

## **Existe-t-il une voie vésiculaire de sécrétion du glucose ?**

### **Le foie et l'homéostasie du glucose**

En 1848, Claude Bernard publiait ses premières observations établissant le rôle du foie dans la production endogène de glucose. Il démontrait, dans les années suivantes, que le foie était également capable de stocker le glucose sous une forme, inconnue jusqu'alors, qu'il appelait glycogène, et que le glucose ainsi stocké pouvait réapparaître dans le sang lors du jeûne. Cela démontrait le rôle central du foie dans la régularisation des concentrations circulantes de glucose : il stocke le glucose en périodes absorbatives (après un repas) et le relâche dans le sang en périodes postabsorbatives ou lors d'un jeûne afin de prévenir le développement d'hypoglycémies [1].

Depuis, les mécanismes par lesquels le foie dégrade ou stocke le glucose sous forme de glycogène, ou par lesquels le glucose est relâché dans le sang à la suite de la dégradation du glycogène ou de sa synthèse *de novo*, ont été décrits en détail [2, 3]. Les enzymes contrôlant l'ensemble de ces réactions ont été caractérisées biochimiquement, la structure de leur gène a été identifiée et les régions promotrices des gènes de la plupart des enzymes-clés de ces voies métaboliques ont été analysées. La régulation de l'expression de ces gènes ou de l'activité de ces enzymes par les hormones, en particulier l'insuline et le glucagon, ont également été le sujet d'études extensives. Une description détaillée du métabolisme hépatique du glucose et de sa

régulation hormonale est justifiée non seulement par le rôle de cet organe dans l'homéostasie glucidique normale mais, également, parce qu'une augmentation de la production hépatique de glucose, échappant à l'inhibition par l'insuline, est une caractéristique du diabète non insulino-dépendant [4, 5]. Malgré l'ensemble de ces études, la dernière étape de la production de glucose, la sortie de glucose des hépatocytes dans l'espace sinusoidal, n'avait à ce jour jamais été complètement caractérisée. La présence dans la membrane plasmique d'un transporteur de glucose, GLUT2, avait été jugée suffisante pour rendre compte aussi bien du captage du glucose par les hépatocytes que de sa sortie dans le sang.

### **Les transporteurs de glucose**

Le glucose est utilisé comme source d'énergie et comme élément de base pour la synthèse de macromolécules par la plupart des cellules de l'organisme. Le captage de cette molécule polaire par la cellule nécessite la présence de protéines intégrales capables de faciliter sa diffusion à travers la membrane plasmique. Cinq transporteurs de glucose (GLUT) ont été décrits [6-8]. Ces protéines sont le produit de gènes différents et ont des caractéristiques particulières – localisation tissulaire et cellulaire, propriétés cinétiques (affinité pour le glucose) et régulation du niveau d'expression par le glucose ou les hormones, en particulier l'insuline –

qui sous-tendent leur spécificité dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Par exemple, GLUT1 est fortement exprimé dans les érythrocytes humains et les barrières hémato-tissulaires, dont la barrière hémato-encéphalique ; GLUT3 est le principal transporteur des neurones ; GLUT4 est présent spécifiquement dans les cellules dont l'activité de captage du glucose est stimulée par l'insuline : les muscles et le tissu adipeux ; GLUT5 est un transporteur de fructose présent principalement dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin.

### **Le transporteur GLUT2**

Ce transporteur se distingue des autres isoformes par ses propriétés cinétiques particulières. Alors que GLUT1, GLUT3 et GLUT4 sont des transporteurs de forte affinité ( $K_m$  pour le glucose de 1 à 5 mM), GLUT2 a une faible affinité pour le glucose ( $K_m$  de 17 mM) [9]. Cela indique que ce transporteur n'est pas saturé aux concentrations circulantes de glucose, normales ou même pathologiques (entre 5 et environ 20 mM glucose). Ce transporteur est exprimé dans la membrane basolatérale des cellules épithéliales de l'intestin et de la partie proximale contournée du néphron ; dans la membrane sinusoidale des hépatocytes et dans la membrane plasmique des cellules  $\beta$  insulinosécrétrices du pancréas [9]. Il a été également trouvé dans certains neurones de l'hypothalamus, en particu-

