, Improving Glucose Tolerance. *Endocrinology* 155, 3757–3768.
- Dalle, S., Quoyer, J., Varin, E., and Costes, S. (2011). Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic β -cells. *Curr Mol Pharmacol* 4, 187–195.
- Dalle, S., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2013). Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic β -cell impairments in type 2 diabetes. *Cellular Signalling* 25, 570–579.
- Darios, F., Connell, E., and Davletov, B. (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol* 585, 699–704.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Davies, M.J., Bianchi, C., and Del Prato, S. (2020). Use of incretin-based medications: what do current international recommendations suggest with respect to GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors? *Metabolism* 107, 154242.
- De Meyts, P. (2016). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., and Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *The Journal of Clinical Investigation* 96, 2489–2495.
- Dean, P.M. (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. *Diabetologia* 9, 115–119.

Decher, N., Ortiz-Bonin, B., Friedrich, C., Schewe, M., Kiper, A.K., Rinné, S., Seemann, G., Peyronnet, R., Zumhagen, S., Bustos, D., et al. (2017). Sodium permeable and “hypersensitive” TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med* 9, 403–414.

Deeney, J.T., Gromada, J., Høy, M., Olsen, H.L., Rhodes, C.J., Prentki, M., Berggren, P.-O., and Corkey, B.E. (2000). Acute Stimulation with Long Chain Acyl-CoA Enhances Exocytosis in Insulin-secreting Cells (HIT T-15 and NMRI β -Cells). *Journal of Biological Chemistry* 275, 9363–9368.

DeFronzo, R.A., Davidson, J.A., and Del Prato, S. (2012). The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14, 5–14.

Demir, İ., Yildirim Akan, O., Guler, A., Bozkaya, G., Aslanipour, B., and Calan, M. (2020). Relation of Decreased Circulating Sortilin Levels With Unfavorable Metabolic Profiles in Subjects With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *The American Journal of the Medical Sciences* 359, 8–16.

Demirtas, L., Guclu, A., Erdur, F.M., Akbas, E.M., Ozcicek, A., Onk, D., and Turkmen, K. (2016). Apoptosis, autophagy & endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 144, 515–524.

Deshpande, A.D., Harris-Hayes, M., and Schootman, M. (2008). Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Physical Therapy* 88, 1254–1264.

Devader, C., Khayachi, A., Veyssièrre, J., Moha Ou Maati, H., Roulot, M., Moreno, S., Borsotto, M., Martin, S., Heurteaux, C., and Mazella, J. (2015). In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant spadin. *Br J Pharmacol* 172, 2604–2617.

Devader, C., Roulot, M., Moréno, S., Minelli, A., Bortolomasi, M., Congiu, C., Gennarelli, M., Borsotto, M., Heurteaux, C., and Mazella, J. (2017). Serum sortilin-derived propeptides concentrations are decreased in major depressive disorder patients. *J Affect Disord* 208, 443–447.

Dhungel, N., Eleuteri, S., Li, L., Kramer, N.J., Chartron, J.W., Spencer, B., Kosberg, K., Fields, J.A., Stafa, K., Adame, A., et al. (2015). Parkinson’s Disease Genes VPS35 and EIF4G1 Interact Genetically and Converge on α -Synuclein. *Neuron* 85, 76–87.

Dickson, L.M., and Rhodes, C.J. (2004). Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 287, E192–E198.

Dicou, E., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2004). Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *Journal of Neuroscience Research* 78, 92–99.

Djillani, A., Pietri, M., Moreno, S., Heurteaux, C., Mazella, J., and Borsotto, M. (2017). Shortened Spadin Analogs Display Better TREK-1 Inhibition, In Vivo Stability and Antidepressant Activity. *Front Pharmacol* 8, 643.

- Djillani, A., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2019). Role of TREK-1 in Health and Disease, Focus on the Central Nervous System. *Front. Pharmacol.* *10*, 379.
- Dolais-Kitabgi, J., Kitabgi, P., Brazeau, P., and Freychet, P. (1979). Effect of neurotensin on insulin, glucagon, and somatostatin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* *105*, 256–260.
- Drucker, D.J., and Nauck, M.A. (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* *368*, 1696–1705.
- Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol Pharmacol* *57*, 906–912.
- Easom, R.A. (1999). CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* *48*, 675–684.
- Edwards, C.M., Stanley, S.A., Davis, R., Brynes, A.E., Frost, G.S., Seal, L.J., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001). Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *281*, E155-161.
- Eguchi, K., and Nagai, R. (2017). Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *Journal of Clinical Investigation* *127*, 14–23.
- Eizirik, D.L., and Millard, I. (2014). Stress du réticulum endoplasmique et apoptose de la cellule bêta dans le diabète: Chronique d'une mort annoncée. *Med Sci (Paris)* *30*, 496–499.
- Elashoff, M., Matveyenko, A.V., Gier, B., Elashoff, R., and Butler, P.C. (2011). Pancreatitis, Pancreatic, and Thyroid Cancer With Glucagon-Like Peptide-1–Based Therapies. *Gastroenterology* *141*, 150–156.
- Elghazi, L., and Bernal-Mizrachi, E. (2009). Akt and PTEN: β -cell mass and pancreas plasticity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* *20*, 243–251.
- Elliott, A.D., Ustione, A., and Piston, D.W. (2015). Somatostatin and insulin mediate glucose-inhibited glucagon secretion in the pancreatic α -cell by lowering cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *308*, E130-143.
- El-Mir, M.-Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 223–228.
- Espinosa, V.P., Liu, Y., Ferrini, M., Anghel, A., Nie, Y., Tripathi, P.V., Porche, R., Jansen, E., Stuart, R.C., Nillni, E.A., et al. (2008). Differential regulation of prohormone convertase 1/3, prohormone convertase 2 and phosphorylated cyclic-AMP-response element binding protein by short-term and long-term morphine treatment: implications for understanding the “switch” to opiate addiction. *Neuroscience* *156*, 788–799.
- Evans, S.F., Irmady, K., Ostrow, K., Kim, T., Nykjaer, A., Saftig, P., Blobel, C., and Hempstead, B.L. (2011). Neuronal Brain-derived Neurotrophic Factor Is Synthesized in Excess, with Levels

Regulated by Sortilin-mediated Trafficking and Lysosomal Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 286, 29556–29567.

Evert, A.B., Dennison, M., Gardner, C.D., Garvey, W.T., Lau, K.H.K., MacLeod, J., Mitri, J., Pereira, R.F., Rawlings, K., Robinson, S., et al. (2019). Nutrition Therapy for Adults With Diabetes or Prediabetes: A Consensus Report. *Dia Care* 42, 731–754.

Fatrai, S., Elghazi, L., Balcazar, N., Cras-Meneur, C., Krits, I., Kiyokawa, H., and Bernal-Mizrachi, E. (2006). Akt Induces β -Cell Proliferation by Regulating Cyclin D1, Cyclin D2, and p21 Levels and Cyclin-Dependent Kinase-4 Activity. *Diabetes* 55, 318–325.

Favre, D., Niederhauser, G., Fahmi, D., Plaisance, V., Brajkovic, S., Beeler, N., Allagnat, F., Haefliger, J.A., Regazzi, R., Waeber, G., et al. (2011). Role for inducible cAMP early repressor in promoting pancreatic beta cell dysfunction evoked by oxidative stress in human and rat islets. *Diabetologia* 54, 2337–2346.

Fedewa, M.V., Gist, N.H., Evans, E.M., and Dishman, R.K. (2014). Exercise and Insulin Resistance in Youth: A Meta-Analysis. *Pediatrics* 133, e163–e174.

