

Université de Montréal

**Rôle de GAS6 et de son récepteur AXL
dans la dérégulation de l'homéostasie glucidique
et le développement de l'insulino-résistance**

Par

Céline Schott

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Biologie Moléculaire

option Médecine Cellulaire et Moléculaire

Avril 2023

© Schott, 2023

Université de Montréal

Programme de Biologie Moléculaire /Faculté de Médecine

Institut de Recherches Cliniques de Montréal

Cette thèse intitulée

**Rôle de GAS6 et de son récepteur AXL
dans la dérégulation de l'homéostasie glucidique
et le développement de l'insulino-résistance**

Présentée par

Céline Schott

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Geneviève Deblois

Président-rapporteur

Mathieu Ferron

Directeur de recherche

Jean-François Côté

Codirecteur

Laura Hulea

Membre du jury

André Marette

Examineur externe

Résumé

Les maladies métaboliques ont pris une ampleur considérable dans le monde ces dernières décennies, telle que certains parlent à ce jour de pandémie. Le diabète de type 2 est l'une de celles qui progressent avec la plus importante prévalence. L'un des facteurs à l'origine du développement de cette physiopathologie est l'insulino-résistance. Il s'agit d'une altération de la réponse à l'insuline des tissus cibles tels que le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie, induisant une dérégulation de l'homéostasie du glucose. Les tissus sensibles deviennent incapables, entre autres, d'absorber adéquatement le glucose sanguin conduisant ainsi à l'établissement d'une hyperglycémie chronique.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif de caractériser le rôle de la protéine *Growth-arrest specific 6* (GAS6) dans la dérégulation de l'équilibre glycémique et le développement de la résistance à l'insuline.

GAS6 est une protéine γ -carboxylée sécrétée qui agit comme ligand pour la famille des récepteurs tyrosines kinases TAM comprenant : TYRO3, AXL et MERTK. GAS6 et ses récepteurs jouent un rôle essentiel dans le système immunitaire, la progression tumorale et les métastases cancéreuses. Cependant, des études récentes menées chez l'humain ont montré que les niveaux circulants de GAS6 ou des variations dans le gène *GAS6* sont associés à l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et le risque de développer le diabète de type 2. Cependant, le mécanisme par lequel GAS6 influence ces désordres métaboliques reste méconnu.

Dans une première étude, nous avons évalué, pour la première fois dans une cohorte de femmes canadiennes, la corrélation éventuelle entre les niveaux circulants de GAS6 et des facteurs de risque liés au diabète. Cette cohorte nommée MONET (*Montréal and Ottawa New Emerging Team*) est constituée de 126 femmes post-ménopausées, en surpoids ou obèses. Ces femmes ne sont pas diabétiques, mais présentent un risque plus élevé de développer la maladie à cause de leur poids et de leur statut sédentaire. Nous avons constaté que les femmes ayant des taux élevés de GAS6 dans le sang ont une tolérance au glucose significativement plus faible que celles avec des niveaux plus faibles de GAS6. Par ailleurs, certains paramètres de dysfonctionnements

hépatiques (AST, ALT) et des marqueurs d'inflammation (IL-6) concordent positivement avec des taux élevés de GAS6. Nos résultats suggèrent que GAS6 pourrait être un biomarqueur de l'intolérance au glucose chez des patientes obèses et qu'il pourrait être associé à l'inflammation et à certains problèmes hépatiques, qui sont des facteurs impliqués dans le développement du diabète.

Dans une seconde étude, à l'aide de modèles murins modifiés génétiquement, nous avons pu démontrer que la délétion du gène *Gas6* est suffisante pour améliorer la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, sans affecter la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, les souris déficientes pour GAS6 sont protégées contre la résistance à l'insuline induite par un régime alimentaire riche en graisses et en sucres. À l'inverse, l'augmentation *in vivo* des taux circulants de GAS6 est suffisante pour réduire la sensibilité à l'insuline. L'analyse de l'expression génique des récepteurs TAM dans les tissus sensibles à l'insuline a révélé qu'*Axl* est fortement exprimé dans le muscle squelettique. Dans une lignée de cellules musculaires, nous avons démontré que la voie de signalisation de GAS6-AXL affecte la réponse à l'insuline en inhibant la phosphorylation du récepteur de l'insuline (RI) et de son effecteur en aval AKT. Mécaniquement, AXL s'hétérodimérise avec le RI et GAS6 reprogramme les voies de signalisation en aval du RI dans les cellules musculaires. Il en résulte une activation accrue de la voie des Rab, notamment Rab7 induisant une internalisation de RI. Ensemble, ces résultats décrivent le mécanisme cellulaire par lequel GAS6 et AXL influencent la sensibilité à l'insuline.

Finalement, nos derniers résultats soulignent un autre mécanisme d'action de GAS6 sur le métabolisme des cellules musculaires. Nous avons démontré, par protéomique, que GAS6 augmente significativement les niveaux protéiques de plusieurs enzymes impliquées dans la glycolyse et la production de lactate. Le profil métabolique des cellules musculaires traitées avec GAS6 démontre une augmentation du niveau de la glycolyse anaérobie et de la production de lactate. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que le lactate lui-même induit une inhibition de la phosphorylation du RI en réponse à l'insuline. Ainsi, GAS6, en reprogrammant les voies métaboliques et l'utilisation du glucose des cellules musculaires, favoriserait la production de lactate induisant une diminution de la sensibilité à l'insuline.

Mots-clés : GAS6, AXL, intolérance au glucose, insulino-résistance, glycolyse.

Abstract

Metabolic diseases have taken on a considerable scale in the world in recent decades, such that some speak of a pandemic. Type 2 diabetes is one of those diseases that progress with the highest prevalence. One of the factors behind the development of this pathophysiology is insulin resistance. It is an alteration of the insulin response of targeted tissues such as skeletal muscle, adipose tissue and liver, inducing dysregulation of glucose homeostasis. Sensitive tissues become incapable, among other things, of adequately absorbing blood glucose, thus leading to the establishment of chronic hyperglycemia.

The work presented in this thesis focuses on characterizing the role of Growth-arrest specific protein 6 (GAS6) in the dysregulation of glycemic balance and the development of insulin resistance. GAS6 is a secreted γ -carboxylated protein that acts as a ligand for the TAM family of receptor tyrosine kinases including: TYRO3, AXL and MERTK. GAS6 and its receptors play an essential role in the immune system, tumor progression and cancer metastasis. However, recent studies in humans have shown that circulating GAS6 levels or variations in *GAS6* gene are associated with hyperglycemia, insulin resistance and the risk of developing type 2 diabetes. However, the mechanism by which GAS6 influences these metabolic disorders remains unknown.

In a first study, carried out for the first time in a cohort of Canadian women, we evaluated the potential correlation between circulating GAS6 levels and risk factors linked to diabetes. This cohort, named MONET (Montreal and Ottawa New Emerging Team), is composed of 126 post-menopausal, overweight or obese women. These women are not diabetic but have high risks of developing the disease because of their weight and sedentary status. We found that women with high levels of GAS6 in the blood have significantly lower glucose tolerance than those with lower levels of GAS6. In addition, certain liver dysfunction parameters (AST, ALT) and inflammation markers (IL-6) positively correlated with high levels of GAS6. Our results suggest that GAS6 could be a biomarker of glucose intolerance in obese patients and be associated with inflammation and certain liver problems, which are factors involved in the development of diabetes.

In a second study, using genetically modified mouse models, we were able to demonstrate that deletion of the *Gas6* gene was sufficient to improve insulin sensitivity and glucose tolerance, without affecting insulin secretion. Furthermore, GAS6-deficient mice were protected against insulin resistance induced by a diet high in fats and sugars. Conversely, *in vivo*, increase of GAS6 circulating levels is sufficient to reduce insulin sensitivity. Analysis of TAM receptors gene expression in insulin-responsive tissues revealed that *Axl* is highly expressed in skeletal muscle. In a muscle cell line, we demonstrated that the GAS6-AXL signaling pathway affects the insulin response by inhibiting the phosphorylation of the insulin receptor (IR) and its downstream effector AKT. Mechanistically, AXL heterodimerizes with IR and GAS6 reprograms signaling pathways downstream of IR in muscle cells. This results in an increased activation of the Rab pathway, in particular Rab7, inducing an internalization of IR. Together, these results describe the cellular mechanism by which GAS6 and AXL influence insulin sensitivity.

Finally, our latest results highlight another mechanism of action of GAS6 on muscle cell metabolism. We demonstrated by proteomics that GAS6 significantly increases the protein levels of several enzymes involved in glycolysis and lactate production. The metabolic profile of muscle cells treated with GAS6 demonstrates an increase in the level of anaerobic glycolysis and lactate production. Furthermore, our results suggest that lactate itself induces an inhibition of IR phosphorylation in response to insulin. Thus, GAS6, by reprogramming the metabolic pathways and the use of glucose in muscle cells, would promote lactate production inducing a decrease in insulin sensitivity.

Key words: GAS6, AXL, glucose intolerance, insulin resistance, glycolysis.

Préface

Cette thèse a été rédigée sous un format hybride, composée de deux articles scientifiques en préparation pour soumission ainsi qu'un chapitre sur les derniers résultats obtenus.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Le chapitre d'introduction présente les fondamentaux de la régulation du métabolisme glucidique dans un contexte physiologique et pathologique. Il souligne l'importance de mieux comprendre le mécanisme de développement de la résistance à l'insuline qui participe à l'apparition du diabète de type 2. Nous nous intéressons particulièrement à la protéine sécrétée GAS6 et son récepteur AXL ainsi que de leur implication dans le processus d'insulino-résistance musculaire.

CHAPITRE 2: PREMIER ARTICLE

Association between circulating GAS6 levels and glucose intolerance in overweight and obese postmenopausal women: a MONET study

Schott C, Rabasa-Lhoret R, Ferron M.

Ce chapitre expose les données récoltées au sein d'une cohorte de femmes canadiennes post-ménopausées en surpoids ou obèses. Cette étude humaine a permis de mettre en évidence des corrélations positives entre des niveaux élevés de GAS6 dans le sang et l'intolérance au glucose ainsi que des facteurs inflammatoires. Ce chapitre est écrit sous la forme d'un manuscrit actuellement en préparation pour soumission.

CHAPITRE 3: SECOND ARTICLE

GAS6 regulates glucose metabolism by inhibiting insulin receptor signaling

Schott C, Germain A, Lacombe J, Faubert D, Boulais J, Côté JF, Ferron M.

Ce chapitre porte sur le rôle de la protéine GAS6 dans l'homéostasie glucidique et le développement de la résistance à l'insuline. Nos résultats montrent que GAS6 affecte *in vivo* la sensibilité à l'insuline et *in vitro* que GAS6, via son récepteur AXL, inhibe et reprogramme la voie de signalisation de l'insuline dans les cellules musculaires. Cette partie de thèse est rédigée sous

la forme d'un article scientifique actuellement en préparation pour soumission dans le *Journal of Cell Biology*.

CHAPITRE 4 : GAS6 FAVORISE LE METABOLISME LACTIQUE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES

Ce chapitre présente des données préliminaires démontrant que GAS6 et AXL altèrent le métabolisme glucidique des cellules musculaires en augmentant l'expression des enzymes glycolytiques et leur capacité glycolytique. Ces changements entraînent des niveaux plus élevés de lactate pouvant induire une inhibition de la réponse à l'insuline par ces cellules.

Articles scientifiques

Au cours de mon doctorat, mon projet de recherche a mené à la réalisation de deux articles scientifiques de recherche, prochainement soumis, qui seront présentés dans cette thèse. J'ai eu l'immense chance et opportunité de collaborer sur plusieurs études de recherche. Ces collaborations ont conduit à la publication de plusieurs articles.

L'ensemble de ces articles est résumé dans la liste suivante :

***Association between GAS6 circulating levels and glucose intolerance in overweight and obese postmenopausal women: a MONET study**

Schott C, Rabasa-Lhoret R, **Ferron M**.

En préparation pour soumission

***GAS6 regulates glucose metabolism by inhibiting insulin receptor signaling**

Schott C, Germain A, Lacombe J, Faubert D, Boulais J, **Côté JF**, **Ferron M**.

En préparation pour soumission à Journal of Cell Biology

AXL confers cell migration and invasion by hijacking a PEAK1-regulated focal adhesion protein network.

Abu-Thuraia A, Goyette MA, Boulais J, Delliaux C, Apcher C, **Schott C**, Chidiac R, Bagci H, Thibault MP, Davidson D, **Ferron M**, Veillette A, Daly RJ, Gingras AC, Gratton JP, **Côté JF**.

Nature Communications. 2020 Jul 17;11(1):3586. doi: 10.1038/s41467-020-17415-x.

Targeting bone cells during sexual maturation reveals sexually dimorphic regulation of endochondral ossification.

Fairfield H, Costa S, DeMambro V, **Schott C**, Martins JDS, **Ferron M**, Vary C, Reagan MR.

Journal of Bone and Mineral Research Plus. 2020 Oct 14;4(11):e10413. doi: 10.1002/jbm4.10413.

Gain-of-function of Lrp5 mutation improves bone mass and strength and delays hyperglycemia in a mouse model of insulin-deficient diabetes.

Leanza G, Fontana F, Lee SY, Remedi MS, **Schott C**, **Ferron M**, Hamilton-Hall M, Alippe Y, Strollo R, Napoli N, Civitelli R.

Journal of Bone and Mineral Research. 2021 Jul;36(7):1403-1415. doi: 10.1002/jbmr.4303.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	5
Préface.....	7
Articles scientifiques	9
Table des matières.....	10
Liste des tableaux	15
Liste des figures.....	16
Liste des sigles et abréviations.....	18
Remerciements	25
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	27
I- Diabète, homéostasie glucidique et dysfonctionnements de l'insuline.....	28
A. Diabètes.....	28
1. Diabète de type 1	29
2. Diabète de type 2	30
B. Régulation de l'homéostasie glucidique	34
1. Homéostasie glucidique	34
2. Régulation par le système endocrinien pancréatique	35
a) Le glucagon : une hormone hyperglycémiante.....	35
b) L'insuline : la seule hormone hypoglycémiante.....	36
3. Le transport du glucose.....	40
4. Le métabolisme glucidique : le devenir du glucose	42
a) Condition post-prandiale.....	42

1. Séquestration du glucose intracellulaire.....	42
2. Utilisation du glucose.....	43
2.1. Glycolyse	43
2.2. Cycle de Krebs.....	47
2.3. Phosphorylation oxydative	49
2.4. Production de lactate	51
3. Mise en réserve.....	52
3.1. Glycogénogenèse : stockage du glycogène	52
3.2. Lipogenèse de novo : stockage des triglycérides	53
b) Condition de jeûne	54
1. Utilisation des réserves	54
1.1. Glycogénolyse.....	54
1.2. Lipolyse	56
2. Production de glucose endogène.....	56
2.1. Néoglucogenèse.....	56
C. Dysfonctionnements de l'insuline.....	59
1. Hyperinsulinémie et résistance à l'insuline.....	59
2. Résistance à l'insuline : constituante clé du DT2	63
II- Voies de signalisation de l'insuline (conditions normales ou dérégulées)	65
A. Récepteur à l'insuline.....	65
B. Voies principales en aval du Récepteur à l'insuline	67
1. Substrats du Récepteur à l'insuline (IRS)	67
2. Voie PI3K-AKT et cascades de signalisation dépendantes	68
a) Initiation de la voie : PI3K-AKT	68

b)	Translocation du transporteur de glucose GLUT4.....	70
c)	Voie mTORC1 : synthèse protéique et contrôle lipidique.....	71
d)	Induction de la glycogénèse et inhibition de la néoglucogénèse et de la lipolyse	72
1.	Stimulation de la glycogénèse.....	72
2.	Inhibition de la néoglucogénèse	73
3.	Inhibition de la lipolyse	73
3.	Voie MAPK/ERK.....	73
4.	Modulateurs négatifs de la signalisation du RI et développement de la résistance à l'insuline	74
a)	Internalisation et trafic du Récepteur à l'insuline.....	75
b)	Mécanismes de déphosphorylation : implication des phosphatases	78
c)	Phosphorylations inhibitrices de IRS-1 : implication de sérine/thréonine kinases	79
d)	Autres modulateurs.....	81
III-	Growth arrest-specific 6 (GAS6) et les récepteurs TAM.....	83
A.	GAS6	83
1.	Structure.....	83
2.	Protéine dépendante de la vitamine K : γ -carboxylation.....	83
B.	Les récepteurs TAM.....	84
1.	Structure des TAM et ligands	84
2.	Activation des TAM	84
3.	Expression tissulaire des TAM.....	85
C.	Fonctions pléiotropiques de GAS6 et des récepteurs TAM	87
D.	Rôle potentiel de GAS6 et AXL dans le métabolisme.....	90

1. Obésité et inflammation	90
2. Insulinorésistance et diabète	91
Hypothèse de recherche	92
CHAPITRE 2 : PREMIER ARTICLE	93
ABSTRACT	95
INTRODUCTION	96
MATERIAL AND METHODS	98
RESULTS	101
DISCUSSION	107
ACKNOWLEDGEMENTS	110
AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	110
REFERENCES	111
CHAPITRE 3 : SECOND ARTICLE	114
ABSTRACT	116
INTRODUCTION	117
RESULTS	120
DISCUSSION	149
ACKNOWLEDGEMENTS	153
AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	153
MATERIALS AND METHODS	154
REFERENCES	163
SUPPLEMENTALS	168
CHAPITRE 4 : GAS6 FAVORISE LE METABOLISME LACTIQUE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES.....	175

RÉSUMÉ.....	176
INTRODUCTION.....	177
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	178
RÉSULTATS.....	182
DISCUSSION.....	192
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	195
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	196
ANNEXES	227

Liste des tableaux

CHAPITRE 2 : PREMIER ARTICLE

Table 1. Anthropometric and metabolic characteristics of the 126 overweight and obese postmenopausal women.	101
Table 2. Association of serum GAS6 levels with physical and adiposity characteristics among the MONET cohort.....	102
Table 3. Pearson’s correlation coefficients between serum GAS6 levels with lipid profile, liver enzymes and inflammation among overweight and obese postmenopausal women.....	104
Table 4. Correlation between circulating GAS6 levels and OGTT data in the MONET cohort. ...	105

CHAPITRE 3 : SECOND ARTICLE

Supplemental Table 1	173
Supplemental Table 2	174

Liste des figures

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1. Balance énergétique et homéostasie glucidique.....	39
Figure 2. Voies métaboliques de la glycolyse et de la néoglucogénèse.	46
Figure 3. Cycle de Krebs.	48
Figure 4. Chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie.....	50
Figure 5. Différences de modèles représentatifs de l'apparition de l'hyperinsulinémie et de la résistance à l'insuline responsables du développement du diabète de type 2.....	62
Figure 6. Voies de signalisation du récepteur à l'insuline.	82
Figure 7. Représentation schématique de GAS6 et de ses récepteurs TAM.....	86

CHAPITRE 2 : PREMIER ARTICLE

Figure 1. High levels of circulating GAS6 levels in overweight and obese postmenopausal women correlate with glucose intolerance.	106
---	-----

CHAPITRE 3 : SECOND ARTICLE

Figure 1. GAS6 deficiency improves glucose tolerance and insulin sensitivity in FVB/N and C57BL/6J mice under normal diet.	123
Figure 2. GAS6 deficiency protects from High-Fat/High-Sucrose diet-induced insulin resistance independently of body weight in mice.	126
Figure 3. Increasing GAS6 circulating levels reduces insulin sensitivity.	129
Figure 4. GAS6 can activate AXL receptor in muscle cells.	132
Figure 5. Crosstalk between AXL and Insulin Receptor signaling pathways.....	135
Figure 6. GAS6 regulates the insulin-dependent phosphoproteome in muscle cells.	139
Figure 7. GAS6 reprograms signaling pathways in response to insulin in muscle cells.....	143

Figure 8. AXL signaling increases insulin receptor endocytosis in response to insulin.	146
Figure 9. AXL signaling increases insulin receptor endocytosis trafficking to the late-endosomes in response to insulin	148
Figure S1. GAS6 deficiency does not affect energy expenditure, food intake or gluconeogenesis.	168
Figure S2. GAS6 deficiency does not protect against inflammation induced by High-Fat/High-Sucrose diet.....	169
Figure S3. No change in glucose tolerance in transgenic ApoE-Gas6Tg mice	170
Figure S4. GAS6 affects insulin signaling and GLUT4 translocation in muscle cells.	171
Figure S5. Transcriptional changes and Insulin Receptor protein level in skeletal muscle of GAS6-deficient mice.....	172

CHAPITRE 4 : GAS6 FAVORISE LE METABOLISME LACTIQUE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES

Figure 1. GAS6 augmente l'expression des enzymes impliquées dans la glycolyse dans les cellules musculaires.....	184
Figure 2. GAS6 augmente la capacité glycolytique des cellules musculaires.	187
Figure 3. GAS6 impacte la voie de signalisation de l'insuline en augmentant les niveaux de lactate.	191

Liste des sigles et abréviations

ACC : Acétyl-CoA-carboxylase

Acetyl-CoA : Acetyl-Coenzyme A

ACLY : ATP-citrate lyase

ADP: Adénosine DiPhosphate

AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique

AS160: AKT substrate of 160 kDa

ATGL: *Adipose triglyceride lipase/ lipase triglycéride adipeuse*

ATP: Adénosine TriPhosphate

BUBR1: *Mitotic checkpoint kinase BUB1 beta*

CDC20: *Cell Division Cycle protein 20 homolog*

CEACAM: *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*

CLASP: *Clathrin-associated sorting protein*

CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*

DEPTOR: *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

eEF2: *Eukaryotic elongation factor-2 kinase*

EGF: *Epidermal growth factor*

eIF4E: *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

ELMO: *Engulfment and Cell Motility*

ELK1: *ETS Like-1*

ELOVL: *Elongation of very long chain fatty acids protein*

ERK: *Extracellular signal-regulated kinases*

FADH2: flavine adénine dinucleotide

FNIII: Fibronectine de type III

GAD65 : enzyme acide glutamique décarboxylase de 65-kDa

GAP: *GTPase-Activating Protein*

GAS6: *Growth arrest-specific 6*

GEF: *Guanine nucleotide Exchange Factor*

GGCX: γ (gamma)-glutamyl carboxylase

Gla: Acide gamma-carboxyglutamique

Glu: Acide glutamique

GLUT: *GLUcose Transporters*

GLP-1/2: *Glucagon-like peptide-1/2*

GnRH : Cellules neuronales sécrétant l'hormone gonadotrophine

GRB2: *Growth factor Receptor-Bound protein 2*

GSK3: *Glycogen synthase kinase 3*

GTP: Guanosine triphosphate

GWAS : *genome-wide association study* /association pangénomique de grande envergure

HbA1c: Hémoglobine glyquée

HGPO : Hyperglycémie provoquée par voie orale

HLA : *Human Leucocyte Antigen*

HSL: *Hormone-Sensitive Lipase/ lipase hormono-sensible*

IDDM2 : *Insulin-dependent diabetes mellitus 2*

Ig: *Immunoglobuline*

IGF-1 et 2: *Insulin-like growth factor 1 et 2*

IKK: *Inhibitor of nuclear factor κ B kinase*

IL-1 β : *Interleukin-1 β*

IL-6: *Interleukin-6*

IL2RA : *Interleukin-2 receptor alpha*

IMC: *Indice de Masse Corporelle*

INSIG: *Insulin-induced gene*

IRS : *Insulin receptor substrate /substrat du récepteur à l'insuline*

JAK: *Janus Kinase*

JNK: *c-Jun terminal kinase*

KO: *Knock-out*

LAR: *Leukocyte common antigen related*

LDH: *Lactate déshydrogénase*

LG : *lamine G*

MAD2: *Mitotic Arrest Deficient 2*

MAL: *MyD88 adaptor-like*

MAP: *Protéine associée aux microtubules*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MGL: Monoacylglyc rol lipase

mLST8: mammalian lethal with SEC13 protein 8

MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*

mTORC: mammalian Target Of Rapamycin Complex

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide

NK: Natural Killer

PDE3B: Phosphodiesterase 3B

PDK1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1

PEPCK: Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK1/2: Phosphofructokinase 1/2

PGC-1: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1

PH : *Pleckstrin Homology*/ Homologie de la Pleckstrine

PHLPP: *PH domain and Leucine rich repeat PP*

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PK: Pyruvate kinase

PKC: *Protein kinase C*

PP : Protéines phosphatases

PRAS40: Proline-rich Akt substrate of 40 kDa

PROS: Protéine S

PTB : *Phosphotyrosine binding domains* / domaines de liaison à la phosphotyrosine

PtdSer: Phosphatidylserines

PTEN: *Phosphatase and Tensin Homolog*

PTP: Protéines tyrosine phosphatases

PTPN22: Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22

p70S6K: *Ribosomal protein S6-kinase 1*

RAPTOR: *Regulatory Associate Protein of mTOR*

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

RHEB: *Ras homolog enriched in brain*

RI ou IR: Récepteur à l'insuline/ *Insulin Receptor*

SCAP: *SREBP cleavage activating protein*

SCD1: Stearoyl-CoA désaturase 1

SHBG: *Steroid hormone-binding globulin*

SHC: *Src homology/collagen*

SHIP2: *SH2-containing 5'-inositol phosphatase 2*

SHP2: *SH2 domain protein tyrosine phosphatase 2*

SH2: *Src Homology 2/ homologie Src 2*

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*

SNP: *Single-nucleotide polymorphism/ polymorphismes mononucléotidiques*

SOCS: *Suppressor of cytokine signaling*

SOS: *Son of Sevenless*

SREBP-1c: *Sterol regulatory element binding protein*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

TAM: TYRO3/AXL/MERTK

TBC1D: *TBC1 domain family member*

TNF α : *Tumour Necrosis Factor alpha*

TRAF: *TNF receptor associated factor*

TSC: *Tuberous Sclerosis Complex*

UDP: Uridine DiPhosphate

VK: Vitamine K

VKORC1: sous-unité 1 du complexe de la vitamine K époxyde réductase

VLDL: *Very Low-Density Lipoprotein*

ZnT8A: protéine de transport du zinc 8

4E-BP1: *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

*A ma famille,
A mon grand-père*

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr Mathieu Ferron, de m'avoir acceptée dans son laboratoire pour devenir sa seconde étudiante au doctorat. Je te remercie de m'avoir partagé ta passion inestimable pour la recherche et ton enthousiasme constant pour la science. Quand je suis arrivée dans le laboratoire, j'étais toute jeune, tu as bien entendu contribué à mon développement scientifique et professionnel mais aussi grandement personnel. Le doctorat est souvent synonyme de diplôme et formation scientifique mais je retiendrais surtout qu'il s'agit d'un apprentissage de vie duquel je ressors grandie et plus forte grâce à toi.