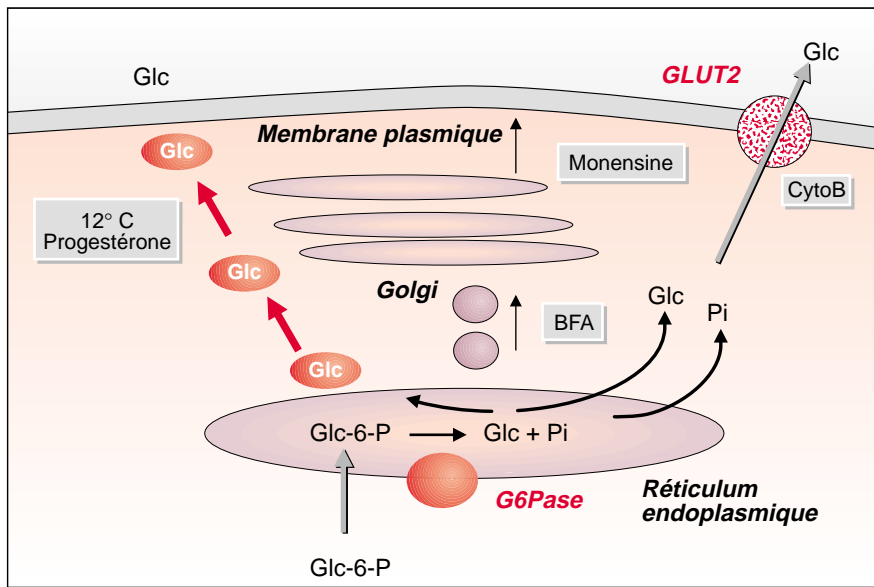


Figure 1. **Modèle des mécanismes de sécrétion de glucose par les hépatocytes.** Dans les conditions normales, le glucose-6-phosphate provenant de la gluconéogenèse ou de la dégradation du glycogène est transporté à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Après son hydrolyse, le glucose retourne vers le cytosol pour diffuser à l'extérieur de la cellule par l'intermédiaire de GLUT2. En l'absence de ce transporteur, il n'existe plus de diffusion facilitée de glucose à travers la membrane plasmique. Dans ces conditions, bien qu'une fraction du glucose s'accumule dans le cytosol, le glucose sort de la cellule uniquement par une voie de transport issue du RE. Cette voie de transport est bloquée par une baisse de la température et par la progestérone mais n'est pas sensible à la brefeldine A ou à la monensine qui bloquent, respectivement, le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi et le transport intra-Golgi. Dans les hépatocytes normaux, la sortie de glucose peut être inhibée par la cytochalasine B pour autant que la voie vésiculaire soit bloquée par incubation des cellules à 12 °C. Cela suggère que les deux voies de sécrétion de glucose sont présentes dans les hépatocytes normaux.

lier ceux présents dans la partie ventro-médiale [10, 11]. La localisation tissulaire et les propriétés cinétiques de GLUT2 suggèrent que ce transporteur joue un rôle majeur dans le transport transépithélial de glucose au niveau de l'intestin et du rein. Au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas, il permet un équilibre rapide du glucose entre les espaces extra et intracellulaires. Cela est nécessaire pour un accès rapide du glucose à la glucoquinase, l'enzyme de la glycolyse qui contrôle la réponse en fonction de la concentration de l'insulinosécrétion induite par le glucose [12]. Le rôle hypothalamique de GLUT2 n'est pas connu avec précision. Il pourrait cependant intervenir dans les mécanismes de détection du glucose par des neurones sensibles au glucose.

Au niveau du foie, la détection de GLUT2 dans la membrane sinusoidale a conduit à considérer que ce transporteur était nécessaire aussi bien au captage du glucose pendant les phases absorbatives, qu'à son relâchement dans le sang dans les périodes postprandiales ou au cours du jeûne. Cela paraissait d'autant plus logique qu'il avait été décrit que les propriétés de transport du glucose par GLUT2 étaient symétriques, c'est-à-dire que le  $K_m$  pour le transport du glucose à travers la membrane plasmique était le même dans le sens de l'entrée que dans celui de la sortie [13, 14].