Feingold, K.R. (2020). Oral and Injectable (Non-Insulin) Pharmacological Agents for Type 2 Diabetes. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Ferdaoussi, M., Abdelli, S., Yang, J.-Y., Cornu, M., Niederhauser, G., Favre, D., Widmann, C., Regazzi, R., Thorens, B., Waeber, G., et al. (2008). Exendin-4 Protects β -Cells From Interleukin-1 β -Induced Apoptosis by Interfering With the c-Jun NH₂-Terminal Kinase Pathway. *Diabetes* 57, 1205–1215.

Ferrannini, E., Muscelli, E., Natali, A., Gabriel, R., Mitrakou, A., Flyvbjerg, A., Golay, A., Hojlund, K., and The Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular Disease Risk (RISC) Project Investigators (2007). Association of fasting glucagon and proinsulin concentrations with insulin resistance. *Diabetologia* 50, 2342–2347.

Ferraro, L., Tomasini, M.C., Mazza, R., Fuxe, K., Fournier, J., Tanganelli, S., and Antonelli, T. (2008). Neurotensin receptors as modulators of glutamatergic transmission. *Brain Res Rev* 58, 365–373.

Finan, B., Capozzi, M.E., and Campbell, J.E. (2020). Repositioning Glucagon Action in the Physiology and Pharmacology of Diabetes. *Diabetes* 69, 532–541.

Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J* 15, 6854–6862.

Fioretto, P., Zambon, A., Rossato, M., Busetto, L., and Vettor, R. (2016). SGLT2 Inhibitors and the Diabetic Kidney. *Dia Care* 39, S165–S171.

- Foufelle, F., and Ferré, P. (2007). La réponse UPR: Son rôle physiologique et physiopathologique. *Med Sci (Paris)* 23, 291–296.
- Franke, T.F. (2008). Intracellular Signaling by Akt: Bound to Be Specific. *Science Signaling* 1, pe29–pe29.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114, 1752–1761.
- Gall, M.-A., Hougaard, P., Borch-Johnsen, K., and Parving, H.-H. (1997). Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ* 314, 783–783.
- Gammelsaeter, R., Coppola, T., Marcaggi, P., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Attwell, D., Regazzi, R., and Gundersen, V. (2011). A Role for Glutamate Transporters in the Regulation of Insulin Secretion. *PLoS ONE* 6, e22960.
- Gautier, J., Fetita, S., Sobngwi, E., and Salaün-Martin, C. (2005). Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 31, 233–242.
- Gelling, R.W., Du, X.Q., Dichmann, D.S., Romer, J., Huang, H., Cui, L., Obici, S., Tang, B., Holst, J.J., Fledelius, C., et al. (2003). Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1438–1443.
- Geppert, M., and Südhof, T.C. (1998). RAB3 AND SYNAPTOTAGMIN: The Yin and Yang of Synaptic Membrane Fusion. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 75–95.
- Gilbert, M.P., and Pratley, R.E. (2020). GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials. *Front. Endocrinol.* 11, 178.
- Gilon, P., Chae, H.-Y., Rutter, G.A., and Ravier, M.A. (2014). Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium* 56, 340–361.
- Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A., Pollak, M., Regensteiner, J.G., and Yee, D. (2010). Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care* 33, 1674–1685.
- Girard, J. (2013). Le rôle du rein dans l'homéostasie du glucose. *Médecine des Maladies Métaboliques* 7, 41–48.
- Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. *Cell* 104, 503–516.
- Gocher, A.M., Azabdaftari, G., Euscher, L.M., Dai, S., Karacosta, L.G., Franke, T.F., and Edelman, A.M. (2017). Akt activation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in ovarian cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 292, 14188–14204.

- Goettsch, C., Hutcheson, J.D., Aikawa, M., Iwata, H., Pham, T., Nykjaer, A., Kjolby, M., Rogers, M., Michel, T., Shibasaki, M., et al. (2016). Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *Journal of Clinical Investigation* 126, 1323–1336.
- Goettsch, C., Kjolby, M., and Aikawa, E. (2018). Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38, 19–25.
- Gong, L., Goswami, S., Giacomini, K.M., Altman, R.B., and Klein, T.E. (2012). Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 22, 820–827.
- Goodyer, W.R., Gu, X., Liu, Y., Bottino, R., Crabtree, G.R., and Kim, S.K. (2012). Neonatal β Cell Development in Mice and Humans Is Regulated by Calcineurin/NFAT. *Developmental Cell* 23, 21–34.
- Greenwood, M., Paterson, A., Rahman, P.A., Gillard, B.T., Langley, S., Iwasaki, Y., Murphy, D., and Greenwood, M.P. (2020). Transcription factor Creb3l1 regulates the synthesis of prohormone convertase enzyme PC1/3 in endocrine cells. *J Neuroendocrinol* 32.
- Gregg, B.E., Moore, P.C., Demozay, D., Hall, B.A., Li, M., Husain, A., Wright, A.J., Atkinson, M.A., and Rhodes, C.J. (2012). Formation of a Human β -Cell Population within Pancreatic Islets Is Set Early in Life. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, 3197–3206.
- Grodsky, G.M. (1972). A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *Journal of Clinical Investigation* 51, 2047–2059.
- Gromada, J., Høy, M., Renström, E., Bokvist, K., Eliasson, L., Göpel, S., and Rorsman, P. (1999). CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 518 (Pt 3), 745–759.
- Gross, J.L., de Azevedo, M.J., Silveiro, S.P., Canani, L.H., Caramori, M.L., and Zelmanovitz, T. (2005). Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* 28, 164–176.
- Halestrap, A.P., and Wilson, M.C. (2012). The monocarboxylate transporter family-Role and regulation. *IUBMB Life* 64, 109–119.
- Hamilton, J.A., and Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48, 2255–2269.
- Hartig, S.M., and Cox, A.R. (2020). Paracrine signaling in islet function and survival. *J Mol Med (Berl)* 98, 451–467.
- Heit, J.J. (2007). Calcineurin/NFAT signaling in the β -cell: From diabetes to new therapeutics. *Bioessays* 29, 1011–1021.
- Heit, J.J., Apelqvist, Å.A., Gu, X., Winslow, M.M., Neilson, J.R., Crabtree, G.R., and Kim, S.K. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic β -cell growth and function. *Nature* 443, 345–349.

- Helgadóttir, B., Forsell, Y., Hallgren, M., Möller, J., and Ekblom, Ö. (2017). Long-term effects of exercise at different intensity levels on depression: A randomized controlled trial. *Preventive Medicine* 105, 37–46.
- Henquin, J.C., Ravier, M.A., Nenquin, M., Jonas, J.C., and Gilon, P. (2003). Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *European Journal of Clinical Investigation* 33, 742–750.
- Herda, S., Raczkowski, F., Mittrücker, H.-W., Willimsky, G., Gerlach, K., Köhl, A.A., Breiderhoff, T., Willnow, T.E., Dörken, B., Höpken, U.E., et al. (2012). The Sorting Receptor Sortilin Exhibits a Dual Function in Exocytic Trafficking of Interferon- γ and Granzyme A in T Cells. *Immunity* 37, 854–866.
- Hermans-Borgmeyer, I., Hermey, G., Nykjaer, A., and Chica Schaller (1999). Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Molecular Brain Research* 65, 216–219.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., et al. (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23, 2684–2695.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thümmler, S., Peng, X.-D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., et al. (2006). Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9, 1134–1141.
- Heurteaux, C., Mazella, J., and Borsotto, M. (2011). Spadin, a Sortilin-derived peptide: a new concept in the antidepressant drug design. *OCL* 18, 202–207.
- Hinrichsen, C. (1997). *Organ Histology: A Student's Guide* (WORLD SCIENTIFIC).
- Hivelin, C., Béraud-Dufour, S., Devader, C., Abderrahmani, A., Moreno, S., Moha Ou Maati, H., Djillani, A., Heurteaux, C., Borsotto, M., Mazella, J., et al. (2016). Potentiation of Calcium Influx and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cell by the Specific TREK-1 Blocker Spadin. *J Diabetes Res* 2016, 3142175.
- Hivelin, C., Mazella, J., and Coppola, T. (2017). Sortilin derived propeptide regulation during adipocyte differentiation and inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 87–92.
- Holeček, M. (2018). Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr Metab (Lond)* 15, 33.
- Holst, J.J., and Gromada, J. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 287, E199–E206.
- Holst, J.J., Burcelin, R., and Nathanson, E. (2011). Neuroprotective properties of GLP-1: theoretical and practical applications. *Current Medical Research and Opinion* 27, 547–558.