J'aimerais également remercier mon co-directeur de thèse, le Dr Jean-François Côté. Je te remercie de m'avoir encouragé à aller au-delà de la paillasse pour explorer d'autres horizons. Sans le savoir tu m'as amené à découvrir de nouvelles passions comme les communications scientifiques et la philanthropie, ce à quoi, je n'avais jamais songé. Tes encouragements m'ont permis de prendre confiance en moi et d'accepter de saisir les opportunités qui s'offraient à moi.

Je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de participer à l'évaluation de mes travaux Dre Geneviève Deblois, Dre Laura Hulea et Dr André Marette.

Je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du laboratoire. Merci Julie, pour ton aide, ta pédagogie et tes conseils précieux au quotidien. Kevin, Shayesteh et Omar, je vous remercie d'avoir été des soutiens inestimables le long de ma thèse, je suis heureuse de pouvoir vous compter parmi mes amis.

Je remercie tous mes amis de l'IRCM. Islam, merci pour ta bienveillance, ton calme et ton amitié. Merci pour nos promenades, nos discussions passionnées sur nos cultures, nos pays et notre vision du monde. Lok San, tu n'as pas idée de ma reconnaissance éternelle pour ton aide ces derniers mois, pour ta patience et surtout de ne m'avoir jamais lâchée. Les mots ne seront jamais suffisants pour exprimer ma gratitude, tu es un ami en or, j'espère que tu le sais. Djamouna, merci pour nos conversations toujours aussi drôles, merci pour ta légèreté et ta fraîcheur.

Je voudrais aussi remercier mes amis du Canada. Marine, tu as été ma partenaire de route, je retiens bien sûr nos voyages incroyables mais surtout ton soutien, ta douceur, ta bonté que je te considère comme la grande sœur que je n'ai pas eue. Marion et Guillaume, merci pour votre générosité sans limite, notre trio est unique, vous avez été ma deuxième famille ici au Canada.

Je remercie mes amis de France, la Team, plus de quinze ans d'amitié qui durent avec 6000 km qui nous séparent et rien ne change entre nous, ça n'a pas de prix. Merci à vous les filles, Amélie et Alexandra, merci de nos fous rires, de nos danses, de votre bonne humeur et votre amour de vivre. Merci aux garçons Maxime, Titouan, Thomas et Vincent, toujours à me taquiner bien sûr, vous êtes géniaux.

Enfin je souhaite remercier les personnes qui comptent le plus pour moi, ma famille. Je remercie mes parents, Serge et Valérie. Papa et Maman je vous remercie pour votre amour inconditionnel, rien n'aurait été possible sans vous, je vous aime comme vous n'avez pas idée et je suis fière d'être votre fille. Je remercie aussi ma sœur, Estelle, j'admire ta force et ta détermination, tu comptes énormément pour moi, même si je ne le dis pas tout le temps. Je remercie ma grand-mère Germaine, Mamie tu es toujours attentionnée, pleine d'amour et surtout très drôle, nous ne partageons pas juste la date de nos anniversaires, nous partageons un lien unique. Ma dernière pensée se dirige particulièrement à mon grand-père André. Papy, tu es mon guerrier, mon héros et tu le seras à jamais, je t'aime pour toujours.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

L'objectif de cette thèse et des travaux de recherche menés est de mieux comprendre les mécanismes biologiques et moléculaires qui peuvent causer une insulino-résistance à l'origine d'une dérégulation de l'homéostasie glucidique ayant pour conséquence le développement du diabète.

I- Diabète, homéostasie glucidique et dysfonctionnements de l'insuline

A. Diabètes

Le diabète est un trouble métabolique qui se caractérise par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire un excès de glucose dans le sang, due à une altération de la sécrétion d'insuline par le pancréas et/ou à son action défectueuse sur les tissus périphériques sensibles.

Le diagnostic se fait par mesure de la glycémie à jeun, test dynamique d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO, 75g de glucose) ou par mesure des taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c). Ainsi, une personne est considérée atteinte de diabète si sa glycémie à jeun est supérieure à 7mmol/L, si son hyperglycémie dépasse 11.1mmol/L après le test de tolérance au glucose ou si le taux d'HbA1c surpasse le seuil de 48 mmol/L (6,5%) (1).

Il est essentiel de mettre en emphase que le diabète a pris une ampleur considérable dans le monde au cours de ces dernières décennies, telle que nous pouvons parler de pandémie. En effet, en 2014, nous pouvions compter 438 millions de malades contre 108 millions en 1980. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète deviendrait en 2030, la 7ème cause de mortalité dans le monde. Néanmoins, pour appréhender la complexité de cette maladie, il est important de différencier les différentes catégories de diabètes. Dans cette thèse, nous allons aborder les deux types majeurs : le diabète de type 1 (DT1) et plus particulièrement, le diabète de type 2 (DT2).

Cependant, il est indispensable de mentionner que d'autres classes de diabète existent. Brièvement, nous recensons: le diabète gestationnel survenant pendant la grossesse, ce diabète réversible comprend des risques élevés pour la femme de développer par la suite le DT2 ; les diabètes appelés MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) qui sont d'ordre génétique et se

caractérisent par une transmission autosomique dominante de mutations affectant certains gènes impliqués dans le développement ou le fonctionnement des cellules bêta du pancréas ; et enfin les diabètes causés par des traitements pharmacologiques (ex : glucocorticoïdes, statines...) (2-5).

1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune qui se caractérise par la destruction des cellules β du pancréas, ayant pour conséquence une déficience grave dans la production et sécrétion d'insuline, menant ainsi à une hyperglycémie chronique. La perte des cellules β est causée à la fois par une réaction inflammatoire provoquée par l'infiltration dans les îlots de Langerhans, de lymphocytes T helper CD4 et de lymphocytes T cytotoxiques CD8 mais aussi par une réponse humorale des lymphocytes B, à l'origine d'auto-anticorps anti-cellules β (6). La présence sérique de plusieurs de ces anticorps dirigés contre des protéines pancréatiques comme l'insuline, l'enzyme acide glutamique décarboxylase (GAD65), la tyrosine phosphatase IA2, ainsi que la protéine de transport du zinc (ZnT8A), est associée au développement du DT1 et est utilisée comme biomarqueur pour le diagnostic (7).

Les causes pouvant expliquer la perte des cellules β et l'apparition du DT1 ne sont pas clairement établies. Cependant, l'hypothèse émise serait une association complexe entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux. Parmi les variations génétiques, les plus fréquentes sont celles localisés sur le chromosome 6 concernant les gènes du système HLA de classe II (*Human Leucocyte Antigen*) impliqué dans la présentation antigénique aux lymphocytes T pour initier une réponse immunitaire adaptative. Ces polymorphismes HLA représentent environ 50% des susceptibilités génétiques à développer le DT1 et une majorité de personnes atteintes du DT1 possèdent les haplotypes HLA-DR3 et /ou HLA-DR4 (8). Néanmoins, d'autres gènes non-HLA, avec certes des prédispositions plus faibles, ont été identifiés comme IDDM2 (Insulin dependent diabetes mellitus 2), celui de l'antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), de PTPN22 (Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22) codant pour la tyrosine phosphatase exprimée dans les tissus lymphoïdes, ou encore, du

récepteur à l'interleukine 2 alpha IL2RA (Interleukin-2 receptor alpha) (9). Il s'agit principalement de gènes impliqués dans le système immunitaire qui pourraient être à l'origine de cette réponse défensive défectueuse. Toutefois, les variations génétiques ne peuvent expliquer à elles seules l'apparition de la maladie et aucun gène unique n'est responsable du DT1. Par ailleurs, il a été constaté, chez des jumeaux monozygotes, que lorsque l'un est atteint du DT1 le second a environ 30 à 50% de risques de le développer à son tour. Cette concordance traduit le fait que le DT1 n'est pas uniquement lié à la génétique et supporte l'implication potentielle de facteurs externes. À ce jour, nous ne pouvons certifier du rôle des facteurs environnementaux dans l'étiologie du DT1 mais certains présentent une corrélation élevée avec le développement de la physiopathologie. Nous dénombrons des facteurs liés au style de vie comme l'alimentation, l'exposition aux polluants ou d'éventuelles carences comme celle en vitamine D ou des infections virales (10).

Ce diabète insulino-dépendant touche environ 5 à 10% de la totalité des personnes diabétiques. En revanche, il représente 80 à 90% des cas de diabète chez les enfants et les adolescents. Ainsi, le DT1 est l'une des maladies infantiles d'origine endocrinienne les plus communes et a été appelé « diabète juvénile » pendant de nombreuses années.

L'insulinothérapie reste actuellement le traitement principal des patients DT1, consistant à des injections d'insuline plusieurs fois par jour pour compenser la perte de production de l'hormone endogène. Cependant, des avancées techniques et thérapeutiques tentent d'ouvrir la voie à de nouvelles possibilités de traitements telles que la greffe de pancréas ou d'îlots de Langerhans.

2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est la forme de diabète la plus fréquente, affectant 90% des diabétiques dans le monde. L'hyperglycémie chronique du DT2 résulte d'une conjonction de deux dysfonctionnements : un défaut dans la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas, associée à une altération de la réponse à l'insuline par les tissus périphériques sensibles, nommée insulino-résistance.

Les facteurs de risques :

L'origine du DT2 n'est pas encore à ce jour totalement élucidée. Les causes de la physiopathologie résultent d'une interaction étroite entre des facteurs génétiques et environnementaux. Cette combinaison multifactorielle complexe s'explique par l'ambivalence de la réponse aux facteurs de risques en fonction des personnes. En effet, il est important de préciser que les prédispositions génétiques n'induisent pas forcément l'apparition du phénotype diabétique à moins que des facteurs environnementaux, notamment liés au mode de vie, soient également impliqués. À l'inverse, la manière dont les individus répondent aux facteurs environnementaux peut être en partie définie par leur susceptibilité génétique à l'obésité ou au DT2.

Ces paramètres peuvent être classifiés en deux catégories distinctes : les facteurs non-modifiables et modifiables.

Facteurs non-modifiables : les prédispositions génétiques, l'ethnicité, les antécédents de diabète gestationnel ou l'âge.

Les prédispositions génétiques sont une composante importante de l'apparition de la physiopathologie. L'éventualité de développer le DT2 d'un point de vue génétique est étroitement liée à l'héritabilité familiale. Il a ainsi pu être estimé que le risque s'élevait à 40% pour une personne dont l'un des parents était atteint de DT2, pour atteindre 70% lorsque les deux parents étaient malades, contre seulement 6% dans la population globale (11). Récemment, plusieurs études d'association pangénomique de grande envergure (*genome-wide association study*, GWAS) ont permis d'identifier approximativement 700 loci fortement associés avec le risque de DT2 (12-15). La plupart des polymorphismes mononucléotidiques (*Single-nucleotide polymorphism* : SNP) identifiés sont impliqués dans la fonction des cellules β des îlots de Langerhans et vont perturber la sécrétion de l'insuline (12). Malgré ces découvertes, actuellement, les prédispositions génétiques identifiées n'expliquent que 20% des cas de DT2. Il est donc nécessaire d'approfondir l'identification de ces variations génétiques et aussi d'étendre les études pangénomiques à différentes ethnicités pour disposer d'un spectre plus représentatif. Par ailleurs, l'origine ethnique représente également un facteur de risque important puisque certaines populations non-caucasiennes ont des probabilités plus élevées de développer le DT2

(16). À cette susceptibilité génétique s'ajoute les antécédents de diabète gestationnel. Ce paramètre constitue un risque à la fois pour la mère d'être atteinte du DT2 dans les années qui suivent mais aussi pour son enfant qui est plus susceptible de développer de l'obésité ou du DT2 (17). Enfin, dans les paramètres non-modifiables, on peut répertorier que l'incidence du DT2 augmente avec l'âge puisque les individus âgés de 45 ans et plus sont à plus haut risque.

Néanmoins, d'autres facteurs notamment modifiables et surtout liés à nos modes de vie, ont joué un rôle majeur dans l'augmentation du nombre de cas du DT2.

Facteurs modifiables: activité physique, alimentation, obésité/surpoids, alcool, tabagisme, pollution, microbiote intestinal...

Au cours des dernières décennies, l'augmentation de la prévalence du diabète est liée à un changement indiscutable de notre style de vie, devenu plus sédentarisé et accompagné d'une alimentation riche en sucres et en graisses. En effet, l'obésité, le régime alimentaire et le manque d'activité physique sont les principaux facteurs de risque modifiables responsables du DT2 (18). L'ampleur pandémique du DT2 est étroitement associée à une augmentation accrue des cas d'obésité. Environ 80% des diabétiques de type 2 sont en situation d'obésité ou de surpoids (19). Un indice de masse corporelle élevé constitue un risque mais il s'agit plus spécifiquement d'une augmentation de l'obésité viscérale et/ou de la graisse ectopique qui seraient en cause via l'apparition d'insulino-résistance (20). De plus, la consommation d'alcool, le tabagisme ou la pollution s'inscrivent aussi dans la liste des facteurs environnementaux à risque, en lien avec notre qualité de vie, qui engendrent une augmentation du risque de développer le DT2 (21-24).

Des études récentes mettent aussi en cause le microbiote intestinal, qui constitue l'ensemble des microorganismes présents dans l'intestin. Une dysbiose dans cet important écosystème majoritairement bactérien pourrait être causale quant à certains troubles métaboliques. De nouvelles recherches menées tentent de prouver que le microbiote intestinal est impliqué dans la progression du DT2. En effet il a été montré que les personnes souffrant du DT2 possédaient un microbiote altéré (25, 26).

Traitements possibles

Ces facteurs modifiables ne sont toutefois pas à négliger, puisque plusieurs études ont démontré que des changements de régime alimentaire et une augmentation de l'exercice physique pouvaient prévenir le DT2 et améliorer la gestion de la maladie (27). Si les modifications du mode de vie ne sont pas envisageables, un traitement pharmacologique (ex : metformine, inhibiteurs SGLT2, analogues de l'incrétine *glucagon-like peptide-1* (GLP-1)) et/ou des injections d'insuline peuvent constituer une stratégie pour maintenir la glycémie aussi près que possible de la normale et pour retarder ou éventuellement prévenir l'apparition de problèmes de santé liés au diabète (28).

Cependant, il est indispensable de souligner qu'aucune thérapie curative contre le DT2 n'existe actuellement.

Mieux comprendre pour y remédier

Pour conclure, le diabète de type 2 est une maladie chronique, multifactorielle et complexe. L'augmentation exponentielle du nombre de cas, la prise en charge des soins et notamment des complications liées à la maladie constituent un problème majeur de santé publique. Par ailleurs, malgré le fait que l'âge soit un facteur de risque, les évidences récentes montrent que de plus en plus de personnes jeunes et même des enfants sont touchés par la maladie (29). Le DT2 devient donc une préoccupation sanitaire, économique, financière et surtout sociétale. Il est indispensable pour y remédier de mieux comprendre et appréhender les processus physiologiques, cellulaires et moléculaires de cette maladie.

En résumé, les différents types de diabète sont le résultat d'une défaillance des mécanismes de régulation de l'homéostasie glucidique.

B. Régulation de l'homéostasie glucidique

1. Homéostasie glucidique

L'homéostasie est définie comme un processus de régulation par lequel un système parvient à maintenir un équilibre en dépit des contraintes extérieures. Il en est ainsi de même avec l'homéostasie glucidique. L'organisme oscille entre les moments de jeûne et les apports nutritifs et tente de maintenir les taux de glucose sanguin (glycémie) à une valeur physiologique de référence, autour de 4 à 7 mmol/l. Cet équilibre est essentiel et même vital. Un dérèglement trop fort menant à une hypoglycémie sévère peut aboutir au décès de la personne. À l'inverse, une hyperglycémie prolongée, comme dans le cas des personnes diabétiques, peut conduire au dysfonctionnement de différents organes et au développement de complications d'ordre microvasculaires comme la rétinopathie (yeux), la neuropathie (système neurologique) et la néphropathie (reins), mais également des dommages plus graves tels que des infarctus ou des accidents vasculaires cérébraux (AVC) (30).

La régulation de la glycémie fluctue en fonction des apports glucidiques externes. En période post-prandiale, c'est-à-dire après un repas, le glucose provenant de l'alimentation sera absorbé par les organes et utilisé comme source d'énergie. Certains tissus seront capables de mettre en réserve une partie du glucose. Le muscle squelettique et le foie sont capables de convertir le glucose sous forme de glycogène alors que le tissu adipeux et le foie vont le stocker en triglycérides. En période de jeûne, ces réserves sont mobilisées par le muscle et le tissu adipeux pour leur propre usage. Le foie quant à lui est un organe clé et joue un rôle central dans la régulation glycémique. Il est le seul organe apte à libérer dans le sang du glucose produit à partir de l'hydrolyse de ses réserves glycogéniques, permettant ainsi d'approvisionner d'autres organes et notamment le cerveau.

Cet équilibre glycémique est maintenu par la coordination de l'ensemble des réponses des organes régulateurs comme le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Cette communication inter-tissulaire est régulée par des hormones spécifiques provenant du pancréas (Figure 1).

2. Régulation par le système endocrinien pancréatique

Le pancréas est une glande amphicrine, en d'autres termes, qui possède à la fois une fonction exocrine et endocrine. La partie exocrine est composée de cellules acinaires impliquées dans la production et sécrétion d'enzymes digestives. Le pancréas endocrinien est constitué par les îlots de Langerhans qui regroupent les cellules responsables de la sécrétion des principales hormones régulatrices du métabolisme glucidique : le glucagon et l'insuline. Ces deux hormones ont des rôles antagonistes permettant, respectivement, d'augmenter ou de diminuer la glycémie. Pour cela, l'insuline et le glucagon vont influencer les différentes étapes du métabolisme glucidique comme le transport mais aussi les voies métaboliques d'utilisation, de stockage (glycolyse et glycogénogenèse) ou encore de production endogène de glucose (glycogénolyse, néogluco-genèse).

a) Le glucagon : une hormone hyperglycémiante

Le glucagon est une hormone polypeptidique de 29 acides aminés, sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas. La synthèse du glucagon est régulée par différentes étapes de clivage protéolytique. En effet, le gène *GCG* code pour le précurseur du glucagon, le préproglucagon qui est également à l'origine de la synthèse des incrétines : GLP-1 et GLP-2 qui sont quant à elles sécrétées par les cellules endocrines de l'épithélium intestinal. Le préproglucagon perd son peptide signal via la signal peptidase pour donner le proglucagon qui lui-même est clivé par la proprotéine convertase 2 pour générer le glucagon (31).

Le glucagon est une hormone hyperglycémiante, c'est-à-dire que sa fonction est d'augmenter les niveaux de glucose dans le sang. La sécrétion du glucagon est principalement régulée par les variations des taux de glucose sanguin. Ainsi, la baisse des niveaux de glucose dans le sang, un jeûne prolongé ou l'exercice physique sont des facteurs stimulateurs de sa sécrétion. Une fois libéré dans la circulation sanguine, le glucagon se lie à son récepteur membranaire GCGR, de la famille des récepteurs couplés à la protéine G. Ce récepteur est abondamment exprimé dans le foie et les reins.

Effets du glucagon

Pour élever les niveaux de glucose sanguin et maintenir une glycémie normale, le glucagon augmente la production de glucose hépatique en stimulant la glycogénolyse et la néoglucogénèse hépatique et en diminuant la glycolyse et la glycogénogenèse.

b) L'insuline : la seule hormone hypoglycémiante

L'insuline joue un rôle central et fondamental dans la régulation de la glycémie puisqu'elle est la seule hormone de l'organisme dite hypoglycémiante.

L'insuline est synthétisée et sécrétée par les cellules β contenues dans les îlots de Langerhans. Cette hormone peptidique composée de 51 acides aminés est disposée en deux chaînes : A (21 acides aminés) et B (30 acides aminés) reliées par deux ponts disulfures. Similairement au glucagon, l'insuline est synthétisée à partir de la maturation de précurseurs intermédiaires dans la voie de sécrétion. Le gène *INS* code pour la forme inactive du précurseur préproinsuline (110 acides aminés), qui est synthétisé par les polyribosomes liés au réticulum endoplasmique rugueux (RER). Une fois entré dans le RER, le peptide signal du préproinsuline est éliminé par la signal peptidase pour former la proinsuline (32). La proinsuline possède 86 acides aminés et est formée des deux chaînes A et B reliées par un peptide de connexion, appelé peptide C. La proinsuline acquiert ensuite des modifications conformationnelles par la formation de ponts disulfures puis transite via l'appareil de Golgi jusqu'à des vésicules immatures nommées vésicules sécrétoires recouvertes (de clathrine). À l'intérieur de ces vésicules, les protéines convertases PC2 et PC1/3 sont responsables de la transformation endoprotéolytique de la proinsuline en insuline et en peptide C (33). L'insuline et le peptide C sont alors stockés dans des granules sécrétoires lisses (matures, sans clathrine) un processus d'acidification et seront libérés dans le sang en quantité équimolaire (34).

Le glucose est un régulateur important de l'insuline puisqu'il affecte à la fois sa biosynthèse mais aussi sa sécrétion. En effet, les niveaux de glucose régulent la transcription du gène codant pour l'insuline et promeut la stabilité de l'ARNm de la proinsuline (35-37).

Cependant, le principal effet du glucose concerne la stimulation rapide de la sécrétion d'insuline par exocytose. En d'autres termes, les granules contenant l'insuline fusionnent avec la membrane plasmique pour délivrer l'insuline à l'extérieur de la cellule. La sécrétion d'insuline est caractérisée comme biphasique, décrivant ainsi une première étape rapide et immédiate de courte durée suivie par une phase de sécrétion soutenue et prolongée. La première phase est assurée par un réservoir de vésicules accolées à la membrane plasmique et qui sont donc immédiatement mobilisables. L'exocytose de ces granules est régulée essentiellement par une élévation de la glycémie. Le glucose entre dans les cellules β du pancréas et se trouve métabolisé dans le but de générer de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate, ATP, via les voies métaboliques de la glycolyse couplée au cycle de Krebs et à la phosphorylation oxydative. L'augmentation des niveaux d'ATP et plus particulièrement du ratio ATP/ADP (adénosine diphosphate) induit une dépolarisation de la membrane plasmique à la suite de la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP. La dépolarisation entraîne alors l'ouverture des canaux ioniques Ca^{2+} voltages-dépendants provoquant une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Le calcium est un régulateur important des protéines impliquées dans l'exocytose, les SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*). Ce processus de sécrétion est médié par un complexe constitué de SNARE (v-SNARE) présentes à la membrane des vésicules d'insuline et de SNARE (t-SNARE) situées au niveau de la membrane plasmique. Lors de l'élévation des taux de calcium intracellulaire, la synaptotagmine, une protéine senseur au Ca^{2+} , est activée, et permet la liaison des complexes SNARE facilitant la fusion. Par ailleurs, en augmentant les niveaux d'ATP intracellulaires, le glucose augmente aussi l'activité des kinésines, responsables du transport le long des microtubules des vésicules plus éloignées, induisant la deuxième phase de sécrétion (38).

Pour conclure, le glucose est le principal régulateur de la capacité de sécrétion d'insuline. Néanmoins, d'autres facteurs comme les acides aminés (glutamine et leucine), les acides gras ou différentes hormones (œstrogènes, GLP-1, adiponectine, ostéocalcine) peuvent également participer à cette stimulation.

Effets de l'insuline

L'insuline est classifiée comme étant une hormone hypoglycémiante et anabolisante. Pour diminuer la glycémie, l'insuline favorise le transport intracellulaire du glucose, l'utilisation du glucose à des fins énergétiques, ainsi que sa mise en réserve sous forme glycogénique. À l'inverse, elle inhibe les voies de mobilisation et production de glucose endogène. L'insuline assure également d'autres fonctions anabolisantes telle que l'induction de la synthèse protéique et lipidique.

L'insuline circulante se lie au récepteur à l'insuline (RI), un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase exprimé dans la majorité des tissus. Cependant, son action régule l'homéostasie glucidique en agissant en particulier sur le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie, qualifiés de tissus insulino-sensibles. Les mécanismes moléculaires seront détaillés lors de la description des différentes voies métaboliques.