#### Souris GLUT2 nullizygotés

Le rôle physiologique de GLUT2 a été évalué par l'étude de souris dont

le gène de ce transporteur a été inactivé [15]. L'absence de GLUT2 induit chez la souris un phénotype diabétique : hyperglycémie, hypoinsulinémie relative et concentrations plasmatiques élevées de glucagon, d'acides gras libres et de corps cétoniques. *In vitro*, des expériences de périfusion d'îlots montrent une suppression de la première phase de l'insulinosécrétion en réponse au glucose avec une deuxième phase préservée mais de faible amplitude. Ces souris meurent généralement au moment du sevrage. Cependant, le traitement par l'insuline permet aux souris de survivre et d'atteindre un poids presque normal, indiquant que le défaut sécrétoire des cellules  $\beta$ -pancréatiques est une cause principale de leur mort.

De façon surprenante ces souris nouveau-nées présentent une hyperglycémie couplée à une forte glycosurie, à un moment où leur nourriture, le lait maternel, est pauvre en glucides mais riche en lipides. Cela suggère que la production hépatique de glucose est très efficace bien que GLUT2, censé être responsable du relâchement de glucose, soit absent.

Pour comprendre ce paradoxe apparent, nous avons, dans un premier temps, évalué la capacité du foie à relâcher du glucose dans le sang. Cela a été fait de trois façons différentes [16]. 1) Nous avons montré que l'injection intrapéritonéale de glucagon chez ces animaux conduisait à une augmentation très rapide et prononcée de la glycémie, suggérant une mobilisation efficace des réserves hépatiques de glucose. 2) Nous avons montré que la production et le relâchement de glucose dans le milieu de culture par des hépatocytes isolés et cultivés uniquement en présence de lactate et pyruvate, des précurseurs gluconéogéniques, se faisait de façon quantitative similaire en présence et en l'absence de GLUT2. 3) Par des mesures *in vivo* de la production hépatique de glucose nous avons déterminé la vitesse de relâchement de glucose par le foie. Celle-ci est similaire dans le foie des souris normales et des souris déficientes en GLUT2.

Ces résultats pouvaient indiquer que d'autres transporteurs de glucose

étaient exprimés dans le foie pour remplacer fonctionnellement GLUT2. Cependant, aucun autre transporteur connu n'a pu être mis en évidence. En outre, la capacité de transport de glucose à travers la membrane plasmique d'hépatocytes isolés a été mesurée en utilisant le 3-O-méthyl-glucose, qui est un substrat pour tous les transporteurs de glucose connus, et qui n'est pas métabolisé dans la cellule. Ces expériences ont démontré qu'en absence de GLUT2, la vitesse de captage de 3-O-méthyl-glucose ou d'efflux après un préchargement des hépatocytes en substrat était diminuée de plus de 95 %. Dès lors comment le glucose peut-il sortir des hépatocytes de façon quantitativement normale ?

Le glucose produit par gluconéogenèse ou par dégradation du glycogène apparaît d'abord dans le cytosol sous forme de glucose-6-phosphate. L'hydrolyse de ce composé par la glucose-6-phosphatase a cependant lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) [17, 18]. Cela nécessite que le glucose-6-phosphate soit d'abord transporté dans cette organelle et, après hydrolyse, que le glucose engendré retourne dans le cytoplasme pour diffuser hors de la cellule par l'intermédiaire de GLUT2. Le réticulum endoplasmique est également le site de synthèse des protéines intégrales de toutes les membranes cellulaires, des protéines sécrétées et du cholestérol ; le transport de ces molécules vers leur destination finale s'opère par trafic vésiculaire. Dès lors, en absence de GLUT2, est-il possible que le glucose produit dans le RE sorte de la cellule par un mécanisme de transport vésiculaire similaire à celui utilisé par les protéines ? Ou à celui du cholestérol qui conduit à la membrane plasmique en évitant l'appareil de Golgi [19] ?