- Holten, M.K., Zacho, M., Gaster, M., Juel, C., Wojtaszewski, J.F.P., and Dela, F. (2004). Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 294–305.
- Holz, G.G. (2004). Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53, 5–13.
- Hou, J.C., Min, L., and Pessin, J.E. (2009). Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. *Vitam Horm* 80, 473–506.
- Hsia, D.S., Grove, O., and Cefalu, W.T. (2017). An update on sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 24, 73–79.
- Hu, F., Padukkavidana, T., Vægter, C.B., Brady, O.A., Zheng, Y., Mackenzie, I.R., Feldman, H.H., Nykjaer, A., and Strittmatter, S.M. (2010). Sortilin-Mediated Endocytosis Determines Levels of the Frontotemporal Dementia Protein, Progranulin. *Neuron* 68, 654–667.
- Hui, H., Dotta, F., Mario, U.D., and Perfetti, R. (2004). Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J. Cell. Physiol.* 200, 177–200.
- Huising, M.O. (2020). Paracrine regulation of insulin secretion. *Diabetologia* 63, 2057–2063.
- Idevall-Hagren, O., and Tengholm, A. (2020). Metabolic regulation of calcium signaling in beta cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 103, 20–30.
- Igarashi, H., Fujimori, N., Ito, T., Nakamura, T., Oono, T., Nakamura, K., Suzuki, K., Jensen, R.T., and Takayanagi, R. (2011). Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and VIP Receptors-Elucidation of Structure and Function for Therapeutic Applications. *IJCM* 02, 500–508.
- Illario, M., Cavallo, A.L., Bayer, K.U., Di Matola, T., Fenzi, G., Rossi, G., and Vitale, M. (2003). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem* 278, 45101–45108.
- Inada, A., Hamamoto, Y., Tsuura, Y., Miyazaki, J., Toyokuni, S., Ihara, Y., Nagai, K., Yamada, Y., Bonner-Weir, S., and Seino, Y. (2004). Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic beta cells. *Mol Cell Biol* 24, 2831–2841.
- Inada, A., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2005). Induced ICER 1 γ down-regulates cyclin A expression and cell proliferation in insulin-producing β cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329, 925–929.
- Institut national de la santé et de la recherche médicale (2019). *Activité physique: prévention et traitement des maladies chroniques* (Montrouge: EDP sciences).
- Ishihara, H., Wang, H., Drewes, L.R., and Wollheim, C.B. (1999). Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells. *J Clin Invest* 104, 1621–1629.

- Islam, M.S. (2002). The Ryanodine Receptor Calcium Channel of β -Cells: Molecular Regulation and Physiological Significance. *Diabetes* 51, 1299–1309.
- Itoh, S., Mizuno, K., Aikawa, M., and Aikawa, E. (2018). Dimerization of sortilin regulates its trafficking to extracellular vesicles. *J Biol Chem* 293, 4532–4544.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., et al. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature* 422, 173–176.
- Jahn, R., and Südhof, T.C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863–911.
- Jans, L.A.W., Riedel, W.J., Markus, C.R., and Blokland, A. (2007). Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol Psychiatry* 12, 522–543.
- Jhala, U.S., Canettieri, G., Srean, R.A., Kulkarni, R.N., Krajewski, S., Reed, J., Walker, J., Lin, X., White, M., and Montminy, M. (2003). cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev.* 17, 1575–1580.
- Jiang, D., and Wan, F. (2018). Exendin-4 protects INS-1 cells against palmitate-induced apoptosis through the IRE1 α -Xbp1 signaling pathway. *Exp Ther Med* 16, 1029–1035.
- Jørgensen, M.U., Emr, S.D., and Winther, J.R. (1999). Ligand recognition and domain structure of Vps10p, a vacuolar protein sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 260, 461–469.
- Kaddai, V., Jager, J., Gonzalez, T., Najem-Lendom, R., Bonnafous, S., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Tanti, J.-F., and Cormont, M. (2009). Involvement of TNF- α in abnormal adipocyte and muscle sortilin expression in obese mice and humans. *Diabetologia* 52, 932–940.
- Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 473–481.
- Kailey, B., van de Bunt, M., Cheley, S., Johnson, P.R., MacDonald, P.E., Gloyn, A.L., Rorsman, P., and Braun, M. (2012). SSTR2 is the functionally dominant somatostatin receptor in human pancreatic β - and α -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E1107-1116.
- Kandror, K.V. (2018). The role of sortilin in the “Glut4 Pathway”. *Communicative & Integrative Biology* 11, e1393592.
- Kaneto, H., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Yamamoto, K., Kato, K., Shiraiwa, T., Katakami, N., Yamasaki, Y., Matsuhisa, M., and Matsuoka, T. (2008). PDX-1 and MafA Play a Crucial Role in Pancreatic β -Cell Differentiation and Maintenance of Mature β -Cell Function. *Endocr J* 55, 235–252.
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., and Matsuoka, T. (2010). Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation* 2010, 1–11.

- Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2004). Functional expression of TREK-2 in insulin-secreting MIN6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 323–331.
- Kaufman, R.J. (2011). Beta-Cell Failure, Stress, and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 365, 1931–1933.
- Kawai, S., Mukai, T., Mori, S., Mikami, B., and Murata, K. (2005). Hypothesis: Structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexokinase family. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 320–330.
- Ke, Z., Liang, D., Zeng, Q., Ren, Q., Ma, H., Gui, L., Chen, S., Guo, M., Xu, Y., Gao, W., et al. (2013). hsBAFF promotes proliferation and survival in cultured B lymphocytes via calcium signaling activation of mTOR pathway. *Cytokine* 62, 310–321.
- Keller, M.P., Choi, Y., Wang, P., Belt Davis, D., Rabaglia, M.E., Oler, A.T., Stapleton, D.S., Argmann, C., Schueler, K.L., Edwards, S., et al. (2008). A gene expression network model of type 2 diabetes links cell cycle regulation in islets with diabetes susceptibility. *Genome Research* 18, 706–716.
- Kennard, L.E., Chumbley, J.R., Ranatunga, K.M., Armstrong, S.J., Veale, E.L., and 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.
- Khoo, S., Griffen, S.C., Xia, Y., Baer, R.J., German, M.S., and Cobb, M.H. (2003). Regulation of Insulin Gene Transcription by ERK1 and ERK2 in Pancreatic β Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 32969–32977.
- Kim, D., and Kang, D. (2015). Role of K2P channels in stimulus-secretion coupling. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 467, 1001–1011.
- Kim, E.-J., Lee, D.K., Hong, S.-G., Han, J., and Kang, D. (2017). Activation of TREK-1, but Not TREK-2, Channel by Mood Stabilizers. *Int J Mol Sci* 18, E2460.
- Kimura, I., Ichimura, A., Ohue-Kitano, R., and Igarashi, M. (2020). Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev* 100, 171–210.
- Kitabgi, P., Carraway, R., and 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., and Nykjaer, A. (2010). Sort1, Encoded by the Cardiovascular Risk Locus 1p13.3, Is a Regulator of Hepatic Lipoprotein Export. *Cell Metabolism* 12, 213–223.
- Klover, P.J., and Mooney, R.A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 753–758.
- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M., and Diabetes Prevention Program Research Group (2002). Reduction in the

incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346, 393–403.