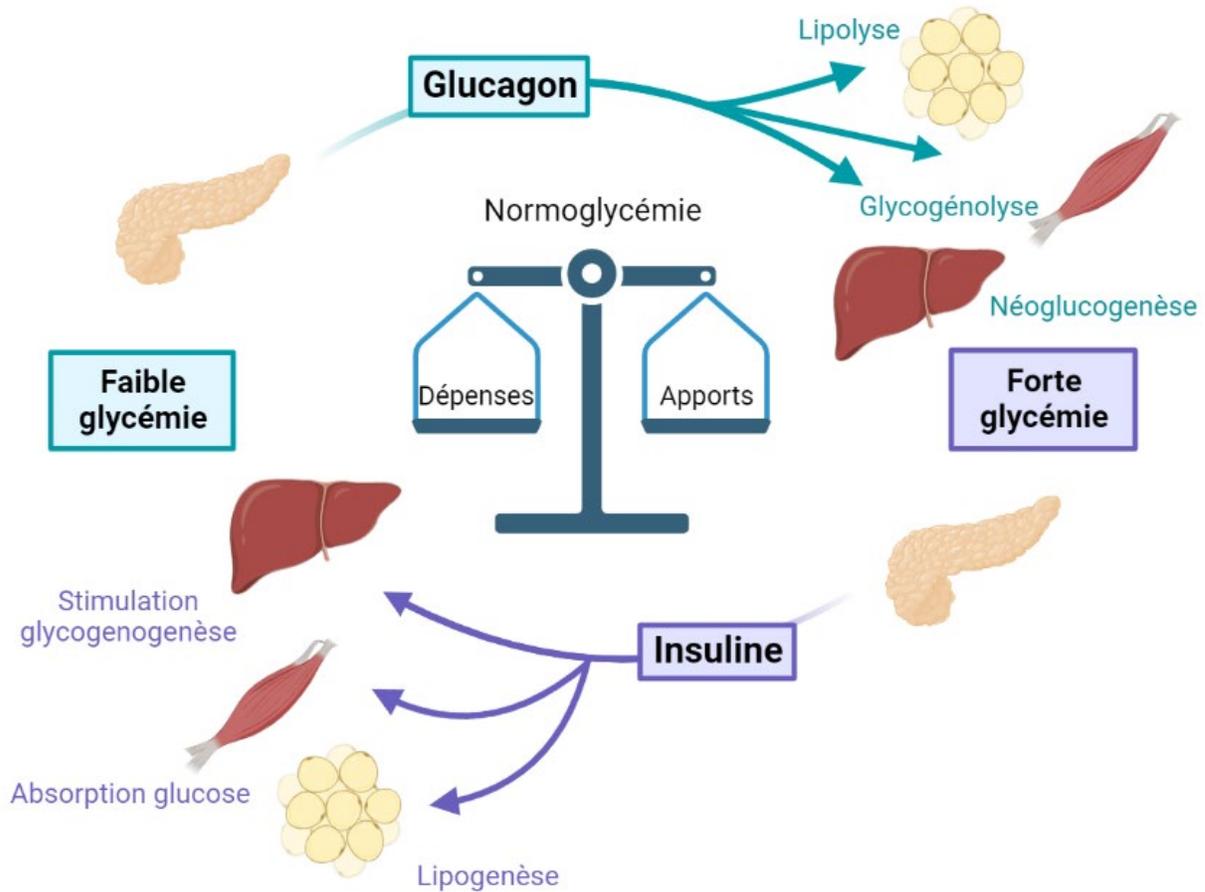


Figure 1. Balance énergétique et homéostasie glucidique.

Adapté de (39)

La régulation de la glycémie entre les périodes d'apports et de dépenses est assurée par le glucagon et l'insuline qui agissent principalement sur le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Pour compenser la baisse de la glycémie, le glucagon est sécrété par le pancréas pour stimuler la glycogénolyse, la néoglucogenèse et la lipolyse afin d'augmenter les niveaux de glucose circulants. À l'inverse, lorsque la glycémie augmente, le pancréas sécrète l'hormone hypoglycémiante qui est l'insuline favorisant ainsi l'absorption du glucose par le muscle squelettique et le tissu adipeux de même que la glycogénogenèse hépatique.

3. Le transport du glucose

Pour maintenir l'homéostasie glucidique et combler les besoins énergétiques des différents tissus, le glucose doit pouvoir être échangé entre la circulation sanguine et les cellules de l'organisme. Néanmoins, au vu de sa nature hydrophile, le glucose ne peut franchir directement la membrane plasmique et pénétrer dans les cellules par simple diffusion. La grande majorité des cellules importent le glucose par un processus de diffusion facilitée médiée par des protéines de transport membranaire de la famille des GLUT (*Glucose Transporters*). Il existe plusieurs isoformes de transporteurs GLUT dont l'expression diffère selon le type tissulaire et qui présentent des affinités variables pour le glucose.

GLUT 1,2 et 3 : transporteurs de l'absorption basale du glucose et détecteurs de glucose

GLUT1 et GLUT3 sont des transporteurs de glucose présentant une très forte affinité pour le glucose ($K_m \sim 1-2 \text{ mM}$) qui aident à l'absorption basale du glucose (40).

GLUT1 est considéré comme le transporteur principal responsable de l'absorption basale du glucose dans de nombreux types de cellules. Son expression est particulièrement élevée dans les érythrocytes, les cellules endothéliales et le cerveau.

GLUT3 est celui qui présente la plus haute affinité pour le glucose et a notamment été caractérisé pour faciliter le transport du glucose au niveau des neurones.

Ainsi, GLUT 1 et 3 sont essentiels pour assurer une absorption constante et suffisante en glucose dans les tissus gluco-dépendants, notamment les neurones et les érythrocytes, qui ont de forts besoins énergétiques mais sont incapables d'emmagasiner le glucose sous forme de glycogène.

GLUT2 est le transporteur présentant l'affinité la plus faible pour le glucose ($K_m \sim 15-20 \text{ mM}$). Il peut ainsi agir comme un senseur des niveaux glycémiques. Il est exprimé principalement dans les hépatocytes et les cellules β du pancréas. Ainsi, en condition hyperglycémique, GLUT2 permet l'entrée du glucose dans les cellules β pour stimuler la sécrétion d'insuline. À l'inverse en condition de jeun, le glucose hépatique est exporté via GLUT2 vers la circulation sanguine. (41)

Spécificité de GLUT4 : première cible de l'action hypoglycémiante de l'insuline

GLUT4 est un transporteur de glucose à forte affinité qui a la particularité d'être insulino-dépendant. GLUT4 est exprimé dans le cœur et dans les tissus sensibles à l'insuline comme le tissu adipeux et particulièrement dans le muscle squelettique. La particularité de GLUT4 est qu'il n'est pas localisé en tout temps au niveau de la surface cellulaire contrairement aux autres types de GLUT. Il est séquestré au niveau de vésicules intracellulaires et sa translocation vers la membrane plasmique est stimulée par le signal de l'insuline, entraînant ainsi une augmentation significative de 10 à 20 fois du transport du glucose (42-44). Les niveaux de GLUT4 sont déterminants pour l'absorption du glucose et le maintien de l'homéostasie glucidique à l'échelle de l'organisme. En effet, GLUT4 est le transporteur de glucose le plus fortement exprimé dans le muscle squelettique, organe indispensable à la clairance du glucose vu qu'il est responsable d'environ 80 % de l'absorption du glucose post-prandiale (45). Par ailleurs, les souris déficientes pour GLUT4 dans le muscle squelettique présentent une diminution d'environ 55% de l'absorption du glucose conduisant à un phénotype hyperglycémique (46). À l'inverse, les souris transgéniques surexprimant GLUT4 au niveau du tissu adipeux ou du muscle squelettique démontrent une meilleure tolérance au glucose (47, 48). GLUT4 et sa régulation par l'insuline sont d'une importance cruciale pour une diminution de la glycémie et le maintien de l'homéostasie glucidique.

4. Le métabolisme glucidique : le devenir du glucose

a) Condition post-prandiale

En condition post-prandiale, l'augmentation de la glycémie induit une stimulation de la sécrétion de l'insuline. L'insuline assure son action hypoglycémisante en affectant différentes voies métaboliques passant de l'entrée du glucose au contrôle de son devenir dans la cellule, comme son utilisation ou sa mise en réserve.

1. Séquestration du glucose intracellulaire

L'augmentation de l'entrée du glucose à l'intérieur de la cellule entraîne une modification du gradient de concentration. Pour éviter une sortie vers le milieu extracellulaire, le glucose subit une première étape de phosphorylation pour être converti en glucose-6-phosphate. Cette réaction permet une séquestration du glucose intracellulaire et est assurée par l'enzyme hexokinase ou par la glucokinase dans le foie et les cellules β du pancréas.

La réaction inverse est médiée par l'enzyme glucose-6-phosphatase qui est exprimée dans le foie, permettant une sortie du glucose vers la circulation sanguine en cas de jeûne.

Le glucose-6-phosphate nouvellement synthétisé devient le substrat précurseur de plusieurs voies métaboliques possibles :

- La Glycolyse (suivie par le cycle de Krebs ou la production de lactate), afin de générer de l'énergie indispensable au fonctionnement cellulaire.
- La Glycogénogenèse ou la Lipogenèse, pour une mise en réserve du glucose sous forme de glycogène ou de lipides, pour une utilisation ultérieure en cas de jeun.
- La voie des pentoses phosphates, dans laquelle le glucose permet de générer le ribose utilisé dans la synthèse des acides nucléiques.

2. Utilisation du glucose

2.1. Glycolyse

La glycolyse est un processus métabolique primordial dans la survie de l'organisme puisqu'elle permet, à partir du glucose, la production d'ATP, la principale source d'énergie pour assurer les fonctions cellulaires et réactions enzymatiques. Par ailleurs, la glycolyse est l'unique voie productrice d'énergie pour les cellules gluco-dépendantes tel que les érythrocytes.

La glycolyse est une voie métabolique qui se déroule dans le cytoplasme des cellules et a la particularité de pouvoir avoir lieu en condition anaérobie, en d'autres termes elle ne nécessite pas la présence d'oxygène.

La glycolyse consiste en une série de dix réactions enzymatiques qui induisent la conversion d'une molécule de glucose à 6 carbones en deux molécules pyruvates à 3 carbones accompagnée de la synthèse de 2 ATP et de métabolites intermédiaires.

Le bilan énergétique final de la glycolyse se résume par la formule suivante :



Pour une représentation plus complète, les différentes étapes de la glycolyse sont détaillées dans la Figure 2.

La plupart des réactions qui induisent la formation du pyruvate à partir de glucose sont dites réversibles, elles peuvent ainsi intervenir en sens inverse. Les enzymes responsables de ces réactions sont donc à la fois impliquées dans la glycolyse et dans la néoglucogenèse (formation de glucose à partir de pyruvate).

Néanmoins, trois étapes sont qualifiées d'irréversibles et sont donc assurées par des enzymes différentes entre les deux voies métaboliques. Ces enzymes sont impliquées dans les réactions 1, 3 et 10 de la glycolyse et sont la cible de régulation métabolique.

Étape 1: Phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par l'Hexokinase ou la Glucokinase.



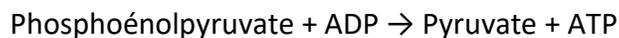
Il s'agit de la première étape de la glycolyse, précédemment évoquée, qui consiste à retenir le glucose à l'intérieur de la cellule. Pour avoir lieu, cette réaction nécessite la consommation d'une molécule d'ATP.

Étape 3: Phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate par la Phosphofructokinase 1 (PFK1).



La phosphofructokinase 1 est une enzyme allostérique dont l'activité peut être stimulée par le fructose-2,6-bisphosphate métabolisé via l'enzyme phosphofructokinase 2 (PFK2).

Étape 10: Transfert du phosphate du phosphoénolpyruvate pour former le pyruvate par la Pyruvate kinase (PK).



Il s'agit de la réaction finale de la glycolyse, qui permet de générer 2 ATP et 2 molécules de pyruvate.

L'insuline régule le flux de la glycolyse afin d'augmenter la consommation de glucose en condition hyperglycémique. Dans un premier temps, l'insuline favorise le transport du glucose via GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux (49). De plus, l'insuline module également l'expression et l'activité des enzymes impliquées dans les trois étapes clés de la glycolyse par des processus différents.

Ainsi, pour la réaction 1, l'insuline est responsable de l'augmentation de l'expression génique de l'hexokinase II, l'isoforme présente dans le muscle squelettique (50-52). Par ailleurs, il a aussi été démontré que l'activité de l'Hexokinase II était significativement diminuée dans les muscles squelettiques de modèles animaux insulino-résistants ou de patients atteints de DT2 (53, 54). Cette régulation transcriptionnelle est également effectuée pour la glucokinase au niveau des

cellules hépatiques via l'activation du facteur de transcription SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein*) (55-57).

Pour la régulation de l'étape 3 de la glycolyse, l'action de l'insuline dans le foie, se fait de façon indirecte par l'intermédiaire d'une boucle de régulation impliquant une autre enzyme, la PFK2. La PFK2 est responsable de la réaction transformant le fructose-6-phosphate en fructose-2,6-bisphosphate. L'insuline, via sa voie de signalisation, entraîne une diminution des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et un état déphosphorylé de PFK2 qui devient alors active. PFK2 activée induit donc une augmentation des niveaux de fructose-2,6-bisphosphate, un activateur allostérique de PFK1 (58) .

Enfin, l'insuline peut aussi induire une augmentation de la transcription de l'isoforme L de la pyruvate kinase, celle présente dans le foie (59).

Le devenir du pyruvate va ainsi dépendre des conditions anaérobiques ou aérobiques. Il peut alors entrer dans le cycle de Krebs ou être engagé dans la production du lactate.

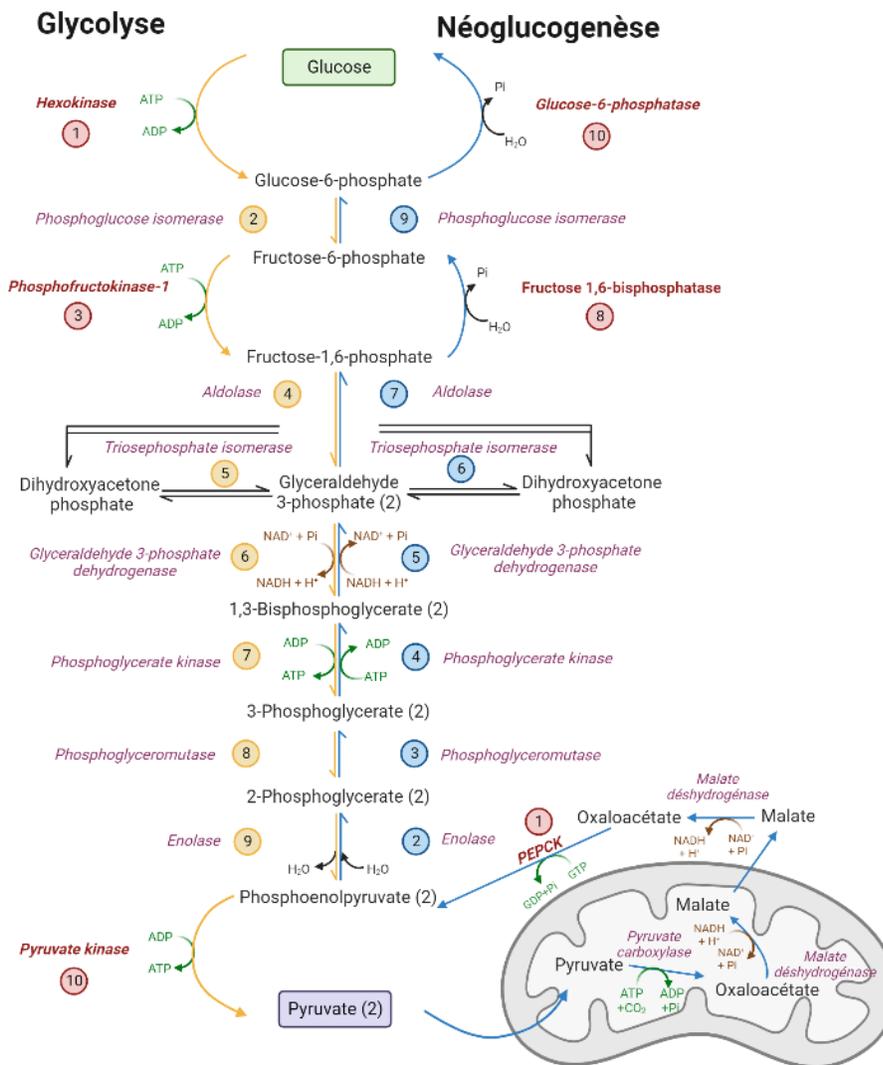


Figure 2. Voies métaboliques de la glycolyse et de la néoglucogénèse.

Étapes comprenant les enzymes et métabolites impliqués dans la glycolyse (jaune) et la néoglucogénèse (bleue). La glycolyse se déroule en condition post-prandiale et dégrade le glucose dans la cellule afin de fournir de l'énergie sous forme d'ATP. À l'inverse, la néoglucogénèse a lieu au cours du jeûne pour synthétiser du nouveau glucose à partir de composés non glucidiques tel que le pyruvate. Ces deux voies parallèles comprennent un ensemble de 10 réactions en commun dont 7 sont réversibles et assurées par les mêmes enzymes. Cependant, trois sont dites irréversibles et sont effectuées par des enzymes différentes (rouge). Les étapes 1,3 et 10 de la glycolyse sont : l'Hexokinase, la Phosphofructokinase-1 et la Pyruvate kinase. Elles sont remplacées dans les étapes 1,8 et 10 de la néoglucogénèse par la Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la Fructose 1,6-bisphosphatase et la Glucose-6-phosphatase.

2.2. Cycle de Krebs

Le pyruvate, en présence d'oxygène, entre dans le cycle de Krebs pour poursuivre et augmenter la production d'énergie. Le cycle de Krebs, aussi appelé cycle de l'acide citrique, se produit dans la matrice mitochondriale. Cette série de réactions biochimiques permet à la fois la formation de métabolites nécessaires dans différentes voies de biosynthèse comme la lipogénèse, mais aussi de cofacteurs énergétiques indispensables à la fabrication d'ATP via le processus de phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il faut deux tours du cycle pour traiter l'équivalent d'une molécule de glucose. L'ensemble des étapes sont récapitulées dans la Figure 3.

Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) par la Pyruvate déshydrogénase (en éliminant une molécule de dioxyde de carbone). L'acetyl-CoA représente le point d'entrée de ce cycle. Par l'intermédiaire de l'enzyme citrate synthase, l'acetyl-CoA avec l'oxaloacétate initie le cycle et la production de citrate avec la libération du CoA.

Comme indiqué précédemment, le cycle de Krebs permet la production de métabolites de certaines voies de biosynthèse, tel que l'acetyl-CoA. En revanche, l'acetyl-CoA ne peut sortir de la mitochondrie pour rejoindre le cytosol. Pour cela, le citrate libéré du CoA sort du cycle de Krebs pour rejoindre le cytosol où il sera clivé par l'ATP citrate lyase (ACLY) afin de générer de l'acetyl-CoA cytosolique permettant d'initier la synthèse du cholestérol et des acides gras.

Le bilan des huit étapes pour une molécule d'acetyl-CoA lors du cycle de Krebs est : la libération de deux molécules de dioxyde de carbone et une molécule de GTP (guanosine triphosphate). De plus, des transporteurs à haute énergie sont aussi générés, il s'agit de trois molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH;H^+) et une molécule de flavine adénine dinucléotide (FADH_2).

Ainsi, le cycle de Krebs à lui seul, ne génère qu'une seule molécule énergétique GTP, équivalent à l'ATP mais le potentiel énergétique de la voie est dépendant de la production des coenzymes réduits. Les NADH;H^+ et FADH_2 sont des coenzymes qui vont être transférés au niveau de la chaîne de respiration mitochondriale responsable de la production importante d'ATP en condition aérobie.

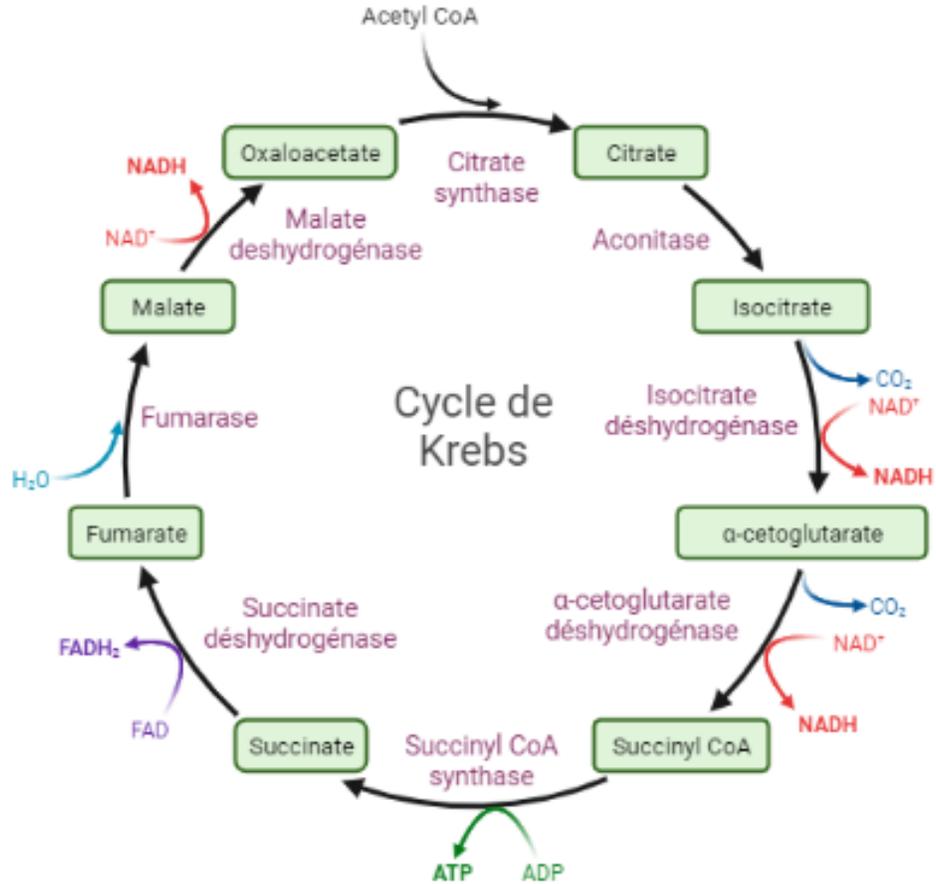


Figure 3. Cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs, également nommé cycle de l'acide citrique (TCA) est une série de réactions enzymatiques qui se déroule dans la mitochondrie permettant de synthétiser des intermédiaires énergétiques nécessaires à la production d'ATP dans la chaîne de transport des électrons mitochondriale. Le point d'entrée du cycle est l'acetyl-CoA qui peut notamment provenir de la décarboxylation oxydative du pyruvate produit par la glycolyse.

2.3. Phosphorylation oxydative

Ainsi, les coenzymes réduits entrent dans la chaîne de respiration mitochondriale, nommée également chaîne de transport des électrons, pour être utilisés lors du processus de phosphorylation oxydative. Cette chaîne de respiration se trouve au niveau de la membrane interne mitochondriale et est composée de cinq complexes (I-V).

Au niveau de la NADH déshydrogénase (complexe I), le NADH va être réoxydé pour donner du NAD^+ et ainsi libérer deux électrons. Le complexe II est formé de l'enzyme succinate déshydrogénase qui catalyse la réaction du cycle de Krebs, à l'origine de la conversion du succinate en fumarate et entraîne l'oxydation du FADH_2 , conduisant aussi à la libération de deux électrons. Les électrons sont ensuite transportés vers le complexe III par l'ubiquinone réduite puis vers le complexe IV par le cytochrome c. Au niveau du complexe IV, les électrons sont ensuite transférés à du dioxygène (O_2) qui sera réduit en deux molécules d'eau H_2O .

Les complexes I, III, et IV, en plus d'être responsables du transfert d'électrons, sont à l'origine de la mise en place d'un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale. En effet, ces complexes sont des pompes qui font passer les protons H^+ hors de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons sert de force motrice pour l'ATP synthase (complexe V), responsable du reflux de protons vers la matrice mitochondriale et de la phosphorylation d'ADP pour produire de l'ATP (Figure 4).

En conclusion l'oxydation d'une molécule de glucose en condition aérobie résulte en une production totale de 36 ATP : 2 provenant de la glycolyse, 2 lors du cycle de Krebs et 32 lors de la phosphorylation oxydative.

Ainsi, l'insuline régule et promeut la glycolyse aérobie qui conduira à une production d'ATP importante. Cette augmentation d'ATP va avoir aussi pour effet régulateur de promouvoir la sécrétion d'insuline dépendante du glucose dans les cellules β du pancréas.