Pour répondre à ces questions, le glucose nouvellement synthétisé par des hépatocytes isolés a été marqué au  $^{14}\text{C}$  par incubation des cellules avec du pyruvate- $^{14}\text{C}$  [16]. Le glucose radioactif produit et restant à l'intérieur de la cellule ou étant sécrété peut, par la suite, être mesuré. Ce protocole de marquage biosynthétique nous a permis de démontrer qu'en l'absence de

GLUT2 la sortie de glucose pouvait être bloquée par une baisse de la température à 12 °C, condition qui bloque le trafic des vésicules membranaires mais pas la diffusion facilitée. D'autre part le transport en absence de GLUT2 n'était pas affecté par des inhibiteurs des voies classiques de transport intracellulaire des protéines du RE à la membrane plasmique, la brefeldine A et la monensine (*figure 1*). En revanche, la progestérone avait un profond effet inhibiteur. Cette substance a été décrite comme pouvant bloquer le transport du cholestérol nouvellement synthétisé, du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, par une voie de transport qui n'emprunte pas l'appareil de Golgi [20-22]. Le mécanisme d'inhibition du transport membranaire par la progestérone n'est pas connu avec précision. Il a toutefois été rapporté que cette substance peut interférer avec le mouvement des cavéoles qui sont des vésicules membranaires impliquées, entre autres, dans le transport vers la membrane plasmique du cholestérol nouvellement synthétisé dans le RE (*figure 1*). Nos expériences suggèrent par ailleurs que les deux mécanismes de sécrétion de glucose, vésiculaire et par diffusion facilitée par GLUT2, coexistent dans les hépatocytes normaux. En effet, lorsque le transport de glucose par GLUT2 est bloqué par la cytochalasine B, le glucose peut toujours sortir efficacement des hépatocytes lorsque les expériences sont conduites à 37 °C. En revanche, à 12 °C, lorsque la voie vésiculaire est bloquée, la sortie de glucose peut être inhibée par l'ajout de cytochalasine B.

L'ensemble de ces observations suggère, d'une part, que GLUT2 est nécessaire à l'entrée du glucose dans la cellule puisque, en l'absence de ce transporteur, le captage de glucose est presque totalement supprimé. En revanche, la sortie de glucose peut procéder de façon quantitativement normale. Quel peut être alors le rôle de GLUT2 lorsque le foie produit du glucose pour prévenir le développement d'hypoglycémie ?

En l'absence de GLUT2, le glucose engendré dans le réticulum endoplasmique sort par la voie vésiculaire

mais une partie retourne également dans le cytosol où sa concentration augmente et où il peut à nouveau être phosphorylé en glucose-6-phosphate. La concentration cytosolique de ces deux substrats a un effet important sur le métabolisme hépatique du glucose. En effet, le glucose-6-phosphate est un activateur allostérique de la glycogène synthase et le glucose un inhibiteur allostérique de la glucose phosphorylase [23], les enzymes-clés, respectivement, de la synthèse et de la dégradation du glycogène. On peut donc prédire que si le glucose ne peut pas sortir librement du cytosol, on assistera à une augmentation de la synthèse de glycogène ou au moins à une inhibition de sa dégradation. C'est en effet ce qui est observé chez les souris nullizygotés pour GLUT2: la concentration de glycogène à l'état nourri est très élevée par rapport aux témoins et un jeûne prolongé est incapable de conduire à la suppression des stocks de glycogène.

Le rôle de GLUT2 apparaît donc essentiel lors des périodes de jeûne pour éviter une augmentation des concentrations intracytosoliques de glucose et de glucose-6-phosphate qui conduisent à une augmentation du glycogène intracellulaire, un effet opposé à celui que les concentrations plasmatiques d'hormones devraient stimuler. En effet, lors du jeûne, le rapport des concentrations circulantes de glucagon et d'insuline augmente pour stimuler la dégradation du glycogène hépatique en inhibant la glycogène synthase et en stimulant la glycogène phosphorylase. Pour permettre la régulation du métabolisme du glycogène par les hormones, c'est-à-dire en réponse aux changements de l'homéostasie glucidique de l'organisme, le glucose intracellulaire doit être en équilibre avec le glucose sanguin. Si ce n'est pas le cas, comme lors de l'absence de GLUT2, le métabolisme du glycogène est alors contrôlé par l'état énergétique intracellulaire. Cela suggère que les contrôles allostériques des enzymes impliquées prédominent sur les contrôles hormonaux.