Koh, S.D., Monaghan, K., Sergeant, G.P., Ro, S., Walker, R.L., Sanders, K.M., and Horowitz, B. (2001). TREK-1 Regulation by Nitric Oxide and cGMP-dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44338–44346.

Kosiborod, M., Cavender, M.A., Fu, A.Z., Wilding, J.P., Khunti, K., Holl, R.W., Norhammar, A., Birkeland, K.I., Jørgensen, M.E., Thuresson, M., et al. (2017). Lower Risk of Heart Failure and Death in Patients Initiated on Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors Versus Other Glucose-Lowering Drugs: The CVD-REAL Study (Comparative Effectiveness of Cardiovascular Outcomes in New Users of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors). *Circulation* 136, 249–259.

Kowluru, A. (2020). GPCRs, G Proteins, and Their Impact on β -cell Function. *Compr Physiol* 10, 453–490.

Kristinsson, H., Smith, D.M., Bergsten, P., and Sargsyan, E. (2013). FFAR1 Is Involved in Both the Acute and Chronic Effects of Palmitate on Insulin Secretion. *Endocrinology* 154, 4078–4088.

Kulina, G.R., and Rayfield, E.J. (2016). The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Management of Diabetes. *Endocrine Practice* 22, 612–621.

Langlois, A., Vion, J., Dumond, A., Pinget, M., and Bouzakri, K. (2021a). New Recommendations for T2D Management: Beneficial Impact of Exerkines on Pancreatic β -Cells Function and Glucose Homeostasis in Skeletal Muscle. *Journal of Diabetes and Clinical Research* 3.

Langlois, A., Forterre, A., Pinget, M., and Bouzakri, K. (2021b). Impact of moderate exercise on fatty acid oxidation in pancreatic β -cells and skeletal muscle. *J Endocrinol Invest* 44, 1815–1825.

Larger, É. (2003). Hyperglycémie et angiogenèse. *Med Sci (Paris)* 19, 840–846.

Lauritzen, I. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *The EMBO Journal* 19, 1784–1793.

Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A.J., Canuel, M., and Morales, C.R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J* 22, 6430–6437.

Li, F., and Malik, K.U. (2005). Angiotensin II-induced Akt activation is mediated by metabolites of arachidonic acid generated by CaMKII-stimulated Ca²⁺(+)-dependent phospholipase A2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H2306-2316.

Li, J., Matye, D.J., and Li, T. (2015). Insulin resistance induces posttranslational hepatic sortilin 1 degradation in mice. *J Biol Chem* 290, 11526–11536.

Li, Z., Zhou, Z., Huang, G., Hu, F., Xiang, Y., and He, L. (2013). Exendin-4 protects mitochondria from reactive oxygen species induced apoptosis in pancreatic Beta cells. *PLoS One* 8, e76172.

- Ling, J., Cheng, P., Ge, L., Zhang, D., Shi, A., Tian, J., Chen, Y., Li, X., Zhang, J., and Yang, K. (2019). The efficacy and safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes: a Bayesian network meta-analysis of 58 randomized controlled trials. *Acta Diabetol* 56, 249–272.
- Liu, W., and Saint, D. (2004). HETEROGENEOUS EXPRESSION OF TANDEM-PORE K⁺ CHANNEL GENES IN ADULT AND EMBRYONIC RAT HEART QUANTIFIED BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 174–178.
- Liu, Z., Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Chen, X., and Hermansen, K. (2008). Dose- and Glucose-Dependent Effects of Amino Acids on Insulin Secretion from Isolated Mouse Islets and Clonal INS-1E Beta-Cells. *Rev Diabet Stud* 5, 232–244.
- Lolicato, M., Arrigoni, C., Mori, T., Sekioka, Y., Bryant, C., Clark, K.A., and Minor, D.L. (2017). K2P2.1 (TREK-1)–activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site. *Nature* 547, 364–368.
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G.A., Beguinot, F., and Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *IJMS* 20, 2358.
- Lupsa, B.C., and Inzucchi, S.E. (2018). Use of SGLT2 inhibitors in type 2 diabetes: weighing the risks and benefits. *Diabetologia* 61, 2118–2125.
- MacDonald, P.E., El-kholy, W., Riedel, M.J., Salapatek, A.M.F., Light, P.E., and Wheeler, M.B. (2002). The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* 51, S434–S442.
- Maechler, P. (2017). Glutamate pathways of the beta-cell and the control of insulin secretion. *Diabetes Research and Clinical Practice* 131, 149–153.
- Magnan, C., and Ktorza, A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinologie* 2, 241–264.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, 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., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000a). TREK-1 is a heat-activated background K⁽⁺⁾ channel. *EMBO J* 19, 2483–2491.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000b). Lysophospholipids Open the Two-pore Domain Mechano-gated K⁺ Channels TREK-1 and TRAAK. *Journal of Biological Chemistry* 275, 10128–10133.
- Manning, B.D., and Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405.

Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Boggi, U., Filipponi, F., Weir, G.C., Eizirik, D.L., and Cnop, M. (2007). The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50, 2486–2494.

Martin, S., Navarro, V., Vincent, J.P., and Mazella, J. (2002). Neurotensin receptor–1 and –3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123, 1135–1143.

Martin, S., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2003). Involvement of the Neurotensin Receptor-3 in the Neurotensin-Induced Migration of Human Microglia. *The Journal of Neuroscience* 23, 1198–1205.

Massa, F., Devader, C., Béraud-Dufour, S., Brau, F., Coppola, T., and Mazella, J. (2013). Focal adhesion kinase dependent activation of the PI3 kinase pathway by the functional soluble form of neurotensin receptor-3 in HT29 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 952–959.

Massa, F., Devader, C., Lacas-Gervais, S., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2014). Impairment of HT29 Cancer Cells Cohesion by the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3. *Genes Cancer* 5, 240–249.

Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., et al. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat Immunol* 11, 897–904.

Matschinsky, F.M. (1996). A Lesson in Metabolic Regulation Inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm. *Diabetes* 45, 223–241.

Matschinsky, F.M., and Wilson, D.F. (2019). The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans. *Frontiers in Physiology* 10.

Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 599–609.

Mazella, J. (2001). Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cellular Signalling* 13, 1–6.

Mazella, J., and Vincent, J.-P. (2004). La sortiline : une protéine associée à de multiples fonctions. *Med Sci (Paris)* 20, 629–631.

Mazella, J., Chabry, J., Zsurger, N., and Vincent, J.P. (1989). Purification of the neurotensin receptor from mouse brain by affinity chromatography. *J Biol Chem* 264, 5559–5563.

Mazella, J., Botto, J.M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P., and 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., Zsürger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P., et al. (1998). The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 273, 26273–26276.

Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., et al. (2010). Spadin, a Sortilin-Derived Peptide, Targeting Rodent TREK-1 Channels: A New Concept in the Antidepressant Drug Design. *PLoS Biology* 8, e1000355.

Mazella, J., Béraud-Dufour, S., Devader, C., Massa, F., and Coppola, T. (2012). Neurotensin and its receptors in the control of glucose homeostasis. *Frontiers in Endocrinology* 3.

Mazella, J., Borsotto, M., and Heurteaux, C. (2018). The Involvement of Sortilin/NTSR3 in Depression as the Progenitor of Spadin and Its Role in the Membrane Expression of TREK-1. *Front Pharmacol* 9, 1541.

Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kellsell, R.E., Gloger, I.I., and Pangalos, M.N. (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Molecular Brain Research* 86, 101–114.

Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2008). β -Cell Replication Is the Primary Mechanism Subservicing the Postnatal Expansion of β -Cell Mass in Humans. *Diabetes* 57, 1584–1594.

Mentlein, R., Gallwitz, B., and Schmidt, W.E. (1993). Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 214, 829–835.

Meurs, M., Roest, A.M., Wolffenbuttel, B.H.R., Stolk, R.P., de Jonge, P., and Rosmalen, J.G.M. (2016). Association of Depressive and Anxiety Disorders With Diagnosed Versus Undiagnosed Diabetes: An Epidemiological Study of 90,686 Participants. *Psychosom Med* 78, 233–241.

Michelsen, K., Prickaerts, J., and Steinbusch, H. (2008). The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *In Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 233–264.

Modi, H., Cornu, M., and Thorens, B. (2014). Glutamine stimulates biosynthesis and secretion of insulin-like growth factor 2 (IGF2), an autocrine regulator of beta cell mass and function. *J Biol Chem* 289, 31972–31982.

Moha Ou Maati, H., Veysié, J., Labbal, F., Coppola, T., Gandin, C., Widmann, C., Mazella, J., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2012). Spadin as a new antidepressant: absence of TREK-1-related side effects. *Neuropharmacology* 62, 278–288.

Mohrmann, R., Dhara, M., and Bruns, D. (2015). Complexins: small but capable. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4221–4235.

- Monami, M., Liistro, F., Scatena, A., Nreu, B., and Mannucci, E. (2018). Short and medium-term efficacy of sodium glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibitors: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab* 20, 1213–1222.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 13, 709–721.
- Moreno, S., Devader, C.M., Pietri, M., Borsotto, M., Heurteaux, C., and Mazella, J. (2018). Altered Trek-1 Function in Sortilin Deficient Mice Results in Decreased Depressive-Like Behavior. *Front Pharmacol* 9, 863.
- Morris, N.J., Ross, S.A., Lane, W.S., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1998). Sortilin Is the Major 110-kDa Protein in GLUT4 Vesicles from Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 3582–3587.
- Mortensen, M.B., Kjolby, M., Gunnensen, S., Larsen, J.V., Palmfeldt, J., Falk, E., Nykjaer, A., and 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., and Correr, S. (1997). Histology of the exocrine pancreas. *Microscopy Research and Technique* 37, 384–398.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 121–138.
- Müller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., et al. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism* 4, 437–460.
- Murbartián, J., Lei, Q., Sando, J.J., and Bayliss, D.A. (2005). Sequential Phosphorylation Mediates Receptor- and Kinase-induced Inhibition of TREK-1 Background Potassium Channels. *Journal of Biological Chemistry* 280, 30175–30184.
- Murussi, M., Baglio, P., Gross, J.L., and Silveiro, S.P. (2002). Risk Factors for Microalbuminuria and Macroalbuminuria in Type 2 Diabetic Patients: A 9-year follow-up study. *Diabetes Care* 25, 1101–1103.
- Musunuru, K., Strong, A., Frank-Kamenetsky, M., Lee, N.E., Ahfeldt, T., Sachs, K.V., Li, X., Li, H., Kuperwasser, N., Ruda, V.M., et al. (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466, 714–719.
- Mykkänen, L., Zaccaro, D.J., Hales, C.N., Festa, A., and Haffner, S.M. (1999). The relation of proinsulin and insulin to insulin sensitivity and acute insulin response in subjects with newly diagnosed type II diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetologia* 42, 1060–1066.
- Nauck, M.A., and Meier, J.J. (2016). The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 4, 525–536.

- Nauck, M.A., and Meier, J.J. (2018). Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 20, 5–21.
- Nauck, M.A., Heimesaat, M.M., Orskov, C., Holst, J.J., Ebert, R., and Creutzfeldt, W. (1993). Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 91, 301–307.
- Nauck, M.A., Quast, D.R., Wefers, J., and Meier, J.J. (2021). GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art. *Mol Metab* 46, 101102.
- Navarro, V., Vincent, J.-P., and Mazella, J. (2002). Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298, 760–764.
- Nesher, R., and Cerasi, E. (2002). Modeling Phasic Insulin Release: Immediate and Time-Dependent Effects of Glucose. *Diabetes* 51, S53–S59.
- Newgard, C.B. (2012). Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab* 15, 606–614.
- Newsholme, P., and Krause, M. (2012). Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *Clin Biochem Rev* 33, 35–47.
- Newsholme, P., Brennan, L., and Bender, K. (2006). Amino Acid Metabolism, β -Cell Function, and Diabetes. *Diabetes* 55, S39–S47.
- Newsholme, P., Bender, K., Kiely, A., and Brennan, L. (2007). Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochemical Society Transactions* 35, 1180–1186.
- Newsholme, P., Cruzat, V., Arfuso, F., and Keane, K. (2014). Nutrient regulation of insulin secretion and action. *Journal of Endocrinology* 221, R105–R120.
- van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 213–228.
- Nielsen, M.S. (2001). The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *The EMBO Journal* 20, 2180–2190.
- Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J., and Petersen, C.M. (1999). Sortilin/Neurotensin Receptor-3 Binds and Mediates Degradation of Lipoprotein Lipase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 8832–8836.
- Nilsson, S.K., Christensen, S., Raarup, M.K., Ryan, R.O., Nielsen, M.S., and Olivecrona, G. (2008). Endocytosis of Apolipoprotein A-V by Members of the Low Density Lipoprotein Receptor and the Vps10p Domain Receptor Families. *Journal of Biological Chemistry* 283, 25920–25927.
- Nykjaer, A., and Willnow, T.E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences* 35, 261–270.

- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* *427*, 843–848.
- Oh, T.J., Ahn, C.H., Kim, B.-R., Kim, K.M., Moon, J.H., Lim, S., Park, K.S., Lim, C., Jang, H., and Choi, S.H. (2017). Circulating sortilin level as a potential biomarker for coronary atherosclerosis and diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* *16*, 92.
- Ohara-Imaizumi, M., Fukuda, M., Niinobe, M., Misonou, H., Ikeda, K., Murakami, T., Kawasaki, M., Mikoshiba, K., and Kumakura, K. (1997). Distinct roles of C2A and C2B domains of synaptotagmin in the regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 287–291.
- Okuno, S., Kitani, T., Matsuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U., and Fujisawa, H. (2000). Studies on the phosphorylation of protein kinase B by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biochem* *127*, 965–970.
- Pan, X., Zaarur, N., Singh, M., Morin, P., and Kandror, K.V. (2017). Sortilin and retromer mediate retrograde transport of Glut4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Biol Cell* *28*, 1667–1675.
- Panagiotopoulos, C., Hadjiyannakis, S., and Henderson, M. (2018). Type 2 Diabetes in Children and Adolescents. *Canadian Journal of Diabetes* *42*, S247–S254.
- Park, W.S., Heo, W.D., Whalen, J.H., O'Rourke, N.A., Bryan, H.M., Meyer, T., and Teruel, M.N. (2008). Comprehensive identification of PIP3-regulated PH domains from *C. elegans* to *H. sapiens* by model prediction and live imaging. *Mol Cell* *30*, 381–392.
- Patel, A.J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J* *17*, 4283–4290.
- Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience* *2*, 422–426.
- Patel, K.M., Strong, A., Tohyama, J., Jin, X., Morales, C.R., Billheimer, J., Millar, J., Kruth, H., and Rader, D.J. (2015). Macrophage Sortilin Promotes LDL Uptake, Foam Cell Formation, and Atherosclerosis. *Circ Res* *116*, 789–796.
- Patzelt, C., Labrecque, A.D., Duguid, J.R., Carroll, R.J., Keim, P.S., Henrikson, R.L., and Steiner, D.F. (1978). Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *75*, 1260–1264.
- Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* *77*, 32–42.
- Pessin, J.E., and Saltiel, A.R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *106*, 165–169.
- Pesta, D.H., Goncalves, R.L.S., Madiraju, A.K., Strasser, B., and Sparks, L.M. (2017). Resistance training to improve type 2 diabetes: working toward a prescription for the future. *Nutr Metab (Lond)* *14*, 24.