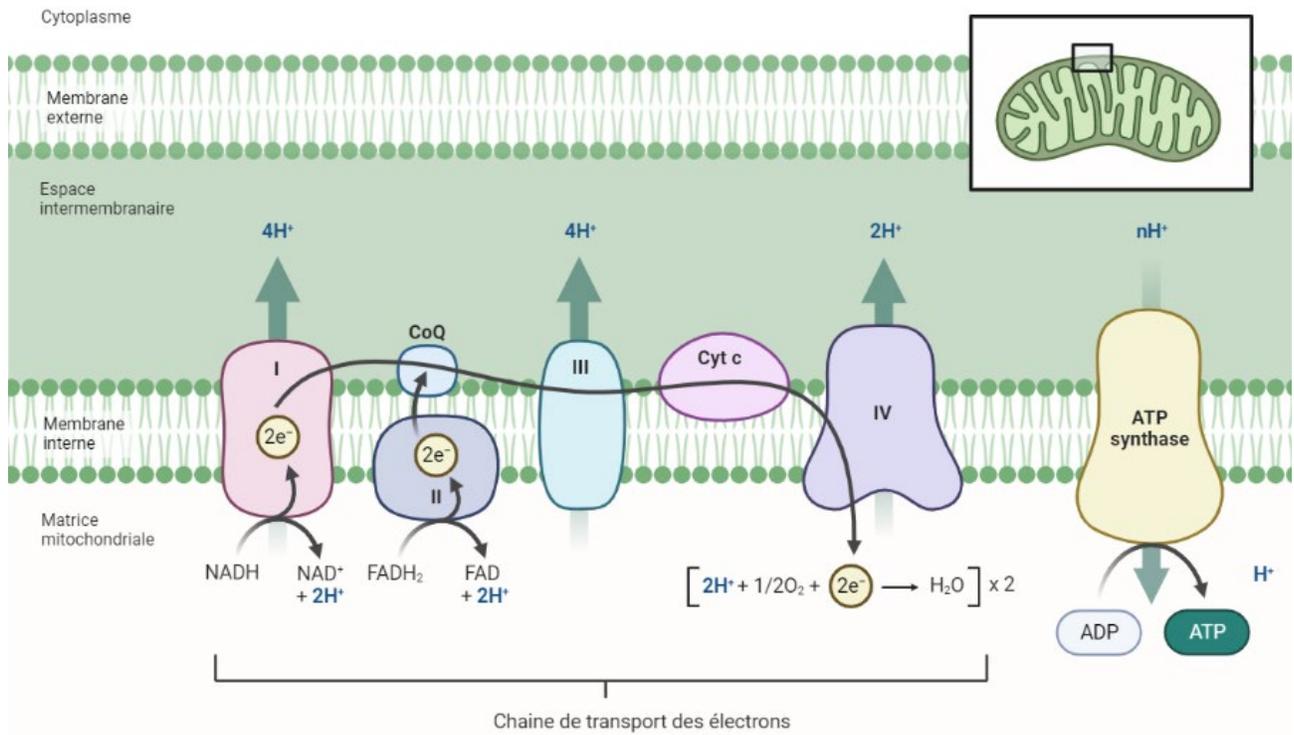


Figure 4. Chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie.

La chaîne de transport d'électrons est une série de 5 complexes protéiques situés dans la membrane mitochondriale interne qui est responsable de la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Cette chaîne permet le transfert des électrons du NADH et du FADH₂ produits dans le cycle de Krebs à l'oxygène. Le passage des électrons d'un complexe à l'autre crée un gradient de concentration de protons (H⁺) qui est ensuite utilisé par le complexe V (ATP synthase) pour produire de l'ATP.

2.4. Production de lactate

En condition anaérobie, la glycolyse conduit à la formation de lactate dans le cytoplasme. La conversion du pyruvate en lactate est catalysée par la Lactate déshydrogénase (LDH). Cette réaction provoque également la production de NAD^+ à partir du NADH qui est un cofacteur indispensable pour assurer la capacité glycolytique (étape 6). Ce destin final de la glycolyse n'est pas très rentable pour l'organisme car il induit la génération de seulement 2 ATP pour une molécule de glucose.

Cependant, la glycolyse anaérobie permet de fournir de l'énergie dans les cellules qui ne peuvent pas en produire par la phosphorylation oxydative. Ceci est le cas des érythrocytes qui sont dépourvus de mitochondries et d'enzymes du cycle de Krebs (60). Par ailleurs, le rôle de la glycolyse anaérobie devient indispensable pour fournir rapidement de l'énergie et permettre le bon fonctionnement du muscle squelettique à l'exercice lorsque les niveaux d'oxygène diminuent ou pour les tissus avec une faible vascularisation (ex : cornée) (61, 62). En effet, la glycolyse est approximativement 100 fois plus rapide que la phosphorylation oxydative. Le lactate produit, notamment par le muscle, se retrouve dans la circulation et peut être utilisé par le foie lors de la néoglucogénèse; ce cycle se nomme le Cycle de Cori.

La régulation de la glycolyse anaérobie n'est pas encore élucidée. Des études corrélatives ont mis en évidence des changements métaboliques conduisant à une augmentation des taux de la glycolyse anaérobie dans le diabète. Il a pu être observé que les taux de lactate dans le sang des personnes diabétiques était significativement plus élevé que chez des personnes normoglycémiantes (63-66). L'augmentation des niveaux de lactate circulants semble constituer un risque pour le développement du DT2, néanmoins le mécanisme reste à être élucidé.

3. Mise en réserve

Le glucose-6-phosphate peut aussi entrer dans des voies métaboliques de mise en réserve telles que la glycogénogenèse et la lipogenèse.

3.1. Glycogénogenèse : stockage du glycogène

Le glycogène est un polymère ramifié de plusieurs molécules de glucose unies par des liaisons glycosidiques α (1-4) avec des branchements serrés en α (1-6).

La biosynthèse du glycogène a lieu dans le cytosol. Dans un premier temps, le glucose-6-phosphate est transformé en glucose-1-phosphate par la Phosphoglucomutase. Un groupement uridine diphosphate (UDP) y est ensuite ajouté par l'UDP glucose pyrophosphorylase. La synthèse primaire de glycogène à partir des molécules de UDP-glucose est initiée par la glycogénine pour former une amorce. Ensuite, la Glycogène synthase transfère le résidu glucosyl de l'UDP-glucose à la chaîne de glycogène amorcée en formant des liaisons glycosidiques α (1-4). Cette réaction constitue l'étape limitante de la synthèse du glycogène. L'étape finale est l'étape de ramification assurée par la glycosyl-(4,6)-transférase avec l'établissement des liaisons α (1-6).

Le foie et le muscle sont les seuls tissus de l'organisme capables de mettre en réserve le glucose sous forme de glycogène.

La biosynthèse du glycogène est régulée de manière insulino-dépendante. En plus de favoriser la captation de glucose, l'insuline agit au niveau de l'enzyme glycogène synthase. L'insuline promeut la production de glucose-6-phosphate (par l'intermédiaire de l'hexokinase) qui est un activateur allostérique de cette enzyme. Par ailleurs, l'insuline, en se liant à son récepteur présent sur ces tissus, active sa voie de signalisation (qui sera énoncée plus en détails ultérieurement) et induit l'inactivation de la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3)(67-69). Ainsi, la Glycogène synthase se retrouve sous sa forme active, non-phosphorylée, et stimule la formation du glycogène.

D'autres évidences suggèrent que l'insuline pourrait agir indépendamment de GSK3 et promouvoir l'activité de la protéine phosphatase (PP), PP1 (70).

La voie de la glycogénolyse est antagonique à celle de la glycogénogenèse, elles sont donc régulées de manière réciproquement opposée l'une à l'autre.

3.2. Lipogenèse *de novo* : stockage des triglycérides

La lipogenèse *de novo* est la voie métabolique de biosynthèse des acides gras à partir de précurseurs non lipidiques tel que le glucose. Ces acides gras sont synthétisés en premier lieu dans le cytosol, puis peuvent ensuite être incorporés pour former des triglycérides au niveau du RE. Les triglycérides constituent un stockage énergétique important pouvant être mobilisés en période de jeun. La lipogenèse se déroule principalement dans le foie chez l'humain, ou dans le foie et le tissu adipeux chez les rongeurs. Cependant, même si le foie constitue la place centrale de synthèse des triglycérides, leur stockage a lieu au niveau du tissu adipeux en condition physiologique.

L'acétyl-CoA synthétisé à la suite de la glycolyse sert de précurseur pour la synthèse des acides gras. Localisé au niveau de la mitochondrie, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour être converti en citrate qui est alors transféré vers le cytosol. Le citrate est clivé par l'ATP-citrate lyase (ACLY) afin de régénérer de l'acétyl-CoA cytosolique. L'Acétyl-CoA-carboxylase (ACC) utilise ce dernier comme substrat afin de produire du malonyl-CoA. Enfin, la synthase d'acides gras (*Fatty Acid Synthase/ FASN*) catalyse la formation de palmitate à partir de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA. Le palmitate constitue le produit final de la biosynthèse cytosolique. Il existe dans le RE un dispositif spécialisé dans la synthèse d'acides gras plus longs. Ce processus implique des étapes d'élongation effectuée par des élongases (Elongation of very long chain fatty acids protein/ ELOVL) et de désaturation assurée par l'enzyme Stearoyl-CoA désaturase 1 (SCD1).

Les triglycérides sont des triesters d'acides gras et de glycérol. Leur production se fait dans le RE grâce à la triglycéride synthase à partir de glycérol-3-phosphate et d'acides gras. Le glycérol-3-phosphate est issu du 3-phosphodihydroxyacétone formé au cours de la glycolyse (étape 4), converti par la 3-phosphoglycérol déshydrogénase. Les triglycérides synthétisés sont ensuite libérés dans le cytosol et stockés dans des gouttelettes lipidiques dans les adipocytes. Les

triglycérides synthétisés dans le foie seront transportés vers leur lieu d'emménagement, le tissu adipeux, sous forme de lipoprotéines de très basse densité (*Very Low Density Lipoprotein/VLDL*).

Cette voie de biosynthèse et de mise en réserve des lipides est stimulée par l'insuline. Dans un premier temps, via la stimulation de la glycolyse, précédemment citée, qui permet de fournir le glycérol nécessaire pour la formation des triglycérides mais aussi les précurseurs de l'acetyl-CoA pour la synthèse des acides gras. Dans un second temps, l'insuline stimule le facteur de transcription SREBP1c qui augmente l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes clés de la lipogenèse (ex : ACLY, ACC, FASN, ELOVL6) (71-73) .

b) Condition de jeûne

Pour gérer la diminution de l'apport de glucose exogène en période de jeun, l'organisme compense en mobilisant ses réserves permettant ainsi le maintien du fonctionnement des tissus gluco-dépendants. Le glucagon est la principale hormone assurant cet effet hyperglycémiant, particulièrement en ciblant le premier fournisseur de glucose endogène : le foie. Le glucagon favorise la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatique mais aussi la lipolyse ayant lieu dans le tissu adipeux. À l'opposé, le maintien de l'homéostasie glucidique en condition post-prandiale est assuré par l'insuline qui inhibe donc ces voies métaboliques pour éviter l'hyperglycémie.

1. Utilisation des réserves

1.1. Glycogénolyse

Pour combler rapidement les besoins énergétiques de l'organisme à jeun, le glycogène mis en réserve est dépolymérisé pour fournir à nouveau du glucose. Cette voie est la glycogénolyse et se déroule dans le foie et le muscle squelettique. Il ne s'agit pas de la voie parallèle à la glycogénogenèse mais d'une voie différente. En revanche, leur régulation est miroitement opposée. Ce processus se réalise en deux étapes pour obtenir du glucose-6-phosphate et ne nécessite pas d'ATP.

Dans un premier temps, grâce à la Glycogène phosphorylase, a lieu la phosphorolyse pour catalyser le clivage des liaisons $\alpha(1-4)$ et permettre la libération d'une molécule de glucose-1-phosphate. Cette réaction libère successivement des molécules de glucose-1-phosphate mais

s'arrête quatre résidus glycosyl avant la liaison $\alpha(1-6)$. La dégradation du glycogène est achevée par l'enzyme de débranchement du glycogène qui transfère trois des quatre unités de glucose restantes à l'extrémité d'une autre branche de glycogène qui va ainsi pouvoir être catalysée par la Glycogène phosphorylase pour délivrer le glucose-1-phosphate. La liaison $\alpha(1-6)$ est ensuite hydrolysée par l' $\alpha(1-6)$ glucosidase qui élimine ainsi la ramification et libère une molécule de glucose. Enfin, le glucose-1-phosphate est isomérisé en glucose-6-phosphate par la Phosphoglucomutase.

Le destin du glucose-6-phosphate est différent dans les deux tissus où il est synthétisé *de novo*. Le muscle utilise ce glucose-6-phosphate pour la glycolyse afin de fournir l'énergie nécessaire qui servira pour son propre fonctionnement en période de jeun ou lors de contraction musculaire.

Le foie peut utiliser le glucose-6-phosphate pour lui-même de la même manière que le muscle. En revanche, l'une des particularités hépatiques est la présence de l'enzyme Glucose-6-phosphatase responsable de la conversion du glucose-6-phosphate en glucose. Ainsi, le glucose est libéré via GLUT2 vers la circulation sanguine pour être mis à disposition des organes en nécessité.

La régulation hormonale de la glycogénolyse s'effectue au niveau de la Glycogène phosphorylase qui est activée par phosphorylation. Cet état de phosphorylation est sous contrôle de deux enzymes : la Phosphorylase kinase ou la Phosphorylase phosphatase. Le glucagon est la principale hormone qui permet la mobilisation du glycogène en ciblant principalement le foie. En activant son récepteur couplé aux protéines G, le glucagon induit l'activation de l'Adénylate cyclase qui conduit à l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc sert de second messenger pour activer la Protéine kinase A (PKA), responsable de la phosphorylation activatrice de la Glycogène phosphorylase kinase hépatique puis elle-même de la Glycogène phosphorylase.

À l'inverse, l'insuline, responsable de la stimulation de la glycogénèse va ainsi avoir l'effet opposé sur la glycogénolyse, en activant la Phosphatase PP1, inhibitrice de l'état phosphorylé de la Glycogène phosphorylase.

1.2. Lipolyse

La lipolyse consiste en un processus de dégradation des triglycérides permettant la libération du glycérol et des acides gras afin d'être utilisés comme source d'énergie. Cette voie a lieu principalement dans le tissu adipeux où les triglycérides sont contenus dans les gouttelettes lipidiques.

La dégradation des triglycérides est une série de réactions d'hydrolyse effectuée par des lipases qui libèrent à chaque fois un acide gras, et à la fin une molécule de glycérol. Les lipases en question, sont par ordre d'intervention : la Lipase triglycéride adipeuse (ATGL), la Lipase hormono-sensible (HSL) et la Monoacylglycérol lipase (MGL).

Les acides gras peuvent ensuite servir de substrat pour produire de l'acetyl-CoA pour le cycle de Krebs et ainsi fournir de l'énergie sous forme d'ATP, via la beta-oxydation.

Quant au glycérol libéré, il peut être utilisé pour fournir la voie de la glycolyse ou servir de précurseur du glucose (néoglucogénèse) dans le foie.

La lipolyse est ainsi régulée hormonalement par le glucagon qui via la voie AMPc-PKA induit la phosphorylation activatrice de HSL, alors que l'insuline favorise sa déphosphorylation.

2. Production de glucose endogène

Lorsqu'un jeûne est prolongé et que les réserves de glycogène commencent à s'épuiser, l'organisme produit du glucose endogène à partir de précurseurs non glucidiques par la voie de la néoglucogénèse.

2.1. Néoglucogénèse

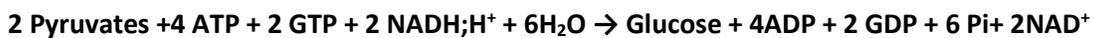
La néoglucogénèse se déroule dans le foie à partir de différents substrats comme le lactate, le pyruvate, le glycérol et les acides aminés glycoformateurs (ex : alanine). Ces précurseurs peuvent provenir directement du catabolisme hépatique mais aussi d'autres tissus. Le lactate est produit par le muscle squelettique (cycle de Cori) ou les globules rouges alors que le glycérol provient majoritairement de la lipolyse au niveau du tissu adipeux. Ces substrats sont ensuite transportés via la circulation sanguine jusqu'au foie pour être métabolisés.

La transformation du pyruvate en glucose *de novo* est la voie principale de la néoglucogénèse. Pour cela, le lactate est converti en pyruvate par la Lactate déshydrogénase, l'alanine est quant à

elle convertie en pyruvate par une réaction de transamination assurée par l'alanine aminotransférase.

La néoglucogenèse à partir du pyruvate est constituée de dix réactions enzymatiques reprenant les sept réactions réversibles de la glycolyse dans le sens opposé. La néoglucogenèse contourne les trois étapes irréversibles par l'intermédiaire d'enzymes spécifiques différentes. Ces enzymes sont impliquées dans les réactions 1, 8 et 10 de la néoglucogenèse et sont la cible de régulation.

Le bilan énergétique final de la néoglucogenèse est :



Les étapes de la néoglucogenèse sont mises en relief dans la Figure 2 en parallèle du processus de la glycolyse.

Étape 1: la conversion du pyruvate en phosphoénolpyruvate.

Cette réaction se réalise en deux phases. Dans un premier temps, le pyruvate entre dans la mitochondrie, pour être converti en oxaloacétate par la Pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate est ensuite transformé en malate afin de permettre sa sortie de la mitochondrie via son transporteur. Il sera alors à nouveau converti en oxaloacétate dans le cytosol. Cette transformation oxaloacétate-malate, et inversement, est assurée par la Malate déshydrogénase mitochondriale et cytosolique respectivement. L'étape finale est la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate catalysée par la Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Cette étape 1 nécessite dans son ensemble la consommation d'une molécule d'ATP et d'une molécule de GTP.

Étape 8 : Déphosphorylation du fructose-1,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate catalysée par la Fructose 1,6-bisphosphatase.

La Fructose 1,6-bisphosphatase, à l'inverse de la PK1, est inhibée de façon allostérique par les taux de Fructose-2,6-bisphosphate.

Étape 10 : Transformation du glucose-6-phosphate en glucose par la Glucose-6-Phosphatase. Cette réaction finale est la clé pour permettre la sortie cellulaire du glucose néosynthétisé et elle est commune avec la voie de la glycogénolyse.

Concernant le glycérol comme précurseur, ce dernier est catalysé en glycérol-3-phosphate par la Glycérol kinase puis oxydé en dihydroxyacétone-phosphate via la Glycérol-3-phosphate déshydrogénase afin de rejoindre la voie de la néoglucogénèse.

Le glucagon accélère la néoglucogénèse et par conséquent inhibe la glycolyse. Il permet d'augmenter l'apport de précurseurs essentiels tel que le glycérol en favorisant la lipolyse des triglycérides au niveau du tissu adipeux. Il stimule également le catabolisme des acides gras libérant de l'acétyl-CoA, qui est un activateur allostérique de la pyruvate carboxylase (étape 1). Par ailleurs, le glucagon, via sa voie de signalisation AMPc-PKA, active l'enzyme bidirectionnelle, la Fructose-2,6-bisphosphatase/PFK2 entraînant une diminution des niveaux de fructose-2,6-bisphosphate (74). Ainsi, contrairement à l'insuline, le glucagon inhibe PFK1 de la glycolyse mais aussi stimule de façon allostérique l'activité de la Fructose-1,6-bisphosphatase (étape 8).

La néoglucogénèse est également régulée au niveau transcriptionnel. Le glucagon induit la synthèse des enzymes catalysant les réactions irréversibles. En effet, le glucagon permet l'activation du facteur de transcription CREB par phosphorylation dépendante de PKA. CREB se lie sur la région promotrice du gène du coactivateur nommé *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha* (PGC-1 α) et induit sa transcription. PGC-1 α agit avec des facteurs de transcription comme *Forkhead box protein O1* (FOXO1) et *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α) pour stimuler l'expression des trois enzymes clés de la néoglucogénèse : la PEPCCK, la Fructose 1,6-bisphosphatase, et la Glucose-6-Phosphatase (75).

À l'inverse, l'insuline inhibe cette voie en favorisant les enzymes indispensables de la glycolyse. Cependant, son inhibition est en grande partie réalisée via sa régulation négative du facteur de transcription FOXO1. L'insuline a pour conséquence la phosphorylation de FOXO1 et sa rétention au niveau du cytoplasme suivi d'une possible dégradation et donc une incapacité à assurer son rôle transcriptionnel.

C. Dysfonctionnements de l'insuline

Tout dysfonctionnement ou dérégulation concernant les hormones qui contrôlent la glycémie peuvent induire l'apparition de physiopathologies, c'est le cas notamment de l'insuline avec le développement du diabète. Dans la pathogenèse du DT2, la régulation de l'insuline est altérée à la fois dans sa sécrétion et dans son action sur les tissus cibles.

1. Hyperinsulinémie et résistance à l'insuline

Avant l'établissement de l'hyperglycémie chronique du DT2, les patients passent par un stade intermédiaire. Cette phase prédiabétique est caractérisée par une mauvaise clairance du glucose induite par une insulino-résistance couplée à une hyperinsulinémie à jeun. Cependant, la chronologie des étapes de dérégulation de l'insuline est encore mal établie pour savoir de laquelle l'apparition de l'hyperinsulinémie ou celle de l'insulino-résistance est la première.

Pendant de nombreuses années, la résistance à l'insuline a été caractérisée comme le premier dysfonctionnement factoriel pouvant conduire à l'évolution du DT2. Les tissus périphériques ne répondant plus correctement au signal de l'insuline, l'hyperinsulinémie observée a été ainsi définie comme un mécanisme compensatoire à cette désensibilisation (76, 77). Cependant, l'hyperinsulinémie ne peut compenser l'insulino-résistance sur du long-terme (78, 79). Ainsi, une exposition au glucose (glucotoxicité) et une hypersécrétion d'insuline sur une période prolongée mènent à l'épuisement et à l'apoptose des cellules β et donc à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les patients DT2 deviennent alors hypo-insulinémiques et hyperglycémiques. Cette théorie est consolidée par certaines études menées chez des modèles murins génétiquement modifiés. A noter que les souris déficientes de manière globale pour le récepteur à l'insuline ne peuvent pas être utilisées comme modèle d'induction de la résistance à l'insuline puisque les souris décèdent rapidement après la naissance des suites d'une acidocétose diabétique (80). La résistance à l'insuline est donc induite chez des souris invalidées (*knock-out/KO*) de manière hétérozygote pour les gènes du récepteur à l'insuline *Insr* et du substrat du récepteur à l'insuline 1 (*Insulin receptor substrate 1/IRS-1*). Ces souris développent une hyperinsulinémie mais ont une tolérance normale au glucose (81). De plus, le blocage de la

signalisation de l'insuline chez des rongeurs traités avec des anticorps spécifiques contre le récepteur à l'insuline ou l'inhibiteur pharmacologique S961 induit également une hyperinsulinémie (82, 83).

Toutefois, ce concept a été récemment remis en question et il a été proposé que l'hyperinsulinémie ne serait pas une conséquence mais bien une cause de l'apparition de la perte de sensibilité à l'insuline (84-86). L'augmentation importante de la sécrétion d'insuline par les cellules β serait induite par des facteurs environnementaux dont notamment un excès nutritionnel et un régime alimentaire occidental (84, 87). Par exemple, une étude menée chez des personnes obèses suggère que l'hyperinsulinémie corrèle avec des niveaux sanguins élevés d'acides gras libres (88). Dans cette proposition, l'insulino-résistance est suggérée comme étant en premier temps, un mécanisme de protection des tissus pour éviter une hypoglycémie sévère (89). Néanmoins, la prolongation et l'accentuation de la résistance à l'insuline des tissus mène à la même conclusion que le précédent modèle, c'est-à-dire à l'épuisement des cellules β et le développement du DT2.

Cette hypothèse est soutenue par plusieurs études démontrant qu'une hyperinsulinémie induite génétiquement ou par traitement précède la résistance. Ainsi, une augmentation chronique des niveaux d'insuline circulants induite par une infusion prolongée chez des rongeurs entraîne une altération de la clairance glucidique et une insulino-résistance (90). De plus, des souris transgéniques pour plusieurs copies du gène humain de l'insuline, malgré une élévation des taux d'insuline plasmatiques attendue, deviennent intolérantes au glucose (91). D'autre part, sachant que les souris possèdent deux copies du gène codant pour l'insuline, *Ins1* et *Ins2*, des expériences ont permis de comparer celles totalement invalides pour *Ins1* avec celles invalidées pour *Ins1* et hétérozygotes pour *Ins2*. Les souris *Ins2^{+/-}* en comparaison avec les contrôles *Ins2^{+/+}* toutes déficientes pour *Ins1*, présentent une réduction des niveaux d'insuline qui induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline avec l'âge (92). Dans la même direction, l'administration d'un inhibiteur de la sécrétion d'insuline, le diazoxide, à des rats hyperinsulinémiques et obèses, permet une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose (93).

Ce modèle suggère que réduire l'hyperinsulinémie permettrait de contrecarrer le développement de la résistance à l'insuline.

La relation entre l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline est complexe et la détermination de cause à effet n'est pas totalement élucidée. Il est probable que ces deux dysfonctionnements n'apparaissent pas selon un modèle simple et linéaire mais plutôt qu'ils s'affectent mutuellement.