Ce nouveau mécanisme de sécrétion du glucose par le foie, bien que soupçonné précédemment, n'a pu être

mis en évidence que grâce à l'établissement de souris nullizygotés pour *GLUT2*. Il reste encore beaucoup à apprendre sur les mécanismes moléculaires contrôlant ce transport vésiculaire de glucose et sur leur régulation hormonale éventuelle, en particulier par le glucagon et l'insuline. Par ailleurs, puisque l'entrée directe de glucose dans les hépatocytes semble être supprimée en l'absence de *GLUT2*, ces souris fournissent un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes de régulation génique par le glucose et pour étudier le rôle de *GLUT2* dans ces contrôles physiologiques. Enfin, puisque le diabète non-insulinodépendant est caractérisé par une production hépatique de glucose exagérée, une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait avoir des implications dans le traitement de cette maladie ■

## RÉFÉRENCES

1. Grmek MD. *Le legs de Claude Bernard*. Paris : Fayard, 1997.
2. Pilkis SJ, el-Maghrabi MR, Claus TH. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 755-83.
3. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 885-909.
4. DeFronzo RA. The triumvirate:  $\beta$ -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 667-87.
5. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 1992; 15: 318-68.
6. Thorens B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* 1996; 270: G541-53.
7. Guerre-Millo M. Les transporteurs d'hexoses. *Med Sci* 1995; 11: 1111-9.
8. Mueckler M. Glucose transport and glucose homeostasis: new insights from transgenic mice. *News Physiol Sci* 1995; 10: 22-9.
9. Thorens B. Molecular and cellular physiology of *GLUT2*, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 1992; 137A: 209-38.
10. Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferré P, Pénicaud L. Glucose transporter 2 (*GLUT2*): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 1994; 638: 221-6.
11. Navarro M, Rodriguez de Fonseca F, Alvarez E, Chowen JA, Zueco JA, Gomez R, Eng J, Blazquez E. Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter *GLUT2*, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonist as an inhibitory signal for food and water intake. *J Neurochem* 1996; 67: 1982-91.
12. Matschinsky FM. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase sensor paradigm. *Diabetes* 1996; 45: 223-41.
13. Craik JD, Elliott KRF. Kinetics of 3-O-methyl-D-glucose transport in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1979; 182: 503-8.
14. Ciaraldi TP, Horuk R, Matthaei S. Biochemical and functional characterization of the rat liver glucose transport system. *Biochem J* 1986; 240: 115-23.
15. Guillam MT, Hümmeler E, Schaerer E, Yeh JY, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Dériaz N, Thorens B. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking *GLUT2*. *Nat Genet* 1997; 17: 327-30.
16. Guillam MT, Burcelin R, Thorens B. Normal hepatic glucose production in the absence of *GLUT2* reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12317-21.
17. Mithieux G. New knowledge regarding glucose-6-phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 137-45.
18. Shelly LL, Lei K-J, Pan C-J, Sakata SF, Ruppert S, Schutz G, Chou JY. Isolation of the gene for murine glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. *J Biol Chem* 1993; 268: 21482-5.
19. Urbani L, Simoni RD. Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1990; 265: 1919-23.
20. Smart EJ, Ying Y-S, Donzell WC, Anderson RGW. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 1996; 271: 29427-35.
21. Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane is constitutive in CaCo-2 cells and differs from the transport of plasma membrane cholesterol to the endoplasmic reticulum. *J Lip Res* 1998; 39: 333-43.
22. Metherall JE, Waugh K, Li H. Progesterone inhibits cholesterol biosynthesis in cultured cells. Accumulation of cholesterol precursors. *J Biol Chem* 1996; 271: 2627-33.
23. Carabaza A, Ciudad CJ, Baque S, Guinovart JJ. Glucose has to be phosphorylated to activate glycogen synthase, but not to inactivate glycogen phosphorylase in hepatocytes. *FEBS Lett* 1992; 296: 211-4.

### Bernard Thorens

Professeur associé.

### Marie-Thérèse Guillam

Assistante de recherche.

### Rémy Burcelin

Maître assistant.

Institut de pharmacologie et toxicologie, Université de Lausanne, 27, rue du Bugnon, 1005 Lausanne, Suisse.

### TIRÉS À PART

B. Thorens.