- Petersen, C.M. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *The EMBO Journal* *18*, 595–604.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* *98*, 2133–2223.
- Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P., and 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.
- Petkova-Kirova, P., Rakovska, A., Della Corte, L., Zaekova, G., Radomirov, R., and Mayer, A. (2008). Neurotensin modulation of acetylcholine, GABA, and aspartate release from rat prefrontal cortex studied in vivo with microdialysis. *Brain Res Bull* *77*, 129–135.
- Pietri, M., Djillani, A., Mazella, J., Borsotto, M., and Heurteaux, C. (2019). First evidence of protective effects on stroke recovery and post-stroke depression induced by sortilin-derived peptides. *Neuropharmacology* *158*, 107715.
- Pilkis, S.J., and Granner, D.K. (1992). Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* *54*, 885–909.
- Pincus, I.J. (1953). GLUCAGON, THE HYPERGLYCEMIC AGENT IN PANCREATIC EXTRACTS: A Possible Factor in Certain Types of Diabetes. *AMA Arch Intern Med* *92*, 666.
- Pladevall, M., Riera-Guardia, N., Margulis, A.V., Varas-Lorenzo, C., Calingaert, B., and Perez-Gutthann, S. (2016). Cardiovascular risk associated with the use of glitazones, metformin and sulfonyleureas: meta-analysis of published observational studies. *BMC Cardiovasc Disord* *16*, 14.
- Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I.M., and Potter, H. (1993). Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 5781–5785.
- van Poppel, M.N., and Desoye, G. (2020). Growing fat in utero: timing is everything. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* *8*, 259–260.
- Prentki, M., Matschinsky, F.M., and Madiraju, S.R.M. (2013). Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metabolism* *18*, 162–185.
- Prentki, M., Peyot, M.-L., Masiello, P., and Madiraju, S.R.M. (2020a). Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes* *69*, 279–290.
- Prentki, M., Corkey, B.E., and Madiraju, S.R.M. (2020b). Lipid-associated metabolic signalling networks in pancreatic beta cell function. *Diabetologia* *63*, 10–20.
- Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., and Ashcroft, F. (2002). Sulfonyleurea Stimulation of Insulin Secretion. *Diabetes* *51*, S368–S376.

Quistgaard, E.M., Madsen, P., Grøftehauge, M.K., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2009). Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain. *Nat Struct Mol Biol* 16, 96–98.

Quistgaard, E.M., Grøftehauge, M.K., Madsen, P., Pallesen, L.T., Christensen, B., Sørensen, E.S., Nissen, P., Petersen, C.M., and Thirup, S.S. (2014). Revisiting the structure of the Vps10 domain of human sortilin and its interaction with neurotensin: Structure of Sortilin-Neurotensin Complex. *Protein Science* 23, 1291–1300.

Rabinowich, L., Fishman, S., Hubel, E., Thurm, T., Park, W.-J., Pewzner-Jung, Y., Saroha, A., Erez, N., Halpern, Z., Futerman, A.H., et al. (2015). Sortilin deficiency improves the metabolic phenotype and reduces hepatic steatosis of mice subjected to diet-induced obesity. *J Hepatol* 62, 175–181.

Raffort, J., Lareyre, F., Massalou, D., Fénelon, P., Panaïa-Ferrari, P., and Chinetti, G. (2017). Insights on glicentin, a promising peptide of the proglucagon family. *Biochem Med (Zagreb)* 27, 308–324.

Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., and Henquin, J.C. (2008). Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10, 32–42.

Rasmussen, L., Poulsen, C.W., Kampmann, U., Smedegaard, S.B., Ovesen, P.G., and Fuglsang, J. (2020). Diet and Healthy Lifestyle in the Management of Gestational Diabetes Mellitus. *Nutrients* 12, E3050.

Ravier, M.A., Guldenagel, M., Charollais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Sohl, G., Wollheim, C.B., Willecke, K., Henquin, J.-C., and Meda, P. (2005). Loss of Connexin36 Channels Alters -Cell Coupling, Islet Synchronization of Glucose-Induced Ca^{2+} and Insulin Oscillations, and Basal Insulin Release. *Diabetes* 54, 1798–1807.

Rix, I., Nexøe-Larsen, C., Bergmann, N.C., Lund, A., and Knop, F.K. (2019). Glucagon Physiology. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., and Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine* 48, e219–e219.

Rogers, M.-L., Bailey, S., Matusica, D., Nicholson, I., Muyderman, H., Pagadala, P.C., Neet, K.E., Zola, H., Macardle, P., and Rush, R.A. (2010). ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex. *J Neuroimmunol* 226, 93–103.

Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Martínez, M.S., Olivar, L.C., Nava, M., Tomey, D., Rojas, M., Salazar, J., Garicano, C., et al. (2018). Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *J Diabetes Res* 2018, 9601801.

Rokhlin, O., Taghiyev, A.F., Bayer, K.U., Bumcrot, D., Kotelianski, V.E., Glover, R.A., and Cohen, M.B. (2007). Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival. *Cancer Biology & Therapy* 6, 732–742.

- Rorsman, P., and Ashcroft, F.M. (2018). Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev* 98, 117–214.
- Rorsman, P., and Huising, M.O. (2018). The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 14, 404–414.
- Rorsman, P., and Renström, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029–1045.
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66, 105–143.
- Rotermund, C., Machetanz, G., and Fitzgerald, J.C. (2018). The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 400.
- Roulot, M., Minelli, A., Bortolomasi, M., Maffioletti, E., Gennarelli, M., Borsotto, M., Heurteaux, C., and Mazella, J. (2018). Increased serum levels of sortilin-derived propeptide after electroconvulsive therapy in treatment-resistant depressed patients. *Neuropsychiatr Dis Treat* 14, 2307–2312.
- Rowlands, J., Heng, J., Newsholme, P., and Carlessi, R. (2018). Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function. *Front. Endocrinol.* 9, 672.
- Royal, P., Andres-Bilbe, A., Ávalos Prado, P., Verkest, C., Wdziekonski, B., Schaub, S., Baron, A., Lesage, F., Gasull, X., Levitz, J., et al. (2019). Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK. *Neuron* 101, 232-245.e6.
- Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F., and Kitai, R. (1955). The disulphide bonds of insulin. *Biochemical Journal* 60, 541–556.
- Sabatini, P.V., Speckmann, T., and Lynn, F.C. (2019). Friend and foe: β -cell Ca^{2+} signaling and the development of diabetes. *Molecular Metabolism* 21, 1–12.
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A.A., Ogurtsova, K., et al. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice* 157, 107843.
- Sakamoto, K., Karelina, K., and Obrietan, K. (2011). CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection: CREB in synaptic plasticity and cell survival. *Journal of Neurochemistry* 116, 1–9.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M.-I., Ibarrola-Jurado, N., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., et al. (2014). Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets: A Subgroup Analysis of a Randomized Trial. *Ann Intern Med* 160, 1–10.
- Salvi, R., and Abderrahmani, A. (2014). Decompensation of β -Cells in Diabetes: When Pancreatic β -Cells Are on ICE(R). *Journal of Diabetes Research* 2014, 1–7.

- Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 126, 12–22.
- Sanchez-Rangel, E., and Inzucchi, S.E. (2017). Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia* 60, 1586–1593.
- Sánchez-Villegas, A., Henríquez, P., Bes-Rastrollo, M., and Doreste, J. (2006). Mediterranean diet and depression. *Public Health Nutr.* 9, 1104–1109.
- Scherer, P.E. (2006). Adipose Tissue: From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes* 55, 1537–1545.
- Schiavo, G., Gu, Q.M., Prestwich, G.D., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1996). Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13327–13332.
- Schroeder, L.E., and Leininger, G.M. (2018). Role of central neurotensin in regulating feeding: Implications for the development and treatment of body weight disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 900–916.
- Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., and Prentki, M. (1997). Metabolic Fate of Glucose in Purified Islet Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 18572–18579.
- Schuit, F.C., Huypens, P., Heimberg, H., and Pipeleers, D.G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50, 1–11.
- Scott, R.P., and Quaggin, S.E. (2015). The cell biology of renal filtration. *Journal of Cell Biology* 209, 199–210.
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L.J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M.J., and Wollheim, C.B. (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *Journal of Biological Chemistry* 269, 4895–4902.
- Sesti, G., Avogaro, A., Belcastro, S., Bonora, B.M., Croci, M., Daniele, G., Dauriz, M., Dotta, F., Formichi, C., Frontoni, S., et al. (2019). Ten years of experience with DPP-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 56, 605–617.
- Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1999). CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 821–861.
- Shen, X., Valencia, C.A., Szostak, J., Dong, B., and Liu, R. (2005). Scanning the human proteome for calmodulin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5969–5974.
- Simon, D.K., Tanner, C.M., and Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med* 36, 1–12.

- Sinclair, E.M., and Drucker, D.J. (2005). Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology (Bethesda)* 20, 357–365.
- Singh, A.K., Gupta, R., Ghosh, A., and Misra, A. (2020a). Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations. *Diabetes Metab Syndr* 14, 303–310.
- Singh, A.K., Gangopadhyay, K.K., and Singh, R. (2020b). Risk of acute pancreatitis with incretin-based therapy: a systematic review and updated meta-analysis of cardiovascular outcomes trials. *Expert Rev Clin Pharmacol* 13, 461–468.
- Skyler, J.S., Bakris, G.L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R.H., Groop, L., Groop, P.-H., Handelsman, Y., Insel, R.A., Mathieu, C., et al. (2017). Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes* 66, 241–255.
- Sola, D., Rossi, L., Schianca, G.P.C., Maffioli, P., Bigliocca, M., Mella, R., Corlianò, F., Fra, G.P., Bartoli, E., and Derosa, G. (2015). State of the art paper Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Aoms* 4, 840–848.
- Soligo, M., Protto, V., Florenzano, F., Bracci-Laudiero, L., De Benedetti, F., Chiaretti, A., and Manni, L. (2015). The mature/pro nerve growth factor ratio is decreased in the brain of diabetic rats: Analysis by ELISA methods. *Brain Res* 1624, 455–468.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9, 59–71.
- Song, W.-J., Schreiber, W.E., Zhong, E., Liu, F.-F., Kornfeld, B.D., Wondisford, F.E., and Hussain, M.A. (2008). Exendin-4 Stimulation of Cyclin A2 in β -Cell Proliferation. *Diabetes* 57, 2371–2381.
- Sposato, V., Manni, L., Chaldakov, G.N., and Aloe, L. (2007). Streptozotocin-induced diabetes is associated with changes in NGF levels in pancreas and brain. *Arch Ital Biol* 145, 87–97.
- Srinivasan, S., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., and Permutt, M.A. (2002). Glucose promotes pancreatic islet β -cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 283, E784–E793.
- Standring, S., Ananad, N., and Gray, H. (2016). *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice* (Philadelphia, Pa.: Elsevier).
- Steiner, D.F., Park, S.-Y., Støy, J., Philipson, L.H., and Bell, G.I. (2009). A brief perspective on insulin production. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 11 Suppl 4, 189–196.
- Stewart, A.F., Hussain, M.A., García-Ocaña, A., Vasavada, R.C., Bhushan, A., Bernal-Mizrachi, E., and Kulkarni, R.N. (2015). Human β -cell proliferation and intracellular signaling: part 3. *Diabetes* 64, 1872–1885.
- Stožer, A., Paradiž Leitgeb, E., Pohorec, V., Dolencek, J., Križančić Bombek, L., Gosak, M., and Skelin Klemen, M. (2021). The Role of cAMP in Beta Cell Stimulus–Secretion and Intercellular Coupling. *Cells* 10, 1658.

- Strawbridge, R.J., Dupuis, J., Prokopenko, I., Barker, A., Ahlqvist, E., Rybin, D., Petrie, J.R., Travers, M.E., Bouatia-Naji, N., Dimas, A.S., et al. (2011). Genome-wide association identifies nine common variants associated with fasting proinsulin levels and provides new insights into the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetes* *60*, 2624–2634.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., and van Haeften, T.W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* *365*, 1333–1346.
- Südhof, T.C. (2013). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med* *19*, 1227–1231.
- Sullivan, B.A., Hollister-Lock, J., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2015). Reduced Ki67 Staining in the Postmortem State Calls Into Question Past Conclusions About the Lack of Turnover of Adult Human β -Cells. *Diabetes* *64*, 1698–1702.
- Sun, Z., and Brodsky, J.L. (2019). Protein quality control in the secretory pathway. *J Cell Biol* *218*, 3171–3187.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P.S., and Maurer, R.A. (1994). Differential activation of CREB by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.* *8*, 2527–2539.
- Swulius, M.T., and Waxham, M.N. (2008). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci* *65*, 2637–2657.
- Szegő, É.M., Outeiro, T.F., Kermer, P., and Schulz, J.B. (2013). Impairment of the septal cholinergic neurons in MPTP-treated A30P α -synuclein mice. *Neurobiology of Aging* *34*, 589–601.
- Tahrani, A.A., Barnett, A.H., and Bailey, C.J. (2016). Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* *12*, 566–592.
- Talbot, H., Saada, S., Naves, T., Gallet, P.-F., Fauchais, A.-L., and Jauberteau, M.-O. (2019). Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes. *Front. Pharmacol.* *9*, 1507.
- Talukdar, S., Olefsky, J.M., and Osborn, O. (2011). Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci* *32*, 543–550.
- Tanaka, K., Masu, M., and Nakanishi, S. (1990). Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* *4*, 847–854.
- Teissier, A., Chemiakine, A., Inbar, B., Bagchi, S., Ray, R.S., Palmiter, R.D., Dymecki, S.M., Moore, H., and Ansorge, M.S. (2015). Activity of Raphé Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Reports* *13*, 1965–1976.
- Teng, H.K. (2005). ProBDNF Induces Neuronal Apoptosis via Activation of a Receptor Complex of p75NTR and Sortilin. *Journal of Neuroscience* *25*, 5455–5463.