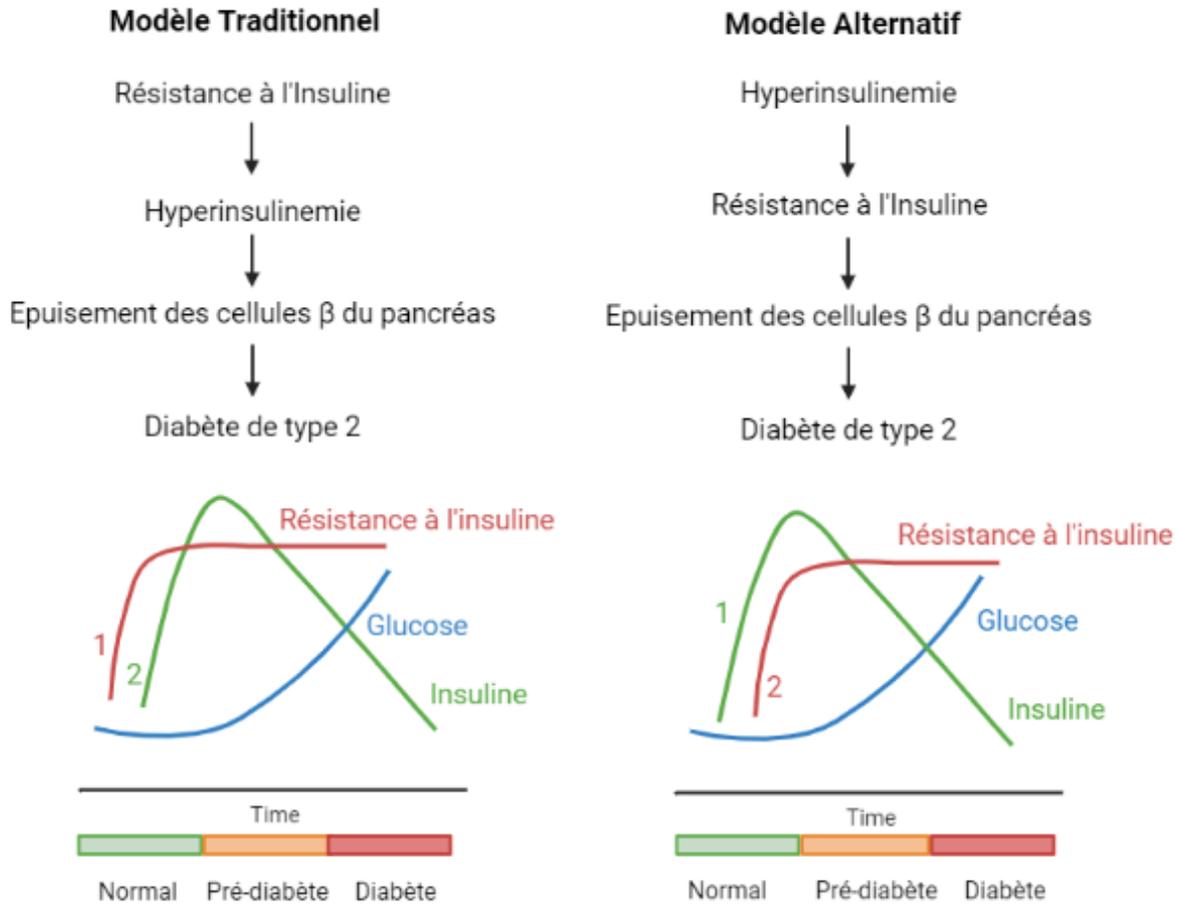


Figure 5. Différences de modèles représentatifs de l'apparition de l'hyperinsulinémie et de la résistance à l'insuline responsables du développement du diabète de type 2.

Adapté de (89)

Le modèle dit traditionnel suggère que la résistance à l'insuline précède l'hyperinsulinémie décrit comme un mécanisme compensatoire contre l'hyperglycémie. En opposition, le nouveau modèle alternatif propose que certains facteurs (génétiques et environnementaux) soient responsables d'une hypersécrétion d'insuline chronique et l'hyperinsulinémie qui en résulte provoque la résistance à l'insuline des tissus cibles. Néanmoins, ces deux modèles convergent vers la même conclusion qui est l'épuisement des cellules β pancréatiques conduisant à l'hyperglycémie chronique caractéristique du DT2.

2. Résistance à l'insuline : constituante clé du DT2

La résistance à l'insuline est un état pathologique définie par une diminution de la capacité des tissus cibles, à répondre à des niveaux physiologiques d'insuline. Elle est une composante pathogène prédominante dans le développement de troubles métaboliques tels que le syndrome métabolique et le DT2.

Cette désensibilisation est responsable de la dérégulation des voies métaboliques contrôlées par l'insuline, au niveau notamment du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux ayant pour conséquence une augmentation significative de la glycémie. Ainsi, chez les personnes atteintes d'insulino-résistance, l'absorption de glucose stimulée par l'insuline au niveau du muscle squelettique est réduite (45). De plus, par combinaison avec une étude de clamp hyperinsulinémique-euglycémique, il a été observé que le taux de synthèse de glycogène dans le muscle squelettique était significativement diminué chez les personnes DT2 (94). Les personnes résistantes à l'insuline, obèses ou non, présentent des taux élevés d'acides gras libres plasmatiques, représentatif d'une activité accrue de la lipolyse normalement inhibée par l'insuline (95). Au niveau hépatique, la production de glucose endogène est significativement augmentée chez des patients atteints de DT2 (96).

Bien que certaines mutations dans le gène du récepteur à l'insuline aient pu être identifiées comme étant à l'origine d'une résistance à l'insuline, il s'agit néanmoins de maladies rares comme les syndromes d'insulino-résistance de type A, de Donohue et de Rabson-Mendenhall.

Majoritairement l'insulino-résistance est étroitement liée à l'obésité. Il a été constaté que l'apparition d'un état d'inflammation systémique chronique de faible intensité en réponse à l'obésité joue un rôle majeur dans la résistance à l'insuline. Cette inflammation est induite par les adipokines et les cytokines pro-inflammatoires sécrétées respectivement par les adipocytes hypertrophiés et les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux. Parmi ces cytokines libérées, on retrouve TNF α (*Tumour Necrosis Factor alpha*), IL-6 et IL-1 β (*Interleukin 6 et 1 β*). De plus, l'obésité s'accompagne de niveaux élevés de lipides dans la circulation sanguine et dans les tissus non-adipeux comme le muscle squelettique et le foie. Ceci menant à des conditions de lipotoxicité à l'origine du développement de l'insulino-résistance dans ces tissus (97).

Cependant, ce n'est pas l'obésité globale ou l'IMC élevé en tant que tels qui déterminent la résistance à l'insuline puisqu'on observe une inégalité métabolique entre les sujets obèses. Il a été déterminé qu'une obésité dite viscérale, c'est-à-dire une expansion du tissu adipeux intra-abdominal, représente un risque plus élevé de résistance à l'insuline qu'une obésité périphérique (sous-cutanée) (98). En effet, les sujets obèses décrits comme métaboliquement normaux, et qui ne développeront ni de résistance ni le DT2, présentent des dépôts graisseux au niveau viscéral, des tissus hépatique et musculaire plus faibles ainsi que des taux d'acides gras libres circulants et des marqueurs inflammatoires plus bas que des personnes obèses résistantes à l'insuline (99). Il a bien été établi qu'un environnement cellulaire pro-inflammatoire et hyperlipidémique cause l'établissement de la résistance à l'insuline. Les cytokines sécrétées et les acides gras libres à l'origine de stress intracellulaires (stress du RE, stress oxydant et dysfonctionnement mitochondriale) induisent l'activation de sérine/thréonine kinases et d'adaptateurs inhibiteurs de la voie de signalisation de l'insuline au niveau des tissus sensibles (97). Néanmoins, des investigations sont nécessaires pour mieux déterminer si d'autres facteurs sont en cause dans la perturbation de la voie de signalisation de l'insuline et le développement de l'insulino-résistance.

II- Voies de signalisation de l'insuline (conditions normales ou dérégulées)

A. Récepteur à l'insuline

La première étape indispensable à la transmission du signal de l'insuline et à l'activation de ses voies de signalisation intracellulaires repose sur la liaison de l'insuline à son récepteur spécifique, tout simplement nommé le récepteur à l'insuline.

Le récepteur à l'insuline (RI) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs tyrosine kinase. Bien que l'insuline soit son principal ligand, le RI est aussi capable de se lier aux facteurs de croissance analogue à l'insuline (*Insulin-like growth factor 1 and 2/ IGF-1 and 2*), toutefois avec une affinité largement plus faible.

Chez l'humain, le RI est codé par un seul gène qui subit un épissage alternatif au niveau de l'exon 11 résultant de la formation de deux isoformes, la forme courte (A) et la forme longue (B). L'isoforme RI-A, contrairement à l'isoforme RI-B, ne possède pas une région de 12 acides aminés au niveau de l'extrémité C-terminale de la sous-unité α . Ces deux isoformes présentent une affinité de liaison pour l'insuline similaire. En revanche, RI-A possède une affinité fortement plus élevée pour la proinsuline et le IGF-2 que l'isoforme RI-B, bien que relativement plus faible que son affinité pour l'insuline. Les deux isoformes sont exprimées en abondance différente dans plusieurs organes et tissus et au cours du développement. Le RI-A est fortement exprimé pendant la croissance fœtale alors que l'expression de RI-B augmente au cours de la différenciation et se trouve majoritairement présent dans les tissus adultes comme le foie et le tissu adipeux (100). Ces différences suggèrent des fonctions biologiques diverses, le RI-A serait engagé dans la stimulation de la prolifération alors que RI-B serait plutôt impliqué dans des effets métaboliques.

Avant d'être fonctionnel et présent au niveau de la membrane plasmique, le RI est d'abord synthétisé sous la forme d'une pro-récepteur à l'insuline (pro-RI) à chaîne unique qui subit plusieurs étapes de maturation dont un clivage protéolytique par l'enzyme pro-convertase Furine, une étape de glycosylation puis de repliement et enfin de dimérisation.

Le RI est un hétérotétramère constitué de deux sous-unités α et deux sous-unités β liées entre elles par des ponts disulfures. Les deux sous-unités α forment le domaine extracellulaire du

récepteur où se fixe l'insuline. Chaque chaîne α est constituée de deux domaines répétés riches en leucine, L1 et L2, séparés par un domaine riche en cystéine. Ensuite, sont présents trois domaines de fibronectine de type III (FNIII) dont le premier FNIII-1 est entièrement dans la sous-unité α . Le second FNIII-2 est entrecoupé par un domaine d'insertion qui sert de site de clivage de la Furine entre les chaînes α et β . La seconde partie du domaine FNIII-2 est donc située au niveau de la chaîne β suivi par le dernier domaine FNIII au complet sur la portion extracellulaire de la sous-unité β . Chaque chaîne β comprend, en plus de cette partie extracellulaire, un domaine transmembranaire, juxta-membranaire, suivi d'une partie complètement intracellulaire contenant le domaine à activité tyrosine kinase et enfin une région carboxylique terminale (101).

Les sous-unités α sont liées entre elles par des liaisons disulfures entre leurs domaines FNIII-1 (Cys 524) et FNIII-2 respectifs (Cys682, Cys683 et Cys685). Les chaînes α et β sont quant à elles liées par un seul pont disulfure par la Cys647 au niveau du FNIII-2 de la chaîne α et la Cys860 de la sous-unité β .

En se liant aux sous-unités α de son récepteur, l'insuline initie une modification conformationnelle, responsable du rapprochement de chaque sous-unité β . Ceci induit la transphosphorylation des domaines tyrosine kinase au niveau des trois résidus tyrosine Y1146, Y1150 et Y1151. Suite à ces phosphorylations activatrices, l'activité kinase conduit à l'autophosphorylation des résidus tyrosines contenus dans les régions juxtamembranaires (Y953 et Y960) et carboxyl-terminales (Y1316 et Y1322) (102). Par la suite, la phosphorylation de la tyrosine pY960 contenue dans un motif canonique de liaison (NPXpY) au domaine PTB (*Phosphotyrosine binding domains* / de liaison à la phosphotyrosine) sert de point d'ancrage pour les principales protéines initiatrices de la signalisation de l'insuline comme les IRS ou encore l'adaptateur SHC (*Src homology/collagen*).

L'activation de ces substrats par le RI permet l'enclenchement des deux voies principales de signalisation de l'insuline qui sont la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) – AKT/Protein kinase B et la voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) – ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*). Les différentes voies de la signalisation de l'insuline sont représentées dans le Figure 6.

B. Voies principales en aval du Récepteur à l'insuline

1. Substrats du Récepteur à l'insuline (IRS)

Les principaux substrats du RI appartiennent à la famille des IRS. Ce sont des protéines cytoplasmiques qui ne contiennent pas d'activité enzymatique mais qui permettent la coordination et la transmission du signal entre le RI et les voies intracellulaires. Cette famille est composée de 6 membres (IRS 1-6) qui sont tous constitués en N-terminale d'un domaine d'homologie de la pleckstrine (PH) suivi par un domaine PTB. Néanmoins, les divers membres présentent des différences au niveau structurel et de l'expression tissulaire.

IRS-1 et IRS-2 sont exprimés de manière ubiquitaire tandis qu'IRS-4 se trouve principalement dans le cerveau, les reins et le thymus (103). Quant à la protéine IRS-3, elle n'est pas présente chez l'humain, elle est exprimée chez les rongeurs dans le tissu adipeux, le foie et les poumons (97, 104). Les protéines IRS-5 et IRS-6 n'ont été identifiées que récemment et sont décrites comme partageant une homologie dans leur extrémité N-terminale avec les autres IRS mais ayant une extrémité C-terminale tronquée; elles ne sont pas caractérisées comme des substrats pertinents du RI (105, 106).

IRS-1 et 2 sont les principaux médiateurs de la signalisation dépendante de l'insuline. À la suite de l'activation du RI par l'insuline, les IRS sont recrutés à la membrane plasmique où leur domaine PH va médier l'interaction avec les phospholipides membranaires permettant au domaine PTB d'établir un point d'ancrage au niveau de la tyrosine Y960 phosphorylée du RI. Une fois l'interaction établie, le RI, par son activité kinase, phosphoryle plusieurs résidus tyrosines spécifiques de la partie C-terminale des IRS, qui permettent le recrutement de différentes protéines par leur domaine SH2 (*Src Homology 2*/homologie Src 2). Par exemple, les tyrosines Y612 et Y632 d'IRS-1 sont impliquées dans le recrutement de PI3K (107).

Les IRS phosphorylés peuvent interagir avec plusieurs protéines régulatrices de la signalisation de l'insuline dont la principale est PI3K mais également GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) ou encore la phosphotyrosine phosphatase SHP2 (*SH2 domain protein tyrosine phosphatase-2*) et d'autres.

Bien que IRS-1 et IRS-2 soient très similaires, des expériences d'inactivation génique de chacun des gènes *Irs1* et *Irs2*, effectuées chez la souris, ont permis de mettre en évidence des fonctions biologiques différentes. Ainsi, les souris déficientes pour IRS-1 (*Irs1*^{-/-}) développent un retard de croissance embryonnaire et post-natale et une taille globale plus petite en comparaison aux souris contrôles (108). Ce n'est pas le cas des souris déficientes pour IRS-2 (*Irs2*^{-/-}), malgré qu'elles aient des cerveaux plus petits et des dysfonctions dans le développement neuronal (109).

Pour ce qui est du métabolisme glucidique, les souris *Irs1*^{-/-} ne développent pas le diabète mais présentent une résistance à l'insuline dans le muscle squelettique et le tissu adipeux à l'origine d'une diminution du transport du glucose induit par l'insuline (110-113). L'action de l'insuline sur le foie n'est pas impactée dans les souris déficientes pour IRS1 suggérant une compensation par IRS-2 (113). En revanche, les souris *Irs2*^{-/-} deviennent diabétiques due à une altération de l'action de l'insuline au niveau hépatique couplée à une perte des cellules β du pancréas (114, 115). Ainsi, IRS-1 semble être le principal substrat médiateur de la signalisation de l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux alors que IRS-2 semble jouer un rôle plus important dans le tissu hépatique.

2. Voie PI3K-AKT et cascades de signalisation dépendantes

La principale voie régulatrice des effets métaboliques de l'insuline est celle de la voie PI3K-AKT qui est responsable du contrôle du transport du glucose (translocation de GLUT4), de la synthèse du glycogène (GSK3), de la synthèse protéique (mTORC/*mammalian target of rapamycin complex*) ainsi que de la régulation des facteurs transcriptionnels SREBP-1c ou FOXO1 impliqués dans les voies métaboliques lipidiques et néogluco-géniques.

a) Initiation de la voie : PI3K-AKT

La phosphorylation des IRS par le RI induit le recrutement et l'activation de la protéine PI3K. Il existe trois classes de PI3K divisées en fonction de leurs caractéristiques structurelles et de la spécificité du substrat. Pour la description de cette voie de signalisation, nous nous concentrerons sur la PI3K de classe IA.

PI3K est une kinase lipidique qui permet la phosphorylation d'un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) pour générer du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). PI3K est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110). Chacune de ces sous-unités existe sous différentes isoformes. Chez l'humain, les isoformes de la sous-unité catalytique p110 : p110 α , p110 β et p110 δ sont codées respectivement par les trois gènes *PIK3CA*, *PIK3CB* et *PIK3CD*. Les isoformes de la sous-unité régulatrice p85 α , p55 α , p50 α sont codées par *PIK3R1* ; p85 β est codée par *PIK3R2* et enfin p55 γ par *PIK3R3* (116).

La sous-unité régulatrice p85 de PI3K est celle dont le domaine SH2 est recruté au niveau des tyrosines phosphorylées des IRS. Lorsque celle-ci interagit avec les IRS, elle va activer la partie catalytique p110 permettant la formation de PIP3. Le PIP3 agit comme messenger secondaire afin de recruter à la membrane plasmique des protéines contenant des domaines PH.

La perturbation de cette voie par délétion des gènes des sous-unités catalytiques p110 α ou β dans le foie entraîne chez la souris une altération de la sensibilité à l'insuline et une intolérance au glucose (117, 118).

Par la suite, la formation de PIP3 entraîne le recrutement à la membrane des kinases AKT et PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), conduisant à la phosphorylation d'AKT au niveau de la thréonine T308 par PDK1 et à son activation partielle (119, 120) . Pour que l'activation soit complète, AKT doit être ensuite phosphorylé sur son résidu sérine S473 par le complexe mTORC2 (121).

AKT est une sérine-thréonine kinase pour laquelle il existe trois 3 isoformes différentes (AKT1-3). Elles possèdent toutes une structure commune avec un domaine PH, un domaine kinase suivi d'un domaine régulateur C-terminal mais assurent des fonctions biologiques différentes qui ont été décrites à l'aide de modèle *knock-out* chez la souris. AKT1 est exprimé de façon ubiquitaire et se trouve impliqué dans la croissance et la survie cellulaire puisque les souris *Akt1*^{-/-} présentent des retards de croissance importants (122). AKT3 est présent notamment au niveau du cerveau et la délétion de son gène entraîne chez la souris une diminution du volume cérébral (123). Les

souris *Akt1*^{-/-} et *Akt3*^{-/-} n'ont pas d'altération du métabolisme glucidique régulé par l'insuline (122, 123).

AKT2 est celui qui est responsable de la transmission du message insulinémique et de ses régulations métaboliques. En effet, l'isoforme AKT2 est celle qui est la plus fortement exprimée dans les tissus insulino-sensibles du muscle squelettique, du tissu adipeux et du foie. De plus, les souris déficientes pour AKT2 présentent une sévère intolérance au glucose, sont insulino-résistantes et deviennent diabétiques (124).

Ainsi, lorsque AKT2 est phosphorylé et actif en réponse à l'insuline, il devient un composant central de la régulation métabolique par le nombre important de ses substrats.

b) Translocation du transporteur de glucose GLUT4

Dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, AKT activé enclenche la cascade de signalisation à l'origine de la translocation du transporteur GLUT4 pour stimuler l'entrée du glucose dans ces organes. Pour cela, AKT phosphoryle plusieurs protéines activatrices de GTPases (*GAP/GTPase-activating protein*) qui sont : son substrat AS160 (*AKT substrate of 160 kDa*), aussi nommé TBC1D4 (*TBC1 domain family member*), et la protéine TBC1D1. Ces GAP ont pour cibles les protéines GTPases de la famille des Rab. Les protéines Rab sont des régulateurs majeurs du trafic intracellulaire passant de la formation des vésicules, à leur déplacement le long du cytosquelette, aux différents processus d'attache et de fusion membranaire. Les protéines Rab effectuent un cycle entre un état lié au GDP (inactif) et un état lié au GTP (actif) contrôlé par des GAP et des GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). L'activation de la GTPase par l'échange du GDP pour du GTP est catalysé par les GEF alors que les GAP sont responsables de l'hydrolyse du GTP en GDP et donc du retour à l'état inactif de la GTPase.

En absence d'insuline, TBC1D4 et TBC1D1 se trouvent au niveau des vésicules de stockage de GLUT4 et maintiennent les Rab GTPases dans un état inactif empêchant la translocation de GLUT4. À la suite d'une stimulation à l'insuline, les phosphorylations de TBC1D4 et TBC1D1 induites par AKT, inhibent leur activité GAP conduisant ainsi à la levée de l'effet inhibiteur sur les Rab et à la translocation des vésicules et de la présence de GLUT4 à la surface des cellules. Dans

les muscles squelettiques, les cibles des GAP sont Rab8A, Rab13 et Rab14, alors que dans le tissu adipeux, Rab10 semble être la principale GTPase impliquée dans la translocation de GLUT4 (125-127).

c) Voie mTORC1 : synthèse protéique et contrôle lipidique

L'insuline contrôle à la fois la synthèse protéique et le processus de lipogénèse via l'activation par AKT de la voie de signalisation mTORC1.

mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) est une sérine/thréonine kinase qui existe dans deux complexes constitués de plusieurs protéines distinctes : le complexe 1 (mTORC1) et le complexe 2 (mTORC2).

Les contrôles de la protéogénèse et de la synthèse des lipides sont assurés par le complexe 1. mTORC1 est constitué de la sous-unité catalytique mTOR, de RAPTOR (*Regulatory Associate Protein of mTOR*) et de mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) et DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*).

AKT médie les phosphorylations inhibitrices de deux régulateurs négatifs de l'action de mTORC1 : PRAS40 et TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex 2*). PRAS40 bloque l'activité de mTOR en se liant au complexe mTORC1. La phosphorylation de PRAS40 sur son résidu thréonine T246 par AKT réduit ainsi cette interaction et conduit à la levée de l'inhibition (128, 129). TSC2 forme un complexe protéique avec TSC1 et TBC1D7, qui régule négativement la voie de mTOR via son activité GAP pour la GTPase RHEB (*Ras homolog enriched in brain*). Ainsi, lorsque AKT phosphoryle TSC2 sur ses sites S939 et T1462, ceci conduit à une inactivation de son activité GAP et une augmentation de l'état actif de RHEB (lié au GTP) permettant l'activation de mTORC1 (130, 131). Une fois totalement activé, mTOR exerce sa fonction kinase directement sur ses substrats effecteurs de la synthèse protéique *de novo* : 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) et p70S6K aussi nommée S6K1 (*Ribosomal protein S6-kinase 1*). La phosphorylation de 4E-BP1 conduit à sa dissociation avec eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) qui une fois libéré peut assurer sa fonction de facteur d'initiation de la traduction. Quant à S6K1, elle régule la biosynthèse protéique via son grand nombre de substrats impliqués dans divers processus comme : l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe via eIF4B, mais aussi l'élongation de

la traduction en inhibant la kinase eEF2 (*eukaryotic elongation factor-2 kinase*) ou encore la régulation de la fonction des ribosomes par phosphorylation de la protéine ribosomale S6 impliquée dans la croissance et la taille cellulaire (132).

Enfin, mTOR favorise la lipogenèse en ciblant le facteur de transcription SREBP-1c. SREBP-1c est synthétisé sous une forme inactive et maintenu au niveau de la membrane du RE avec les protéines SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*) et INSIGs (*insulin-induced gene*). La maturation de SREBP-1c nécessite la dissociation de SREBP-SCAP et INSIG permettant son transport vers l'appareil de Golgi où SREBP-1c est mûri par clivage protéolytique. SREBP-1c mûri est ensuite transloqué vers le noyau pour stimuler la transcription des gènes de la lipogenèse tel que *FASN*. Le mécanisme d'action de mTOR sur SREBP-1c n'est pas totalement élucidé. En revanche, il a pu être démontré, chez le rongeur, que la maturation de SREBP-1c et l'induction de sa transcription induite par l'insuline était dépendante de mTORC1 (133).

d) Induction de la glycogénèse et inhibition de la néoglucogénèse et de la lipolyse

1. Stimulation de la glycogénèse

L'insuline assure notamment son rôle hypoglycémiant en stimulant la mise en réserve du glucose en glycogène. Pour cela, AKT activée, conduit à la phosphorylation de la kinase de la glycogène synthase GSK-3 α sur son résidu sérine S21 et GSK-3 β sur sa sérine S9 (68, 134). Ces phosphorylations sont responsables de l'inactivation de GSK3 ayant pour effet l'activation de la glycogène synthase et donc de la production de glycogène. Il a été suggéré que d'autres mécanismes moléculaires indépendants de GSK3 pouvaient être mis en cause dans la régulation de la synthèse glycogénique, impliquant la phosphatase PP1. Récemment, une étude a suggéré un nouveau substrat d'AKT, PPP1R3G, une sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 1 (PP1). AKT, en phosphorylant PPP1R3G, stimule sa liaison à la glycogène synthase et entraîne sa déphosphorylation. La phosphorylation de PPP1R3G améliore chez la souris la clairance du glucose et la sensibilité à l'insuline (70).

2. Inhibition de la néogluco-genèse

L'insuline inhibe principalement la néogluco-genèse via des mécanismes transcriptionnels. D'une part, GSK3 est impliqué dans la régulation de plusieurs facteurs de transcription. Il a été démontré qu'en plus d'être impliquée dans la glyco-genèse, l'inhibition de GSK3 conduit à la diminution de l'expression génique des protéines impliquées dans la néogluco-genèse qui sont PECK et la Glucose-6-phosphatase (135).

Néanmoins, l'expression des gènes de la néogluco-genèse semble être principalement sous le contrôle des facteurs de transcription FOXO. AKT phosphoryle FOXO-1 au niveau de ses résidus T24, S256 et S319 (136). Les phosphorylations des trois résidus conservés des facteurs FOXO servent de point d'ancrage pour la liaison des protéines 14-3-3 qui empêche la translocation de FOXO au noyau. En séquestrant FOXO au cytoplasme, ce dernier ne peut donc pas se fixer au niveau des séquences promotrices contenant les sites de liaison FOXO, des gènes *PECK* et *G6P* (137). De plus, AKT est aussi responsable de la phosphorylation du coactivateur transcriptionnel PGC-1 α qui interagit avec FOXO, empêchant son recrutement au niveau des promoteurs des gènes cibles (138). La transcription n'est pas induite et la néogluco-genèse est inhibée.

3. Inhibition de la lipolyse

L'inhibition de la lipolyse survient également par l'inhibition de FOXO et PGC-1 α qui sont responsables du contrôle transcriptionnel de certains gènes, tel que celui codant pour la lipase ATGL (139).

Par ailleurs, la lipolyse est majoritairement régulée par la kinase PKA qui induit la phosphorylation activatrice de l'enzyme HSL. L'insuline inhibe cette voie via AKT qui phosphoryle et active directement la phosphodiesterase 3B (PDE3B), responsable de la dégradation d'AMPc, régulateur positif de PKA (140).

3. Voie MAPK/ERK

L'insuline induit une autre cascade de signalisation, indépendante de PI3K, il s'agit de la voie MAPK/ERK qui stimule la croissance, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

La voie des MAPK peut être enclenchée par les IRS ou des protéines adaptatrices SHC. Les protéines SHC sont recrutées au niveau du RI, de la même manière que les IRS via leur domaine PTB, et sont ensuite directement phosphorylées par le RI.

L'adaptateur GRB2 interagit avec les tyrosines phosphorylées des IRS et/ou SHC via son domaine SH2 puis se lie et active la protéine SOS (*Son of Sevenless*) à activité GEF régulatrice des protéines de GTPases de la famille RAS. La protéine SOS favorise le remplacement du GDP en GTP sur la protéine RAS et promeut son activation. Ensuite, RAS enclenche une cascade de phosphorylations activatrices impliquant plusieurs sérine/thréonine kinases de la famille des MAPK. En détail, RAS active la kinase RAF qui elle-même stimule ses substrats MEK1 et 2 qui phosphorylent ERK1 et 2 (97).

A la suite de leur activation, ERK1/2 promeuvent un grand nombre de processus cellulaires en agissant directement sur des substrats cytosoliques ou en régulant l'expression de gènes spécifiques grâce à sa capacité de transloquer au noyau. Par exemple, ERK1/2 peuvent moduler la réorganisation du cytosquelette en phosphorylant des protéines associées aux microtubules (MAP) mais peuvent aussi favoriser la phosphorylation de facteurs de transcription comme ELK1 (*ETS Like-1*) ou c-MYC dans le compartiment nucléaire pour promouvoir la prolifération (141).

La voie de RAS/MAPK/ERK est fréquemment vue comme la branche de la signalisation de l'insuline n'étant pas responsable des effets métaboliques hypoglycémisants. En effet, l'inhibition pharmacologique de la voie MAPK n'affecte pas l'absorption de glucose, la lipogenèse et la synthèse glycogénique stimulées par l'insuline dans des adipocytes et myotubes en culture (142). Néanmoins, les souris déficientes pour ERK1 sont protégées de la résistance à l'insuline et de l'obésité induite par un régime gras accompagnée d'une diminution de l'adipogenèse (143).

4. Modulateurs négatifs de la signalisation du RI et développement de la résistance à l'insuline

Plusieurs processus moléculaires sont mis en place en condition physiologique afin d'atténuer ou de mettre fin à la signalisation de l'insuline à la suite de sa fixation sur son récepteur. Ces mécanismes contrôlent à la fois l'internalisation intracellulaire du RI mais également les niveaux d'activation du RI et des IRS par des modulations de phosphorylations contrôlées par différentes

tyrosine phosphatases et sérine kinases. Les kinases impliquées dans la transduction du signal de l'insuline sont également régulées négativement par des phosphatases.

Cependant, la dérégulation de ces modulateurs négatifs peut induire le développement de la résistance à l'insuline.

a) Internalisation et trafic du Récepteur à l'insuline

Pour mettre fin au signal de l'insuline, les complexes RI-insuline activés sont internalisés par endocytose. Cette internalisation conduira ensuite aux étapes de dissociation du complexe et à la dégradation de l'hormone. Le devenir du récepteur est modulé par le trafic endosomal, les RI internalisés seront soit dégradés ou, pour la majorité, recyclés.

L'internalisation du RI est majoritairement induite par sa liaison avec son ligand et l'activation de son domaine tyrosine kinase (144). Les processus d'internalisation du RI ne sont pas totalement élucidés à ce jour. Il semblerait que le RI soit principalement internalisé par l'endocytose dépendante de la clathrine. En revanche, des évidences montrent que dans certains types cellulaires, comme les adipocytes, elle pourrait plutôt être médiée par l'endocytose par voie de cavéoline (145).

Dans le cas de l'endocytose dépendante de la clathrine, celle-ci, ne pouvant pas se lier directement à la membrane plasmique, nécessite le recrutement du complexe AP2 pour la connexion entre les récepteurs cibles (RI), les protéines associées CLASP (*Clathrin-associated sorting protein*) et les lipides de la membrane. Plusieurs mécanismes initiés par le RI sont possibles pour permettre le recrutement du complexe AP2.

- 1) D'une part, le RI autophosphorylé peut interagir directement avec MAD2 (*Mitotic Arrest Deficient 2*) qui se lie à son tour aux protéines BUBR1 (*Mitotic checkpoint kinase BUB1 beta*) - CDC20 (*Cell Division Cycle protein 20 homolog*), responsables du recrutement de AP2 (146). Ce système est régulé par la protéine p31^{comet} qui inhibe l'interaction BUBR1-CDC20-AP2.
- 2) De plus, un autre processus proposé implique l'activation de la voie de signalisation ERK par le RI. ERK est ensuite recruté au niveau du IRS-1 tri-phosphorylé en tyrosine (Y612, Y632 et Y662) par le RI, et induit à son tour trois nouvelles phosphorylations au niveau de sérine (S616,

S636 et S666). Ces phosphorylations en sérine conduisent à la liaison de la phosphatase SHP2 sur IRS-1 qui déphosphoryle les résidus tyrosines et facilite le recrutement d'AP2 (147).

- 3) Enfin, le RI peut aussi phosphoryler la protéine transmembranaire CEACAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*) sur son domaine intracellulaire (Y488). Cette phosphorylation de CEACAM1 entraîne le recrutement de SHC au niveau de son domaine SH2. SHC recruté va pouvoir lier son domaine PTB au RI, formant ainsi un complexe RI-SHC-CEACAM1. SHC s'associe ensuite avec AP2 (148).

Le recrutement de la clathrine par AP2 et sa polymérisation conduit à la formation de fosses recouvertes de clathrine et au début de l'invagination.

L'endocytose indépendante de la clathrine est médiée par la formation de cavéoles qui sont des invaginations de la membrane plasmique, enrichies en cholestérol, glycosphingolipides et constituées des protéines : cavéolines et cavines. Le RI activé phosphoryle directement la cavéoline-1 au niveau de son résidu tyrosine Y14 (149). La phosphorylation de la cavéoline-1 est responsable de l'initiation de l'endocytose.

La scission des cavéoles et des vésicules de clathrine est régulée par la dynamine, une protéine GTPase. Les vésicules recouvertes de clathrine perdent ensuite leur manteau grâce à l'action de l'ATPase Hsc70. Les vésicules générées par les différentes voies s'engagent dans le même transport endosomal.

Les vésicules contenant les complexes RI-insuline fusionnent avec des compartiments pléomorphiques vésiculo-tubulaires situés à proximité de la membrane plasmique, il s'agit des endosomes précoces. Ce sont des endosomes à pH légèrement acide (pH=6,2) où a lieu la dissociation de l'hormone et du récepteur. Ils vont servir de centre de triage pour le devenir des RI qui seront soit réacheminés à la membrane plasmique via les endosomes de recyclage ou dirigés vers les endosomes tardifs qui mèneront à leur dégradation par les lysosomes. Le trafic entre ces différents endosomes est assuré par l'intermédiaire des protéines GTPases de la famille Rab dont l'état d'activation est régulé par des GAP et GEF. Selon leur nature, les Rab GTPases interagissent et recrutent des effecteurs différents, leur permettant d'assurer des fonctions spécifiques. Leur diversité permet de réguler les différentes voies du trafic comme le transport le

long du cytosquelette ou l'amarrage et la fusion au compartiment cible. Les Rab sont donc localisées au niveau de compartiments précis et peuvent servir de marqueurs pour le suivi du transport endosomal. Ainsi, Rab5 se trouve au niveau des endosomes précoces, Rab4 ou Rab11 sont au niveau des endosomes de recyclage et Rab7 est présente sur les endosomes tardifs et assure leur maturation et fusion avec les lysosomes (150).

Perturbation du trafic

Les contrôles et dérégulations de l'endocytose du RI ne sont pas encore bien compris. On observe que les souris avec une délétion globale ($Cc1^{-/-}$) ou seulement hépatique ($Cc1^{fl/fl}; AlbCre$) du gène codant pour CEACAM présentent une hyperinsulinémie chronique causée par une altération de la clairance de l'insuline à l'âge de 2 mois, sans changement de sécrétion d'insuline. Elles deviennent ensuite insulino-résistantes 4-5 mois plus tard (151, 152). De plus, des études menées sur des monocytes et adipocytes de patients diabétiques montrent que l'internalisation des récepteurs de l'insuline était significativement plus faible que chez des sujets sains (153, 154). On peut supposer qu'une inhibition de l'internalisation de l'ensemble RI-insuline conduira à une mauvaise élimination de l'insuline, responsable du développement de la résistance à l'insuline.

À l'inverse, les souris déficientes spécifiquement dans le foie du régulateur négatif d'endocytose, $p31^{comet}$, ont une réduction des taux des RI à la membrane plasmique des hépatocytes et deviennent insulino-résistantes (155). Il a aussi été observé que le nombre de RI au niveau de la membrane des cellules du foie était diminué chez les souris *ob/ob* et les personnes atteintes de DT2 (147, 156). L'étude de la mutation génétique responsable de la substitution de l'acide glutamique en lysine en position 460 du RI, chez les personnes atteintes du syndrome Donohue, a pu révéler qu'une dissociation altérée de l'insuline au RI dans les endosomes induit un recyclage anormal du RI, responsable de la résistance sévère à l'insuline (157). La diminution du nombre de RI disponibles sur la membrane plasmique peut être provoquée par une dérégulation des taux d'endocytose mais aussi par un défaut du recyclage des RI.

L'endocytose des complexes RI-insuline permet ainsi d'assurer deux fonctions en une : la clairance de l'insuline via sa dégradation intracellulaire dans le foie et le renouvellement du bassin

de RI déphosphorylés disponibles à la surface de la cellule. La dérégulation de l'endocytose et du trafic intracellulaire du RI est un mécanisme potentiel sous-jacent à la résistance à l'insuline.

b) Mécanismes de déphosphorylation : implication des phosphatases

Le message de l'insuline est transmis au niveau intracellulaire par les réactions en série de phosphorylations. Les phosphatases assurent un mécanisme de rétroaction négatif majeur en déphosphorylant ces protéines engagées dans la voie. Cependant, il a été démontré que cette inhibition par les phosphatases joue aussi un rôle dans le développement de la résistance à l'insuline.

Les protéines tyrosine phosphatases (PTP) atténuent la transmission du signal en déphosphorylant les résidus tyrosine du RI et des IRS. Plusieurs PTP ont été identifiées pour participer à cette déphosphorylation comme LAR (*Leukocyte common antigen related*), SHP1, SHP2 ou notamment PTP1B (158). En effet, la surexpression de PTP1B dans des cellules musculaires induit une inhibition de la phosphorylation du RI qui entraîne une diminution de son association avec IRS-1 et donc de l'activation ce dernier (159). Les conséquences sont une diminution de la synthèse en glycogène et du transport du glucose. À l'inverse, les souris déficientes pour PTP1B présentent une augmentation de la phosphorylation du RI en réponse à l'insuline dans le foie et les muscles squelettiques. Ces souris ont une meilleure sensibilité à l'insuline et sont protégées contre l'obésité et la résistance à l'insuline induite par un régime riche en graisses (160).

L'action de PI3K est, elle, régulée négativement par les phosphoinositides phosphatases PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) et SHIP2 (*SH2-containing 5'-inositol phosphatase 2*) qui déphosphorylent le produit PIP3. L'inactivation totale des gènes codant pour les phosphoinositides phosphatases PTEN et SHIP2 conduit respectivement à une létalité embryonnaire ou périnatale. Néanmoins, leur importance a pu être mise en évidence dans des modèles de souris hétérozygotes *Pten*^{+/-} et *Inpp1*^{+/-} (*Inpp1* codant pour SHIP2) qui présentent une amélioration de la sensibilité à l'insuline (161, 162).

L'activation d'AKT est ainsi perturbée via l'action des phosphoinositides phosphatases qui empêchent son recrutement à la membrane plasmique. En effet, les souris transgéniques surexprimant SHIP2 présentent une diminution de l'activation d'AKT dépendante de l'insuline dans les tissus insulino-sensibles (163). Cependant, la phosphorylation d'AKT peut être aussi directement ciblée par des protéines phosphatases des résidus sérine/thréonine, comme PP1, PP2A/B ou PHLPP (*PH domain and Leucine rich repeat PP*). Par exemple, les niveaux de PHLPP sont augmentés dans les tissus de personnes obèses insulino-résistantes (164). PP2A est responsable de la déphosphorylation d'autres substrats de la voie de l'insuline comme p70S6K, ERK, PKC (97). Il a été suggéré que les acides gras libres comme le palmitate ou des conditions de glucotoxicité, entraîneraient une suractivation de la phosphatase PP2A, responsable de l'altération de l'action de l'insuline (165, 166).

c) Phosphorylations inhibitrices de IRS-1 : implication de sérine/thréonine kinases

L'un des mécanismes clés du rétrocontrôle négatif de la voie de l'insuline implique des protéines sérine/thréonine kinases qui vont notamment phosphoryler les IRS. Contrairement aux phosphorylations des tyrosines des IRS qui activent la voie de signalisation, les phosphorylations en sérine peuvent induire des régulations positives ou négatives. Certaines de ces phosphorylations induisent la dissociation des IRS avec le RI, la déphosphorylation de leurs résidus tyrosines et peuvent même mener à leur dégradation. Les kinases activées par l'insuline capables de phosphoryler les IRS en S/T sont IKK (*inhibitor of nuclear factor κ B kinase*), PKC (*protein kinase C*), mais aussi mTOR, p70S6K, et surtout JNK (*c-Jun terminal kinase*). En revanche, plusieurs facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-1 β), les acides gras libres ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial et le stress du RE peuvent eux aussi activer ces enzymes conduisant à une inhibition anormale de la voie et à la pathogenèse de l'insulino-résistance.

Par exemple, JNK est la dernière kinase activée de l'une des trois voies des MAPK. En amont, MAP3K est activé et phosphoryle les enzymes MAP2K (MKK4 et MKK7), qui, à leur tour, phosphorylent et activent JNK. Ensuite, JNK phosphoryle IRS-1 sur plusieurs de ses sérines dont S307 qui est l'un des résidus les plus étudiés pour son association avec l'insulino-résistance. En

condition normale, JNK est activé par l'insuline. Cependant, en condition inflammatoire ou hyperlipidémique, les cytokines comme TNF α ou les acides gras libres, en se fixant sur leurs récepteurs respectifs TNFR ou TLR4 (*Toll Like Receptor 4*), induisent leurs voies de signalisation et activent aussi JNK. Ces agents peuvent aussi activer la kinase IKK qui est elle aussi impliquée dans ce rétrocontrôle. Ces deux kinases sont aussi induites via l'activation de la voie IRE1 α (*Inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α*) en réponse au stress du RE (167, 168). Ainsi, les souris *Jnk1*^{-/-} et *Ikk β* ^{+/-} sont protégées contre le développement de la résistance à l'insuline induite par une diète riche en graisses (169, 170). À l'inverse, l'obésité induit un stress du RE qui conduit à l'hyperactivation de JNK et à la phosphorylation en sérine de IRS-1, responsable du développement de la résistance à l'insuline chez la souris (171).

Quant à PKC, celle-ci est activée par différents lipides, les diacylglycérols et les céramides. PKC inhibe la voie de signalisation de l'insuline en ciblant différents intervenants. PKC phosphoryle le RI sur le résidu Thr1160 induisant une inhibition de son activité tyrosine kinase (172). Elle est également responsable de plusieurs phosphorylations inhibitrices de IRS-1 dont S307 (173). Enfin, elle inhibe le recrutement d'AKT vers la membrane plasmique, indispensable à son activation, en le phosphorylant sur sa thréonine T34 (174).

La voie préalablement détaillée de mTOR-p70S6K1 est aussi impliquée dans le mécanisme de rétro-régulation. Une possibilité est qu'elle pourrait être induite par l'hyperinsulinémie. La kinase p70S6K1 phosphoryle plusieurs résidus sérines de IRS-1 dont S1101; cette phosphorylation est augmentée dans le foie de souris obèses (*db/db*) mais pas pour les souris *p70S6K1*^{-/-} qui sont protégées de la résistance à l'insuline (175).

d) Autres modulateurs

Il existe d'autres modulateurs négatifs de la voie de l'insuline comme les protéines cytoplasmiques adaptatrices GRB10 et GRB14 et les protéines de la famille SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) qui se lient directement au RI pour empêcher la fixation d'autres substrats et bloquer la transmission du signal de l'insuline, ils favorisent aussi la dégradation d'IRS-1 (176, 177). L'expression des SOCS est notamment induite par la signalisation des cytokines.

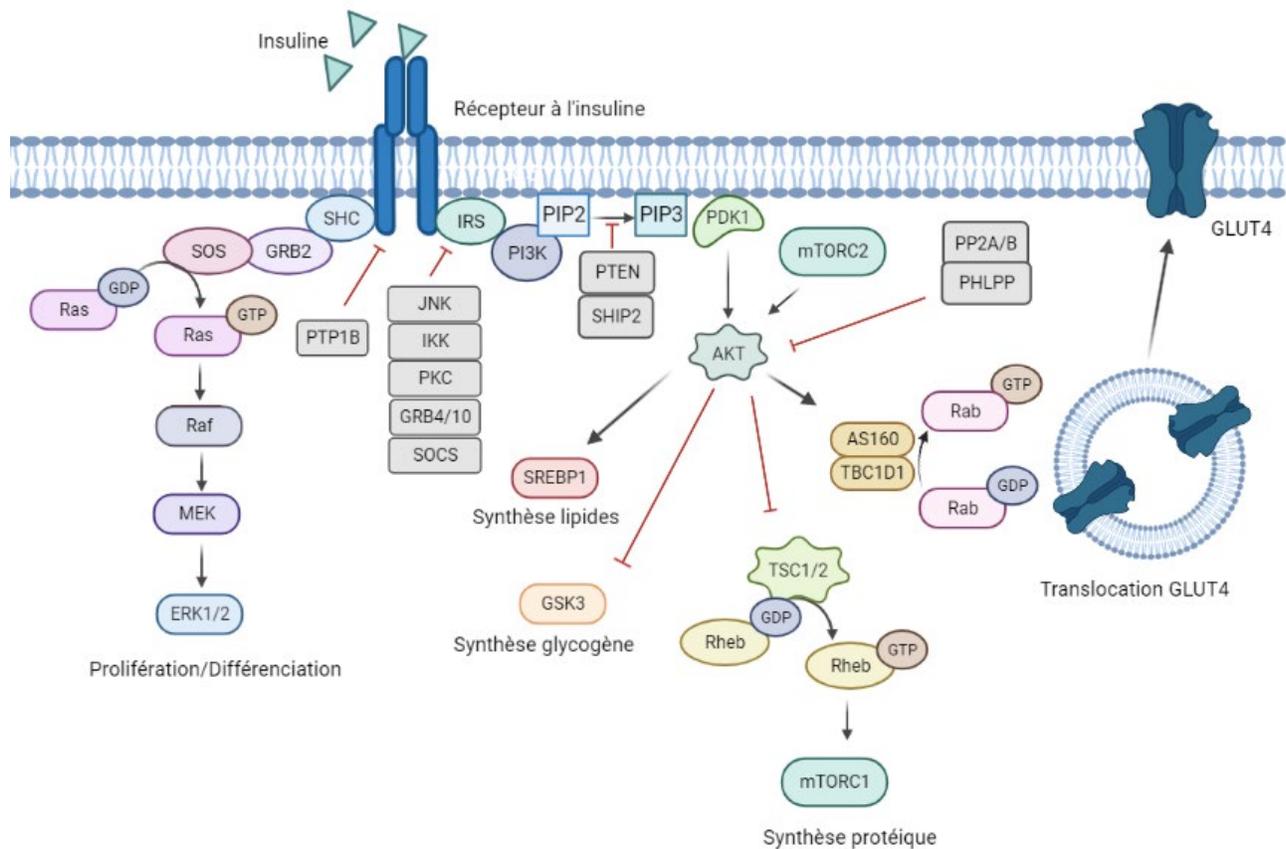


Figure 6. Voies de signalisation du récepteur à l'insuline. Adapté de (97)

L'insuline se lie à son récepteur (RI) qui s'active par auto/transphosphorylation. Ceci entraîne le recrutement de substrats tels que les IRS ou SHC qui seront phosphorylés par RI. Les IRS permettent l'activation de PI3K qui génère le messager secondaire PIP3 à l'origine du recrutement et de l'activation de PDK1 qui phosphoryle AKT. AKT est ensuite complètement activé par phosphorylation par le complexe mTORC2. La voie PI3K-AKT participe à la translocation de GLUT4 à la membrane, à la synthèse protéique et lipidique, au stockage du glucose en glycogène et inhibe la néoglucogenèse. L'activation de GRB2 par SHC ou IRS-1 conduit à l'activation de la voie RAS-MAPK-ERK qui contrôle la croissance, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La voie de signalisation de l'insuline est régulée par des modulateurs négatifs tels que les kinases JNK, IKK et PKC responsables de phosphorylations inhibitrices du RI et des IRS, les phosphatases PTP1B, PTEN, SHIP2, PP2A ou PHLPP qui déphosphorylent le RI, les IRS, PIP3 ou encore AKT.

III- Growth arrest-specific 6 (GAS6) et les récepteurs TAM

A. GAS6

1. Structure

Growth arrest-specific 6 (GAS6) a été initialement identifié et nommé en 1988 lors d'un criblage de gènes dont l'expression était augmentée dans des fibroblastes embryonnaires de souris NIH3T3, en condition d'arrêt de croissance (178). GAS6 est une protéine sécrétée de 678 acides aminés avec un poids moléculaire de 75 kDa. GAS6 est constituée d'un domaine N-terminal riche en résidus d'acides gamma-carboxyglutamiques (Gla), suivi d'une boucle courte à pont disulfure, de quatre domaines de type facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor* /EGF), et enfin d'une région C-terminale de type *steroid hormone-binding globulin* (SHBG) composée de deux domaines de lamine G (LG). GAS6 partage approximativement 42% d'homologie de sa séquence en acides aminés avec la Protéine S (PROS), une protéine à fonction anticoagulante.

2. Protéine dépendante de la vitamine K : γ -carboxylation

La présence d'un domaine Gla fait de GAS6 et PROS des protéines dites dépendantes de la vitamine K (VK). En effet, avant d'être sécrétée, GAS6 subit une modification post-traductionnelle, la γ -glutamyl carboxylation, qui nécessite la présence de VK réduite. Dans le RE, l'enzyme γ -glutamyl carboxylase (GGCX) convertit les résidus d'acide glutamique (Glu) en résidus d'acide γ -carboxyglutamique (Gla) par ajout d'un groupe carboxyle. Pour catalyser cette réaction, GGCX utilise la forme réduite de la VK comme cofacteur, ce qui conduit à la conversion de la VK sous sa forme époxydée. La VK oxydée est ensuite réduite par la vitamine K époxyde réductase VKOR pour être recyclée et à nouveau disponible pour GGCX. Ce cycle de recyclage de la VK est perturbé par la warfarine, un agent anticoagulant, qui inhibe VKOR, ce qui a donc pour conséquence une inhibition de la γ -carboxylation.

La γ -carboxylation de GAS6 permet l'association calcium-dépendante de son domaine Gla avec les phospholipides anioniques, tels que les phosphatidylserines (PtdSer). Ces lipides sont présents au niveau de la face interne de la membrane plasmique mais, lors de l'apoptose, l'inactivation des flippases conduit à l'exposition de PtdSer sur la surface externe des cellules apoptotiques.

B. Les récepteurs TAM

1. Structure des TAM et ligands

Les récepteurs TAM appartiennent à la catégorie des récepteurs tyrosine kinase et regroupent trois membres : **TYRO3**, **AXL** et **MERTK**. Les TAM partagent une structure similaire, ils sont constitués d'une partie extracellulaire qui contient deux domaines tandems de type immunoglobuline (Ig1 et Ig2) suivis de deux domaines de fibronectine de type 3 (FNIII-1 et FNIII-2). Cette partie extracellulaire peut être sujette à un clivage par les métalloprotéinases ADAM10 et ADAM17 et peut se retrouver dans la circulation (179, 180). Au niveau des cellules, la structure des TAM se poursuit avec un domaine transmembranaire et une partie intracellulaire composée du domaine à activité tyrosine kinase. GAS6 et PROS sont les ligands des récepteurs TAM mais ont des spécificités de liaison différentes. PROS se lie uniquement aux récepteurs TYRO3 et MERTK alors que GAS6 est capable de se lier aux trois (181). GAS6 présente toutefois une affinité beaucoup plus élevée pour AXL (suivi de TYRO3 et enfin MERTK) (182). La liaison se fait entre les domaines globulaires LG en C-terminale de GAS6 et les domaines Ig des récepteurs TAM.