- Teng, K.K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B.L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Devel Neurobio NA-NA*.
- Tengholm, A., and Gylfe, E. (2017). cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes Metab* *19*, 42–53.
- Tertyshnikova, S., Knox, R.J., Plym, M.J., Thalody, G., Griffin, C., Neelands, T., Harden, D.G., Signor, L., Weaver, D., Myers, R.A., et al. (2005). BL-1249 [(5,6,7,8-tetrahydro-naphthalen-1-yl)-[2-(1H-tetrazol-5-yl)-phenyl]-amine]: a putative potassium channel opener with bladder-relaxant properties. *J Pharmacol Exp Ther* *313*, 250–259.
- Thorens, B. (2003). Incrétines, sécrétion d'insuline et diabète. *Med Sci (Paris)* *19*, 860–863.
- Thorens, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* *13*, 82–88.
- Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* *58*, 221–232.
- Thorens, B., and Labouèbe, G. (2021). Détection cérébrale du glucose et homéostasie du glucose. *Médecine des Maladies Métaboliques* *15*, 518–525.
- Thorens, B., and Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *298*, E141-145.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., and Lenzen, S. (1997). Relation Between Antioxidant Enzyme Gene Expression and Antioxidative Defense Status of Insulin-Producing Cells. *Diabetes* *46*, 1733–1742.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* *14*, 222–231.
- Tomita, T., Masuzaki, H., Iwakura, H., Fujikura, J., Noguchi, M., Tanaka, T., Ebihara, K., Kawamura, J., Komoto, I., Kawaguchi, Y., et al. (2006). Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia* *49*, 962–968.
- Tornheim, K. (2018). Glucose Metabolism and Hormonal Regulation. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, (Elsevier), pp. 87–94.
- Tran, S., Retnakaran, R., Zinman, B., and Kramer, C.K. (2018). Efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists compared to dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the management of type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab* *20*, 68–76.
- Trussardi Fayh, A.P., Lopes, A.L., Fernandes, P.R., Reischak-Oliveira, A., and Friedman, R. (2013). Impact of weight loss with or without exercise on abdominal fat and insulin resistance in obese individuals: a randomised clinical trial. *Br J Nutr* *110*, 486–492.

- Unudurthi, S.D., Wu, X., Qian, L., Amari, F., Onal, B., Li, N., Makara, M.A., Smith, S.A., Snyder, J., Fedorov, V.V., et al. (2016). Two-Pore K⁺ Channel TREK-1 Regulates Sinoatrial Node Membrane Excitability. *JAMA* 5.
- Vally, F., Presneill, J., and Cade, T. (2017). Macrosomia Rates in Women with Diet-Controlled Gestational Diabetes: A Retrospective Study. *Journal of Pregnancy* 2017, 1–5.
- Veale, E.L., Al-Moubarak, E., Bajaria, N., Omoto, K., Cao, L., Tucker, S.J., Stevens, E.B., and Mathie, A. (2014). Influence of the N Terminus on the Biophysical Properties and Pharmacology of TREK1 Potassium Channels. *Mol Pharmacol* 85, 671–681.
- Veyssiere, J., Moha ou Maati, H., Mazella, J., Gaudriault, G., Moreno, S., Heurteaux, C., and Borsotto, M. (2015). Retroinverso analogs of spadin display increased antidepressant effects. *Psychopharmacology* 232, 561–574.
- Vierra, N.C., Dadi, P.K., Jeong, I., Dickerson, M., Powell, D.R., and Jacobson, D.A. (2015). Type 2 Diabetes–Associated K⁺Channel TALK-1 Modulates β -Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis. *Diabetes* 64, 3818–3828.
- Wang, C., Guan, Y., and Yang, J. (2010). Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction. *International Journal of Endocrinology* 2010, 1–10.
- Wang, L., Liu, Y., Yang, J., Zhao, H., Ke, J., Tian, Q., Zhang, L., Wen, J., Wei, R., and Hong, T. (2014). GLP-1 analog liraglutide enhances proinsulin processing in pancreatic β -cells via a PKA-dependent pathway. *Endocrinology* 155, 3817–3828.
- Watanabe, M., Hayasaki, H., Tamayama, T., and Shimada, M. (1998). Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Braz J Med Biol Res* 31, 243–256.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759–772.
- Westergaard, U.B., Sørensen, E.S., Hermey, G., Nielsen, M.S., Nykjær, A., Kirkegaard, K., Jacobsen, C., Gliemann, J., Madsen, P., and Petersen, C.M. (2004). Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain. *Journal of Biological Chemistry* 279, 50221–50229.
- Wiedmann, F., Rinné, S., Donner, B., Decher, N., Katus, H.A., and Schmidt, C. (2021). Mechanosensitive TREK-1 two-pore-domain potassium (K2P) channels in the cardiovascular system. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 159, 126–135.
- Williams, R., Karuranga, S., Malanda, B., Saeedi, P., Basit, A., Besançon, S., Bommer, C., Esteghamati, A., Ogurtsova, K., Zhang, P., et al. (2020). Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice* 162, 108072.
- Willnow, T.E., Petersen, C.M., and Nykjaer, A. (2008). VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* 9, 899–909.

- Wilson, C.M., Naves, T., Al Akhrass, H., Vincent, F., Melloni, B., Bonnaud, F., Lalloué, F., and Jauberteau, M.-O. (2016). A new role under sortilin's belt in cancer. *Commun Integr Biol* *9*, e1130192.
- Wu, Z., Martinez-Fong, D., Trédaniel, J., and Forgez, P. (2013). Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Front. Endocrin.* *3*.
- Yabe-Wada, T., Matsuba, S., Takeda, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Takai, T., Shi, H., Philpott, C.C., and Nakamura, A. (2016). TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. *Sci Rep* *6*, 26566.
- Yang, J. (2014). Enhanced Skeletal Muscle for Effective Glucose Homeostasis. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 133–163.
- Yang, M., Virassamy, B., Vijayaraj, S.L., Lim, Y., Saadipour, K., Wang, Y.-J., Han, Y.-C., Zhong, J.-H., Morales, C.R., and Zhou, X.-F. (2013). The Intracellular Domain of Sortilin Interacts with Amyloid Precursor Protein and Regulates Its Lysosomal and Lipid Raft Trafficking. *PLoS ONE* *8*, e63049.
- Yang, Y., Moghadam, A.A., Cordner, Z.A., Liang, N.-C., and Moran, T.H. (2014). Long Term Exendin-4 Treatment Reduces Food Intake and Body Weight and Alters Expression of Brain Homeostatic and Reward Markers. *Endocrinology* *155*, 3473–3483.
- Yang, Y., Choi, P.P., Smith, W.W., Xu, W., Ma, D., Cordner, Z.A., Liang, N.-C., and Moran, T.H. (2017). Exendin-4 reduces food intake via the PI3K/AKT signaling pathway in the hypothalamus. *Sci Rep* *7*, 6936.
- Yano, S., Tokumitsu, H., and Soderling, T.R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* *396*, 584–587.
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F.R., Butler, A.E., and Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol* *234*, 8152–8161.
- Yoshioka, N., Kuzuya, T., Matsuda, A., Taniguchi, M., and Iwamoto, Y. (1988). Serum proinsulin levels at fasting and after oral glucose load in patients with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* *31*, 355–360.
- Young, H.S., and Stokes, D.L. (2004). The Mechanics of Calcium Transport. *J. Membrane Biol.* *198*.
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., et al. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* *277*, 50230–50236.
- Yu, X., Murao, K., Sayo, Y., Imachi, H., Cao, W.M., Ohtsuka, S., Niimi, M., Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Wong, N.C.W., et al. (2004). The Role of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade in Glucose Upregulation of Insulin Gene Expression. *Diabetes* *53*, 1475–1481.

Zethelius, B., Byberg, L., Hales, C.N., Lithell, H., and Berne, C. (2003). Proinsulin and acute insulin response independently predict Type 2 diabetes mellitus in men—report from 27 years of follow-up study. *Diabetologia* 46, 20–26.

Zhou, L., Xiong, J., Lim, Y., Ruan, Y., Huang, C., Zhu, Y., Zhong, J., Xiao, Z., and Zhou, X.-F. (2013). Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord* 150, 776–784.

Zsürger, N., Mazella, J., and Vincent, J.-P. (1994). Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Research* 639, 245–252.