2. Activation des TAM

Lorsque GAS6 se lie à l'un des TAM, les récepteurs s'assemblent en homodimères, ce qui conduit à leur autophosphorylation et leur activation. Pour le cas du récepteur AXL, sa dimérisation entraîne la phosphorylation de trois tyrosines Y698, Y702 et Y703 au niveau de son domaine kinase, qui sont suivies par l'autophosphorylation de trois autres tyrosines adjacentes (Y779 et 821 et Y866) qui sont les sites d'ancrage actifs pour la transduction du signal (183). Il a également été montré que les récepteurs TYRO3 et AXL peuvent hétérodimériser entre eux, pour favoriser l'activation des récepteurs à plus faible affinité (184).

Néanmoins, la liaison de GAS6 à ses récepteurs n'induit pas automatiquement l'activation et la phosphorylation de ses derniers. Bien que GAS6 ne se lie pas aux récepteurs par son domaine Gla, l'activation des TAM est dépendante de la γ -carboxylation médiée par la VK de ce domaine. Des études ont montré que l'abrogation de l'état carboxylé de GAS6, par traitement à la warfarine ou par techniques de mutagenèse des résidus Gla, bloquait l'activation des TAM sans néanmoins

affecter la capacité de liaison (185, 186). L'une des possibilités est que le déclencheur de l'activation des TAM soit les PtdSer exposées à la membrane des cellules apoptotiques et liées au domaine Gla de GAS6. L'interaction des PtdSer avec Gla-GAS6 faciliterait la dimérisation des TAM, responsable de leur activation. Plusieurs groupes ont montré que les TAM deviennent hyperactivés par GAS6 γ -carboxylé en présence de liposomes ou de cellules apoptotiques constitués de PtdSer, en particulier TYRO3 et MERTK (185, 187, 188).

Il a également pu être constaté dans des contextes pathologiques que l'activation des TAM pouvait se faire de manière indépendante de leur ligand. Ceci est particulièrement le cas du récepteur AXL, sa surexpression dans certains cancers ou la présence de stress oxydatif, induit son homodimérisation et son autophosphorylation (189, 190). De plus, les TAM peuvent être activés en formant des dimères avec d'autres récepteurs tyrosine kinase qui ne sont pas de leur famille. Par exemple, dans les cellules cancéreuses du sein triple négatif, EGFR s'associe à AXL et l'active indépendamment de GAS6, entraînant une amplification de sa signalisation en aval (191). AXL est connu pour hétérodimériser avec plusieurs récepteurs comme HER2, PDGFR et VEGFR-2 (192). Par ce processus d'hétérodimérisation, AXL affecte et diversifie les voies de signalisation de ses interacteurs.

3. Expression tissulaire des TAM

Les TAM sont exprimés dans de multiples tissus et types cellulaires. TYRO3 est majoritairement présent dans le système nerveux et le cerveau mais il est aussi exprimé dans les ovaires, les testicules, les poumons et la rétine. AXL est exprimé dans la majorité des tissus mais présente une expression plus forte dans le cœur, les reins, l'hippocampe et le cervelet, les testicules ainsi que dans les cellules endothéliales, les plaquettes, les cellules dendritiques et les macrophages/monocytes. MERTK est principalement présent dans les cellules de l'hématopoïèse comme les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les mégacaryocytes mais aussi dans les ovaires, les testicules, les poumons, la rétine et les reins.

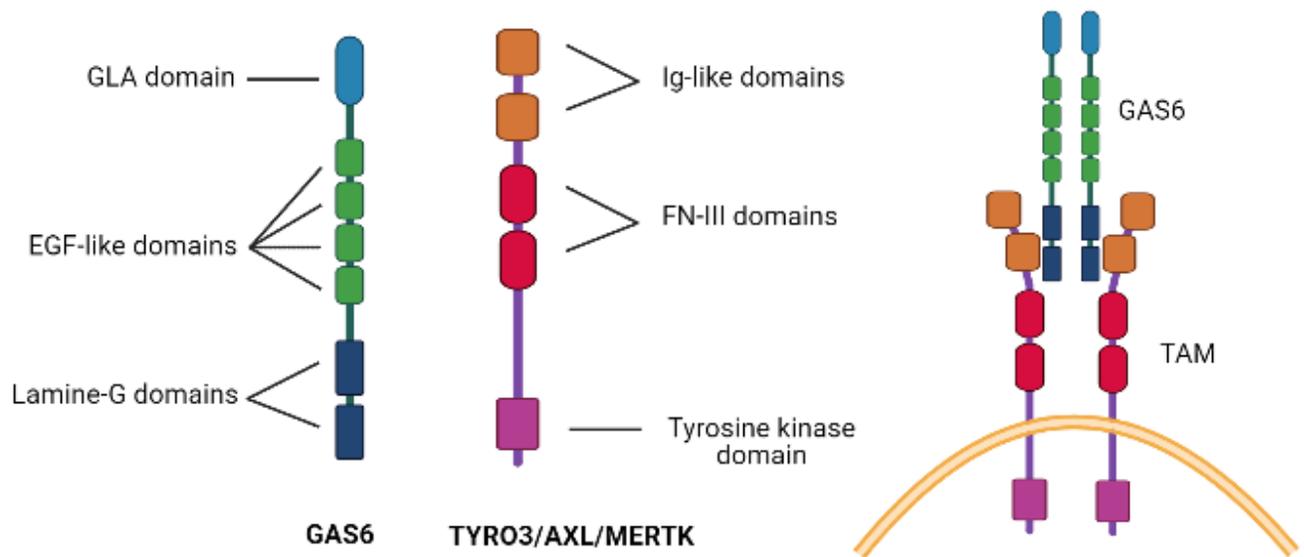


Figure 7. Représentation schématique de GAS6 et de ses récepteurs TAM.

GAS6 est une protéine dépendante de la vitamine K composé d'un domaine d'acides gamma-carboxyglutamiques (GLA), de quatre domaines de type facteur de croissance épidermique (EGF) et de deux domaines de type laminine G (LG). GAS6 agit comme ligand pour les récepteurs TYRO3, AXL et MERTK de la famille des TAM. Les récepteurs TAM sont constitués de deux domaines de type immunoglobuline (Ig), suivis de deux domaines de fibronectine de type III (FN-III) et d'un domaine à activité tyrosine kinase.

C. Fonctions pléiotropiques de GAS6 et des récepteurs TAM

Malgré la similarité dans leur séquence, GAS6 et PROS n'assurent pas des fonctions identiques. En effet, à l'inverse de PROS, GAS6 n'a pas de rôle dans la coagulation; les souris déficientes pour GAS6 sont viables et ne développent pas de thrombose ou d'hémorragie (193). Au fil du temps, GAS6 a pu être caractérisé comme une protéine pléiotropique qui joue un rôle dans divers processus physiologiques.

En premier lieu, le fait que GAS6 voit son expression augmentée dans des conditions d'arrêt de croissance suggère un rôle dans l'homéostasie cellulaire et plus particulièrement dans la survie (178). Le groupe du Dr. Schneider, à l'origine de la découverte de GAS6, a en effet déterminé que GAS6 protégeait les cellules NIH3T3, cultivées en absence de sérum, contre l'apoptose (194). Ces observations ont pu être confirmées dans un grand nombre de types cellulaires comme les cellules endothéliales, les neurones, les chondrocytes et autres (195). GAS6, via notamment son récepteur AXL, active plusieurs voies de signalisation **pro-survie** comme PI3K/AKT ou NF- κ B qui induisent l'expression du régulateur anti-apoptotique BCL-2 et diminuent les niveaux de la caspase 3 pro-apoptotique (196).

Par la suite, GAS6 a été identifié pour être également impliqué dans la **croissance** et la **prolifération cellulaire**. Des expériences sur des cellules en culture ont permis de déterminer que GAS6, en se liant à AXL, induit plusieurs voies de signalisation mitogéniques telles que la voie MAPK-ERK mais aussi la voie des JAK (*Janus Kinase*) avec l'activation du facteur de transcription STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (194, 197). De plus, il a été aussi initialement observé que GAS6 et AXL jouaient un rôle dans la **migration cellulaire** en favorisant l'activation de la GTPase Rac de la famille Rho, responsable de la réorganisation du cytosquelette d'actine et de la migration des cellules neuronales sécrétant de l'hormone gonadotrophine GnRH (198). Ainsi, ces observations ont permis de mener à l'investigation du rôle de GAS6 et AXL dans le développement de cancers. Plusieurs études cliniques montrent que les expressions élevées de GAS6 et AXL sont associées avec un mauvais pronostic et favorisent la progression du cancer (199). GAS6 favorise la prolifération et la motilité dans plusieurs lignées cancéreuses selon différents mécanismes dépendamment du type cellulaire. Par exemple, GAS6 active AXL et

favorise la prolifération des cellules de cancer de la prostate en induisant la phosphorylation de AKT et MAPK alors que dans des cellules de cancer de schwannome, ce processus est médié par NF- κ B (200, 201). Pour ce qui est de promouvoir la migration, dans le contexte de cellules cancéreuses de la prostate, GAS6 et AXL induisent l'augmentation de l'expression du facteur de transcription SLUG impliqué dans la régulation de la transition épithéliale-mésenchymateuse, par les voies de signalisation de JNK et MAPK-ERK (202). En revanche, dans des cellules du cancer du sein, cette migration peut être induite par la phosphorylation dépendante de la voie GAS6/AXL, des protéines ELMO1/2 (*Engulfment and Cell Motility*) qui interagissent avec la GEF DOCK1 pour promouvoir la dynamique du cytosquelette médiée par Rac (203). Bien qu'il a été démontré que dans plusieurs cancers la surexpression *in vivo* de AXL pouvait être suffisante pour induire ces voies de signalisation et provoquer la croissance tumorale et l'apparition de métastases, le rôle de GAS6 ne doit pas être sous-estimé ou dénigré (204). Dans des modèles de cancers du sein ou pancréatique induits par xénogreffe de cellules des lignées cancéreuses 4T1 ou PancO2, il a été observé que les souris déficientes pour GAS6 présentaient une réduction de la taille tumorale et une diminution de métastases (205).

Une autre fonction de GAS6 et des récepteurs TAM concerne la régulation de la clairance des cellules apoptotiques via le processus de phagocytose spécifique nommée l'**efferoctose**. Les récepteurs TAM ne pouvant se lier directement aux PtdSer des cellules apoptotiques vont se servir de GAS6 et de son domaine Gla comme intermédiaires. Cette caractéristique a surtout été mise en évidence *in vivo* par l'étude phénotypique des souris KO pour les récepteurs TAM (206). Ces souris sont viables et ne présentent aucun dysfonctionnement de développement embryonnaire. En revanche, elles présentent un grand nombre de phénotypes dégénératifs en lien avec un défaut de phagocytose. Les mâles triple TAM KO sont, en effet, stériles, en raison de l'élimination inefficace par les cellules de Sertoli, des cellules germinales apoptotiques ayant pour conséquence l'accumulation de débris cellulaires durant la spermatogenèse. Cette infertilité masculine n'est pas présente dans les souris déficientes pour un seul ou deux récepteurs TAM suggérant une redondance pour cette fonction entre les récepteurs. Par ailleurs, les souris TAM KO, tout comme celles dépourvues uniquement de MERTK, montrent également une défaillance dans la phagocytose des extrémités distales des segments externes des photorécepteurs par les

cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien conduisant ainsi à leur cécité. L'activation du récepteur MERTK mène à la phosphorylation de la GEF VAV1 qui stimule l'activation des Rho GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA qui régulent les réarrangements du cytosquelette favorisant la phagocytose des corps apoptotiques (207). Les souris déficientes individuellement pour GAS6 ou PROS au niveau de la rétine ont un nombre normal de photorécepteurs alors que la double déplétion phénocopie pleinement la mort des photorécepteurs observée chez les souris mutantes pour MERTK, suggérant ainsi que les deux ligands participent à l'efferocytose (208).

La conséquence la plus grave de la perte des récepteurs TAM chez les souris concerne le système immunitaire. Ces souris développent un trouble lymphoprolifératif, une splénomégalie massive et surtout de sévères désordres **auto-immuns**, notamment la polyarthrite rhumatoïde et un syndrome pseudo-lupique (206). Ces souris présentent des niveaux élevés d'auto-anticorps circulants contre l'ADN, le collagène et les phospholipides mais aussi une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Ces phénotypes immunitaires résultent de la défaillance, à la fois de l'efferocytose mais aussi de la réponse inflammatoire innée aux pathogènes médiées par les cellules dendritiques et les macrophages. Les TAM sont, en effet, des régulateurs négatifs des récepteurs de type Toll (TLR) et jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire. Les TAM activent STAT1 qui induit sélectivement la transcription des suppresseurs endogènes des voies de signalisation des cytokines, SOCS1 et SOCS3. Ces protéines inhibent la voie de signalisation TLR en ciblant les protéines en aval comme MAL (*MyD88 adaptor-like*) dans le cas de SOCS1 et TRAF3 et TRAF6 (*TNF receptor associated factors*) pour ce qui est de SOCS3 (209).

Comme nous avons pu le souligner, GAS6 et les récepteurs TAM occupent une multitude de fonctions et leur voie de signalisation est impliquée dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, le cancer ou encore les maladies auto-immunes. Certaines évidences suggèrent également un rôle potentiel dans le développement de troubles métaboliques.

D. Rôle potentiel de GAS6 et AXL dans le métabolisme

1. Obésité et inflammation

En 1999, le groupe du Dr. Medlock, en voulant étudier l'implication d'AXL dans l'apparition et la progression des leucémies myéloïdes, a révélé un nouveau rôle potentiel du récepteur, cette fois-ci dans la régulation du métabolisme. En générant des souris transgéniques pour AXL dans toutes les cellules de la lignée myéloïde, l'équipe a constaté que ces souris ne présentaient pas de tumeurs malignes hématopoïétiques, mais de façon surprenante devenaient obèses (210). À l'inverse, l'administration par voie orale, de l'inhibiteur pharmacologique d'AXL, le R428 protège les souris traitées contre l'obésité induite par un régime riche en graisses (204). Selon les études *in vitro*, cette protection acquise par l'inhibition d'AXL serait due à une altération de la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures, avec une réduction de l'absorption lipidique (211). L'implication de GAS6 dans ce processus a été évaluée à l'aide d'un modèle de souris déficientes pour GAS6. Ces souris ne présentent pas de différence de poids sous un régime normal. En revanche, elles présentent une masse grasseuse sous-cutanée et gonadique réduites sous une diète riche en graisses, qui n'est pas causée par une différence en prise alimentaire ou en activité physique (212). Ces résultats suggèrent donc que GAS6 et AXL seraient impliqués dans l'adipogenèse, le développement de l'obésité et qu'inhiber leur voie aurait des effets bénéfiques.

Comme mentionné précédemment, l'obésité est définie par un état inflammatoire chronique de bas grade accompagné d'une augmentation des niveaux de cytokines circulants pouvant induire une résistance à l'insuline et une dérégulation de l'homéostasie glucidique. Il se trouve que les souris transgéniques pour AXL présentaient également des signes d'inflammation avec une augmentation des taux plasmatiques de TNF α . En revanche, dans des modèles de stéatohépatite non-alcoolique ou dommages hépatiques, il a été observé que les souris déficientes pour GAS6 présentaient une réduction de l'inflammation du foie qui se traduit par une réduction de l'infiltration du tissu par les macrophages, une diminution de l'activation des cellules Kupffer (macrophages hépatiques résidents) ainsi que de la synthèse des cytokines (213, 214). La fibrose et l'inflammation constatées dans la stéatohépatite non-alcoolique, sont également réduites à la suite du blocage du récepteur AXL par le R428 chez la souris (215). Ces études peuvent suggérer

que l'absence de GAS6 ou l'inhibition de la voie AXL/GAS6 pourrait protéger contre l'état inflammatoire.

Enfin, une étude clinique a révélé que les niveaux de GAS6 circulants étaient significativement plus élevés chez des adolescents en surpoids ou obèses en comparaison à un groupe de poids normal (216). De plus, dans la même étude, les taux de GAS6 corrélaient positivement avec les taux de TNF α et de la protéine C-réactive, autre indicateur inflammatoire.

2. Insulinorésistance et diabète

En plus de devenir obèses, les souris AXL transgéniques possédaient également des caractéristiques phénotypiques associées au développement du DT2. En effet, les souris devenaient hyperinsulinémiques, intolérantes au glucose et résistantes à l'insuline (210).

De façon intéressante, plusieurs études d'association pangénomique (GWAS) ont mis en évidence l'existence de polymorphisme nucléaire de *GAS6* associé à l'hémoglobine glyquée (HbA1c), un marqueur utilisé pour diagnostiquer le diabète (217, 218). Certains polymorphismes de *GAS6* et *AXL* ont également été répertoriés comme étant associés à l'adiposité, à l'inflammation, à la résistance à l'insuline et au DT2 chez l'humain (219, 220). Dans l'étude précédemment mentionnée, les niveaux élevés de *GAS6* observés chez les adolescents obèses ou en surpoids sont associés avec un risque plus élevé de développer la résistance à l'insuline (216).

En conclusion, ces études soulignent la possible implication de *GAS6* et *AXL* dans l'installation de l'insulinorésistance et donc du développement du DT2.

Hypothèse de recherche

De façon intéressante, des études corrélatives ont montré que des niveaux sériques élevés de GAS6 et des polymorphismes dans le gène *GAS6* seraient associés à l'obésité, à la résistance à l'insuline ou au diabète de type 2. Cependant, les mécanismes par lesquels GAS6 influence ces désordres métaboliques n'est pas connu.

Hypothèse : Nous suggérons que GAS6 est responsable de l'activation d'un ensemble spécifique de voies de signalisation influençant les réponses moléculaires de la sensibilité à l'insuline dans les tissus cibles et modulant ainsi l'homéostasie glucidique.

Objectifs :

Chapitre 2

Le nombre d'études corrélatives suggérant une association entre les taux circulants de GAS6 et le développement de troubles métaboliques est limité et se trouve restreint à des études menées dans des populations asiatiques. Nous avons voulu évaluer la possible corrélation entre GAS6 et le métabolisme du glucose, dans une étude réalisée pour la première fois dans une cohorte de femmes canadiennes. Ces femmes sont dites à risque en vue de leur âge, de leur sédentarité, de leur surpoids ou obésité et de leur statut de femmes post-ménopausées.

Chapitres 3 et 4

Les buts de ce projet de recherche sont d'étudier l'importance de GAS6 dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète *in vivo* mais aussi de déterminer les voies de signalisation déclenchées par GAS6 qui influencent la sensibilité à l'insuline.

CHAPITRE 2

PREMIER ARTICLE

**Association Between Circulating GAS6 Levels
and Glucose Intolerance in Overweight and
Obese Postmenopausal Women:
a MONET Study**

Association Between Circulating GAS6 Levels and Glucose Intolerance in Overweight and Obese Postmenopausal Women: a MONET Study

Céline Schott^{1, 2}, Rémi Rabasa-Lhoret^{3,4}, Mathieu Ferron^{1, 2}

1. Molecular Physiology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada
2. Molecular Biology Programs, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada
3. Metabolic Diseases Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada
4. Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada

Key terms: GAS6, glucose intolerance, inflammation

Corresponding author:

Mathieu Ferron, PhD
Institut de Recherches Cliniques de Montréal
110 Ave. des Pins O.
Montréal, QC,
H2W 1R7, Canada
Phone: 514-987-5754
Email: mathieu.ferron@ircm.qc.ca

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

ABSTRACT

Background and objective: Growth-arrest specific 6 (GAS6) is a circulating protein that interacts with its tyrosine kinase receptors TAM (TYRO3/AXL/MERTK) to mediate a variety of biological functions. GAS6-TAM signaling is known to play a critical role in cellular homeostasis by regulating proliferation, survival and migration, but it is also implicated in immune functions and inflammation processes. Although several studies suggest an association between GAS6 and metabolic disorders such as obesity and glucose intolerance, these results remain controversial and limited. The aim of this study was to investigate, for the first time, the association between circulating GAS6 levels and determinants of glucose tolerance, insulin sensitivity, liver function and inflammation in Canadian patients.

Methods: A total of 126 non-diabetic overweight and obese sedentary postmenopausal women were recruited for this study. Serum GAS6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and associations with anthropometric measurements, inflammatory and glucose tolerance status were determined.

Results: Circulating GAS6 levels positively correlated with subcutaneous adipose tissue area ($P = 0.0062$), waist circumference ($P = 0.0096$), waist to hip circumference ($P = 0.0105$), serum level of the proinflammatory marker interleukin-6 ($P = 0.0082$), and liver enzymes ALT and AST levels ($P = 0.0154$; $P = 0.0012$) among overweight and obese women. In contrast, GAS6 levels are negatively correlated with total and LDL cholesterol levels ($P = 0.0395$; $P = 0.0261$). There was no significant association with insulin sensitivity and secretion. However, stratification of data by quartiles of serum GAS6 levels revealed that women with elevated circulating GAS6 levels have significantly lower glucose tolerance compared to those with the lowest GAS6 levels.

Conclusions: Serum levels of GAS6 are associated with adiposity, inflammation, liver dysfunction and altered glucose tolerance among overweight and obese postmenopausal women.

INTRODUCTION

The number of people with obesity is increasing dramatically and worryingly around the world. In Canada, obesity has become a major concern and health issue. In 2018, 63% of the adult Canadian population was overweight or obese (1). Obesity is known to be a risk factor in the establishment of several metabolic disorders such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), insulin resistance and type 2 diabetes (T2D).

Obesity results from, among other things, an excessive expansion of white adipose tissue associated with immune cells infiltration, which can cause a low-grade inflammation state. Increased production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 6 (IL-6), may contribute to insulin resistance in liver, skeletal muscle and adipose tissue favoring the development of T2D (2). Although the relationship between obesity and T2D is established, the heterogeneity of metabolic and glucose profiles of obese individuals supports the notion that additional factors may be involved in the dysregulation of glucose homeostasis and the development of diabetes (3).

Growth-arrest specific 6 (GAS6) is a secreted protein which belongs to the family of vitamin K-dependent proteins. GAS6 contains an N-terminal Gla domain, subject to post-translational γ -carboxylation mediated by the GGCX enzyme which requires vitamin K as a cofactor (4). This γ -carboxylation is necessary to allow the activation of GAS6 receptors which are: TYRO3, AXL and MERTK (TAM) (5, 6). GAS6 has been implicated in the regulation of multiple and diverse biological processes such as phagocytosis of apoptotic cells, cell proliferation and migration, platelet aggregation, endothelial cell activation or regulation of cytokine production (7-9).

The implication and the role of GAS6 in metabolism remains poorly understood. A limited number of clinical studies performed in East Asian cohorts, suggested an association between circulating levels of GAS6, obesity, insulin resistance or type 2 diabetes. However, the directionality of these association remains unclear, since one study reported a positive correlation between serum GAS6 levels and insulin resistance in obese non-diabetic adolescents while another found decreased GAS6 levels specifically in women or adults with T2D (10, 11).

The aim of this study was to investigate for the first time, in a Canadian cohort, the link between GAS6 and risk factors related to diabetes. We hypothesized that GAS6 could be considered a early marker of metabolic syndrome. Serum GAS6 levels were measured in the Montreal and Ottawa New Emerging Team (MONET) cohort which is comprised of non-diabetic women who are considered at risk because of their overweight or obesity, their sedentary lifestyle and their postmenopausal status.

MATERIAL AND METHODS

Human cohort

This study is a secondary analysis of data and samples from the Montreal and Ottawa New Emerging Team (MONET) cohort composed of a total of 126 overweight or obese postmenopausal women, between 46 and 70 years old. As previously described (12), women were enrolled in the study if they respect the inclusion criteria: postmenopausal (no menstruation for more than 1 year and a follicle-stimulating hormone level ≥ 30 U/l) with no hormone replacement therapy, body mass index (BMI) ≥ 27 kg/m², sedentary (≤ 2 h/week of structured exercise), non-smoker, and no medical treatment that could affect cardiovascular or metabolic functions. Women included have no medical record of cardiovascular disease, peripheral vascular disease, stroke or inflammatory disease and no diabetes (glycemia ≤ 7.0 mmol/L under fasting condition and/or ≤ 11.0 mmol/L 2 h after a 75 g glucose tolerance test). Each participant signed a consent form before the initiation of the study.

Anthropometric measurements and body composition

Body weight (BW), fat and lean mass were assessed using dual-energy X-ray absorptiometry (General Electric Lunar Corporation) and standing height was evaluated with a wall stadiometer (Perspective Enterprises) (13). Body mass index was calculated with the formula BMI=body weight/height² (kg/m²). Waist circumference was determined by measuring the mid-distance between the lowest rib and the iliac crest with a linear tape measure. Visceral and subcutaneous adipose tissue were measured using a High-Speed Advantage Computed Tomography (CT) scanner (General Electric Medical Systems) as described previously (13).

Blood samples and biochemical measurements

Venous blood samples were collected after a 12-h overnight fast. Measurements of total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides (TG), and alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST) were done using a COBAS INTEGRA 400 analyzer (Roche Diagnostic, Canada), as previously described (12). Assessments of serum high-sensitivity C-reactive protein, (hsCRP), apolipoprotein B (ApoB),

orosomuroid, and haptoglobin levels were made by immunonephelometry on an IMMAGE analyser (Beckman Coulter, France). Inflammatory markers levels such as interleukins (IL-6) were determined using specific commercial ELISA kits as previously described (14).

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

As previously reported (15), after a 12h fast, a 2h 75g-oral glucose tolerance test (OGTT) was performed for all women, according to the guidelines of the American Diabetes Association (16). Venous blood samples were collected before (0 minute) and during OGTT at 30, 60, 90 and 120 minutes. Plasma glucose and insulin levels were determined using COBAS INTEGRA 400 analyzer (Roche Diagnostic, Canada) and by human insulin-specific radioimmunoassay (Linco Research, St Charles, MO) respectively. The Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculated with the formula: $HOMA-IR = (\text{fasting glucose} \times \text{fasting insulin})/22.5$.

Insulin Sensitivity value was obtained with the Matsuda Index (ISI-Matsuda): $10\ 000 / [\text{square} (\text{fasting glucose} \times \text{fasting insulin} \times \text{mean glucose OGTT} \times \text{mean insulin OGTT})]$ (17).

Measurements of GAS6 in serum

The serum GAS6 level of each participant was measured using the human GAS6 ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, DY885) following the manufacturer's directions. In brief, a 96-well plate was coated with polyclonal mouse anti-human GAS6 antibody (400ng/ml) and incubated overnight at room temperature (RT). After three washes with Wash Buffer (PBS with 0.05% Tween), the plate was blocked for 1h with Reagent Buffer (1% BSA in PBS) at RT. The plate was washed three additional times and 2 μ L of samples or standards (recombinant human GAS6; DuoSet ELISA, R&D Systems) diluted in Reagent Buffer (98 μ L) was incubated for 2h at RT. Washing steps were repeated and biotinylated goat anti-human GAS6 antibody (100 ng/mL) was incubated for 2h at RT. Plate were washed again with Wash Buffer and streptavidin conjugated to horseradish peroxidase was added in each well for 20 minutes in the dark. After a final wash procedure, tetramethylbenzidine was incubated for 15 minutes in the dark and the reaction was stopped with HCl 1M. Determination of optical density of each well was performed using a microplate

reader set at 450 nm. Concentrations of GAS6 in the samples were calculated from a polynomial second-order standard curve obtained from the standards included in ELISA assay.

Statistics

Skewness tests were used to evaluate the distribution and homogeneity of the variables. Alanine and aspartate aminotransferases (ALT and AST), interleukin 6 (IL-6) and ISI were not distributed normally, and log-transformation was carried out for further analyses. We performed bivariate Pearson's correlations to associate circulating GAS6 levels with metabolic and physiological parameters such as glucose tolerance and inflammation-related markers. We divided the population in quartiles based on serum GAS6 levels and we compared glucose curves of OGTT between quartiles.

Study approval

The MONET cohort study was approved by the University of Montreal Medical Committee and each participant read and signed the consent form before the study.

RESULTS

Anthropometric and biochemical data of the MONET cohort

A total of 126 non-diabetic overweight and obese postmenopausal women were enrolled in this study. Physical and metabolic characteristics of the subjects are presented in **Table 1**. The mean age of this population was 57.6 years, and the average BMI was 32.7 kg/m² with 62.7% of obese individuals. Specifically, 47 women were overweight (BMI < 30, average: 28.5 ± 0.96 kg/m²) and 79 were obese (BMI > 30; average: 35.2 ± 4.0 kg/m²).

Table 1. Anthropometric and metabolic characteristics of the 126 overweight and obese postmenopausal women. (n = 126, unless otherwise indicated)

Characteristics of the population	Mean ± SD	Range
Age (years)	57.6 ± 4.9	46.0 - 70.5
Body mass index (kg/m ²)	32.7 ± 4.6	27.01 - 48.46
Lean body mass (%)	50.9 ± 4.6	39.68 - 59.77
Fat body mass (%)	46.1 ± 4.7	37.40 - 57.90
Waist circumference (cm) n=125	96.7 ± 9.1	80.00 - 113.50
Hip circumference (cm) n=125	116.7 ± 10.6	99.00 - 166.50
Visceral adipose tissue (cm ²) n=125	188.6 ± 55.6	82.65 - 345.63
Subcutaneous adipose tissue (cm ²) n=125	475.5 ± 113.1	305.25 - 775.96
Fasting glucose (mmol/L) n=125	5.3 ± 0.5	4.14 - 7.20
Fasting insulin (μU/ml) n=124	16.1 ± 6.1	5.29 - 39.52
Insulin sensitivity index n=119	2.9 ± 1.4	0.59 - 8.68
HOMA-IR n=124	3.8 ± 1.5	1.08 - 8.96
Cholesterol (mmol/L)	5.4 ± 0.9	3.27 - 7.45
HDL-C (mmol/L)	1.5 ± 0.3	0.95 - 2.66
LDL-C (mmol/L)	3.2 ± 0.8	1.43 - 5.09
TG (mmol/L)	1.6 ± 0.7	0.49 - 4.45
Alanine aminotransferase (U/L) n=125	26.1 ± 13.3	6.00 - 80.00
Aspartate aminotransferase (U/L) n=125	21.1 ± 6.6	13.00 - 45.00
GAS6 (ng/ml)	23.9 ± 6.3	8.19 - 40.78

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides

Serum GAS6 levels were measured with a previously characterized ELISA assay and statistical correlation tests were performed between serum GAS6 levels and various anthropometric, metabolic and biochemical parameters. The average concentration of circulating GAS6 among the MONET population was 23.9 ng/ml and ranged from 8.19 to 40.78 ng/ml (**Table 1**).

Positive association between circulating GAS6 levels and adiposity characteristics

As shown in **Table 2**, circulating GAS6 concentrations were not statistically associated with BMI, lean or fat body mass. However, bivariate Pearson's correlations revealed that GAS6 levels were positively and significantly associated with waist circumference and waist to hip circumference ($r = 0.2254$, $P = 0.0096$; $r = 0.2229$, $P = 0.0105$, respectively) among these overweight and obese postmenopausal women. Moreover, GAS6 levels correlated with subcutaneous adipose tissue ($r = 0.2378$, $P = 0.0062$). No correlation was found with visceral adipose tissue.

Table 2. Association between serum GAS6 levels and physical and adiposity parameters among the MONET cohort. (n = 126, unless otherwise indicated)

Characteristics	Pearson's correlation (r)	P value
Body mass index (kg/m ²)	0.1586	0.0692
Lean body mass (%)	-0.1115	0.2029
Fat body mass (%)	0.1196	0.1719
Waist circumference (cm) n=125	0.2254	0.0096 **
Waist to hip circumference (cm) n=125	0.2229	0.0105 *
Visceral adipose tissue (cm ²) n=125	0.02483	0.7783
Subcutaneous adipose tissue (cm ²) n=125	0.2378	0.0062**

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Association between circulating GAS6 levels and lipid metabolism, liver dysfunction and inflammation

Overweight and obese women who presented high GAS6 levels had significantly lower levels of total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ($r = -0.1837$, $P = 0.0395$; $r = -0.1982$, $P = 0.0261$, respectively) as well as total cholesterol/ high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ratio ($r = -0.1799$, $P = 0.0438$). However, HDL-C levels were not significantly different depending on GAS6 concentration (**Table 3**). In addition, there were no significant correlations between GAS6 levels and serum free fatty acid and triglycerides levels. Serum levels of the liver enzymes, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were positively associated with circulating GAS6 among the population. These correlations became more robust using log-transformed ALT and AST normalized values. These results suggest a significant positive correlation between GAS6 and parameters of hepatic dysfunction. Moreover, bivariate Pearson's correlation showed a significant positive association between circulating levels of GAS6 and the inflammatory marker IL-6 ($r = 0.2373$, $P = 0.0082$).

Table 3. Pearson's correlation coefficients between serum GAS6 levels with lipid profile, liver enzymes and inflammation among overweight and obese postmenopausal women. (n = 126, unless otherwise mentioned)

Variables	Pearson's correlation (r)	P value
Cholesterol (mmol/L)	-0.1837	0.0395 *
HDL-C (mmol/L)	0.01874	0.8350
LDL-C (mmol/L)	-0.1982	0.0261*
Cholesterol/HDL-C	-0.1799	0.0438*
TG (mmol/L)	-0.04015	0.6553
FFA (mmol/L) n=66	0.1427	0.2532
ALT (U/L) n=125	0.2162	0.0154 *
Log (ALT) n=125	0.2224	0.0127 *
AST (U/L) n=125	0.2865	0.0012 **
Log (AST) n=125	0.2934	0.0009 ***
IL-6 (pg/ml) n=123	0.166	0.0666
Log (IL-6) n=123	0.2373	0.0082 **

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; Cholesterol-HDL: ratio cholesterol/HDL-C; TG: triglycerides; FFA: free fatty acids; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase.

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Positive correlation between GAS6 levels and glucose intolerance

No direct correlation was detected between serum GAS6 levels and fasting glucose or fasting insulin (**Table 4**). However, GAS6 levels correlated with glucose and insulin levels after a 2h-OGTT challenge ($r = 0.2105$, $P = 0.02$; $r = 0.2124$, $P = 0.0188$, respectively) among overweight and obese postmenopausal women.

Table 4. Correlation between circulating GAS6 levels and OGTT data in the MONET cohort.

Metabolic data	Pearson's correlation (r)	P value
OGTT glucose		
Fasting glucose (mmol/l) n=125	-0.09692	0.2862
2-h glucose (mmol/l) n=125	0.2105	0.02*
OGTT insulin		
Fasting insulin (μ U/ml) n=124	0.02924	0.7472
2-h insulin (μ U/ml) n=122	0.2124	0.0188*
HOMA-IR n=124	0.003172	0.9721
Log (ISI)-Matsuda n=119	-0.04577	0.6211

OGTT: Oral Glucose Tolerance Test

*: $P < 0.05$

To better understand the impact of GAS6 levels on glucose metabolism, subjects were divided into quartiles depending on their serum GAS6 concentration. Glucose and insulin plasma levels during the OGTT were then compared between quartiles (**Fig.1**). We focused on the lowest and highest quartiles of GAS6 (Quartiles 1 and 4) which presented a significant difference in GAS6 serum levels (**Fig.1A**). As shown in **Fig.1B** and **C**, women with the highest levels of GAS6 have significantly lower glucose tolerance compared to those with lower levels of circulating GAS6. There was no significant difference in insulin secretion during the OGTT (**Fig1.D-E**).

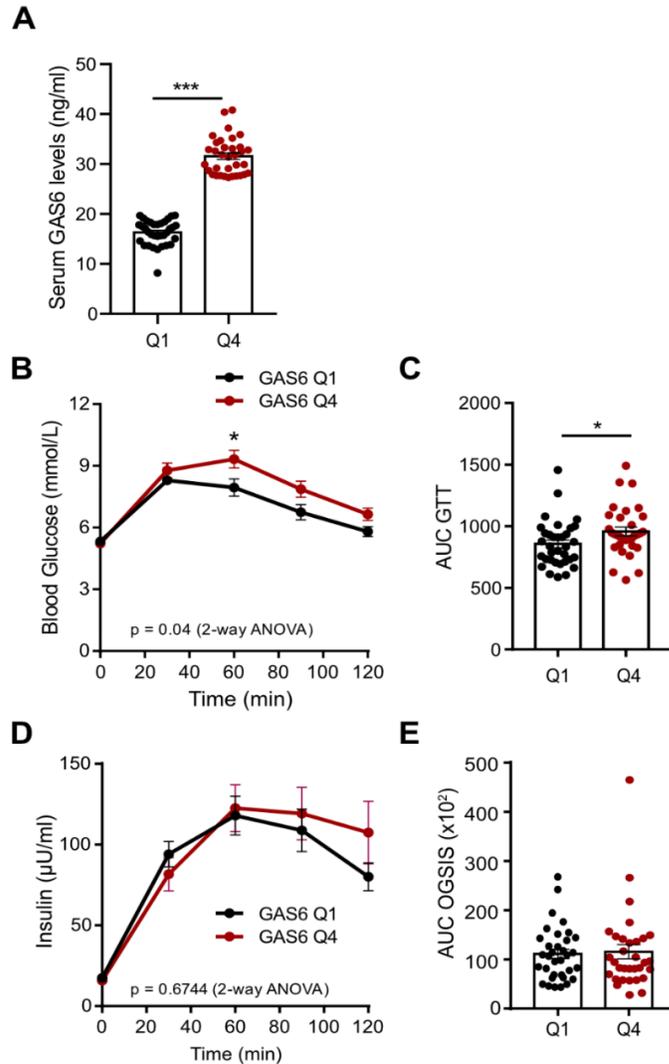


Figure 1. High levels of circulating GAS6 in overweight and obese postmenopausal women correlate with glucose intolerance.

The MONET cohort was divided into quartiles according to GAS6 levels. **(A)** Circulating GAS6 levels in Quartile 1 (Q1) and Quartile 4 (Q4) of the MONET population. **(B-C)** Oral Glucose Tolerance Test (OGTT), and the Area under the curve (AUC) stratified by quartiles of GAS6 levels in overweight and obese postmenopausal women. Comparison was made between GAS6 Quartile 1 and Quartile 4. **(D-E)** Plasma insulin levels during OGTT and AUC results of the overweight and obese postmenopausal women depending on their serum GAS6 levels (Q1 and Q4). Results represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, by unpaired, 2-tailed Student's *t* test **(A,C,E)** or by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiples comparisons test **(B and D)**.

DISCUSSION

This study is the first to investigate the association between circulating GAS6 levels and metabolic factors in Canadian women with high risks of developing type 2 diabetes because of their weight and their postmenopausal and sedentary statuses.

Correlations between GAS6 and anthropometric measurements in the MONET population were first evaluated. The results showed that GAS6 levels correlated positively with various adiposity parameters such as waist and waist-to-hip circumferences and notably with subcutaneous adipose tissue area. A previous clinical study showed higher plasma GAS6 levels in a Taiwanese population of overweight or obese adolescents in comparison to lean adolescents (10). In this same study, GAS6 levels were also positively correlated with waist and waist-to-hip circumferences and BMI. It was also found in a mouse model that GAS6 expression was significantly higher in the subcutaneous adipose tissue of obese mice fed a high-fat-diet compared to lean mice fed a normal diet (18). In addition, transgenic mice overexpressing AXL, the receptor for which GAS6 has the strongest affinity, become obese and conversely inhibition of the GAS6/AXL pathway with the pharmacological inhibitor R428 protects against obesity induced by high-fat-diet (19-21). However, it is important to emphasize that the involvement of GAS6/TAM signaling in obesity remains contradictory. The study of AXL-deficient mice did not reveal any phenotype related to adiposity (18). Moreover, clinical studies carried out in women or in adults with T2D suggest that circulating GAS6 levels negatively correlate with BMI (11, 22). This variation in GAS6 levels correlations may be due to differences between cohorts, such as age or the stages in the development of the metabolic disorders.

In several pathological conditions, a significant elevation of circulating GAS6 levels is noted, such as in sepsis, chronic liver disease, renal dysfunction, or systemic lupus erythematosus, and may be related to disease severity (23-26). Since the interplay between obesity, inflammation and liver disorders plays a central role in the development of the pathophysiology of T2D, we investigated the involvement of GAS6 in a cohort deemed to be at risk. This study revealed positive correlations between serum levels of GAS6 with the pro-inflammatory cytokine IL-6, and the liver

enzymes, AST and ALT, whose elevated levels are indicators of hepatic dysfunction, among non-diabetic overweight and obese women. Furthermore, circulating GAS6 levels are associated with alterations in glucose tolerance. These results are consistent with the study by Hsiao et al. among non-diabetic overweight and obese adolescents, which reported a significant positive correlation between GAS6 and serum levels of the proinflammatory cytokine TNF- α known to be involved in insulin resistance development. The same study also detected a positive association between circulating GAS6 and hsCRP, a marker of systemic inflammation(10). Interestingly, this study noticed a strong positive correlation between GAS6 levels and HOMA-IR and even reported that every increase of 1 ng/mL in circulating GAS6 concentration corresponds to an increase of 15-19% in the risk of developing insulin resistance. Likewise, AXL transgenic mice develop an inflammatory state with increased serum TNF- α levels, accompanied by glucose intolerance and insulin resistance, suggesting that dysregulation of GAS6/AXL signaling could be involved in the establishment of alterations in glucose homeostasis (20).

However, several previous studies demonstrated that specific polymorphisms in the *GAS6* gene could lead to decreased protein levels, and lower circulating levels of GAS6 correlated negatively with BMI, inflammatory markers IL-6 and TNF- α , fasting glucose and insulin resistance (22, 27, 28). The differences between studies can be explained by several parameters. First, the ethnicity; most of the previous studies were carried out in Asian or Middle Eastern populations whereas the current study was completed on a Canadian population although we did not analyze this factor. Second, the main difference is the disease state, i.e. people with T2D or not, one possibility is that the levels of GAS6 could vary depending on the advancement of the illness.

TAM signaling is known to be involved in the suppression of Toll-like receptor-induced inflammation and the regulation of cytokine release (29). Thus, these studies hypothesized that a decrease in GAS6 levels leads to a reduced TAM signaling and anti-inflammatory effects, that can cause dysregulated activation of the innate immune system which consequently impairs glucose metabolism. Nevertheless, GAS6/TAM signaling display anti-inflammatory or pro-inflammatory responses depending on the cell type. For example, *in vitro* GAS6 treatment of monocytes/macrophages inhibits TNF- α and IL-6 secretion after LPS-challenge (30). Conversely,

TAM KO mice exhibit an increased secretion of TNF- α after LPS-stimulation (31). In parallel, a pro-inflammatory role of GAS6 was also demonstrated in *in vivo* studies using GAS6-deficient mice. Indeed, GAS6 deletion leads to decreased expression of pro-inflammatory markers, such as IL-1 β and TNF- α , and protects against hepatic inflammation induced by choline-deficient ethionine-supplemented diet (32). Additionally, GAS6 was shown to promote pro-inflammatory endothelial cell activation (33). Therefore, it is important to recognize the complexity and heterogeneity of the effects of GAS6 depending on the wide variety of target cells and the multiple receptors involved, even within the same tissue. A recent study was able to put the duality of GAS6 responses in the liver into perspective. Indeed, GAS6 was shown to protect hepatocytes against lipotoxicity via activation of its receptor MERTK, while its AXL-dependent signaling promoted fibrosis in hepatic stellate cells and inflammation in Kupffer cells (34). This could explain our observations regarding a possible increase in liver damage.

In conclusion, this study suggests that elevated serum GAS6 levels are positively associated with specific markers of adiposity, inflammation, liver dysfunction and alterations in glucose clearance. Further studies are needed in order to understand the molecular mechanisms by which GAS6 and TAM receptors could affect glucose metabolism and to explore new therapeutic approaches against T2D.

ACKNOWLEDGEMENTS

We sincerely thank all the patients for their participation in this study and all the medical teams from Montreal Clinical Research Institute for their work. We also thank funding organizations which support this work. Canadian Institutes of Health Research support MONET project (13). CS received scholarships from IRCM and the Fonds de Recherche du Québec Santé (FRQS).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF and CS conceived and designed the project. CS performed GAS6 ELISA and analyzed data with help of MF. RRL and DP were involved in MONET study design. CS drafted the manuscript. CS, RRL and MF edited and revised the manuscript.

REFERENCES

1. Canada. S. Overweight and obese adults, 2018. *Health Fact Sheets*. 2019.
2. Wu H, and Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ Res*. 2020;126(11):1549-64.
3. Karelis AD. To be obese--does it matter if you are metabolically healthy? *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(12):699-700.
4. Bellido-Martin L, and de Frutos PG. Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitam Horm*. 2008;78:185-209.
5. Lew ED, Oh J, Burrola PG, Lax I, Zagorska A, Traves PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife*. 2014;3.
6. Geng K, Kumar S, Kimani SG, Kholodovych V, Kasikara C, Mizuno K, et al. Requirement of Gamma-Carboxyglutamic Acid Modification and Phosphatidylserine Binding for the Activation of Tyro3, Axl, and Mertk Receptors by Growth Arrest-Specific 6. *Front Immunol*. 2017;8:1521.
7. van der Meer JH, van der Poll T, and van 't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123(16):2460-9.
8. Lemke G, and Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):327-36.
9. Wu G, Ma Z, Cheng Y, Hu W, Deng C, Jiang S, et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2018;17(1):20.
10. Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Shieh YS, Hsieh CH, et al. Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):E267-74.
11. Kuo FC, Hung YJ, Shieh YS, Hsieh CH, Hsiao FC, and Lee CH. The levels of plasma growth arrest-specific protein 6 is associated with insulin sensitivity and inflammation in women. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(2):304-9.
12. Brochu M, Malita MF, Messier V, Doucet E, Strychar I, Lavoie JM, et al. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(9):3226-33.
13. Karelis AD, Lavoie ME, Messier V, Mignault D, Garrel D, Prud'homme D, et al. Relationship between the metabolic syndrome and physical activity energy expenditure: a MONET study. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33(2):309-14.
14. Razmjou S, Abdunour J, Bastard JP, Fellahi S, Doucet E, Brochu M, et al. Body composition, cardiometabolic risk factors, physical activity, and inflammatory markers in premenopausal women after a 10-year follow-up: a MONET study. *Menopause*. 2018;25(1):89-97.
15. Brochu M, Mathieu ME, Karelis AD, Doucet E, Lavoie ME, Garrel D, et al. Contribution of the lean body mass to insulin resistance in postmenopausal women with visceral obesity: a Monet study. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(5):1085-93.

16. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
17. Matsuda M, and DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22(9):1462-70.
18. Scroyen I, Frederix L, and Lijnen HR. Axl deficiency does not affect adipogenesis or adipose tissue development. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(6):1168-73.
19. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(47):30022-7.
20. Augustine KA, Rossi RM, Van G, Housman J, Stark K, Danilenko D, et al. Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor. *J Cell Physiol*. 1999;181(3):433-47.
21. Lijnen HR, Christiaens V, and Scroyen L. Growth arrest-specific protein 6 receptor antagonism impairs adipocyte differentiation and adipose tissue development in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;337(2):457-64.
22. Hung YJ, Lee CH, Chu NF, and Shieh YS. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1840-4.
23. Ekman C, Linder A, Akesson P, and Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care*. 2010;14(4):R158.
24. Ekman C, Jonsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, and Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(6):1064-9.
25. Lee IJ, Hilliard B, Swami A, Madara JC, Rao S, Patel T, et al. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6) levels are elevated in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(11):4166-72.
26. Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, Joannas L, Menendez A, Garcia-Ruiz C, et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J Hepatol*. 2015;63(3):670-8.
27. Fouad NA, Eltaher SM, Abdullah OA, and Metwally RA. Serum Level of Growth Arrest-Specific 6 (Gas6) Protein and Genetic Variations in the Gas6 Gene in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Egypt J Immunol*. 2015;22(1):41-7.
28. Lee CH, Chu NF, Shieh YS, and Hung YJ. The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;95(2):201-6.
29. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, and Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007;131(6):1124-36.
30. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L, and Avanzi GC. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):869-75.
31. Lu Q, and Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293(5528):306-11.

32. Fourcot A, Couchie D, Chobert MN, Zafrani ES, Mavier P, Laperche Y, et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(6):G1043-53.
33. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111(8):4096-105.
34. Tutusaus A, de Gregorio E, Cucarull B, Cristobal H, Areste C, Graupera I, et al. A Functional Role of GAS6/TAM in Nonalcoholic Steatohepatitis Progression Implicates AXL as Therapeutic Target. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(3):349-68.

CHAPITRE 3

SECOND ARTICLE

**GAS6 Regulates Glucose Metabolism By
Inhibiting Insulin Receptor Signaling**

GAS6 Regulates Glucose Metabolism By Inhibiting Insulin Receptor Signaling

Céline Schott^{1,2}, Amélie Germain¹, Julie Lacombe¹, Denis Faubert³, Jonathan Boulais^{1,4}, Jean-François Côté^{2,4,5,6} and Mathieu Ferron^{1,2,5,6}

1. Molecular Physiology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada
2. Molecular Biology Programs, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada
3. Proteomics Platform, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Canada.
4. Cytoskeletal Organization and Cell Migration Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada
5. Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada
6. Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada

Key terms: GAS6; muscle; insulin resistance; glucose metabolism

Corresponding author:

Mathieu Ferron, PhD
Institut de Recherches Cliniques de Montréal
110 Ave. des Pins O.
Montréal, QC,
H2W 1R7, Canada
Phone: 514-987-5754
Email: mathieu.ferron@ircm.qc.ca

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose

ABSTRACT

Growth-arrest specific 6 (GAS6) is a secreted protein that acts as a ligand for TAM receptors (TYRO3, AXL and MERTK). Studies in humans have shown that GAS6 circulating levels and genetic variations in *GAS6* gene are associated with hyperglycemia and increased risk of type 2 diabetes. However, the mechanisms by which GAS6 influences glucose metabolism are not understood. Here, we show that *Gas6* deficiency in mice increases insulin sensitivity and protects from diet-induced insulin resistance. Conversely, increasing GAS6 circulating levels is sufficient to reduce insulin sensitivity *in vivo*. Recombinant GAS6 inhibits the activation of the insulin receptor (IR) and reduces insulin response in muscle cells. Mechanistically, the GAS6 receptor AXL heterodimerizes with the IR, while GAS6 reprograms signaling pathways downstream of IR. This results in increased trafficking of the IR to Rab7a-positive late endosomes following insulin treatment. Together, these results delineate the cellular mechanisms by which GAS6 and AXL influence insulin sensitivity.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) prevalence is increasing worldwide, becoming one of the most important chronic diseases. At the root of the pathophysiology of T2D lies insulin resistance, an insufficient response to insulin in target tissues such as skeletal muscle, adipose tissue, and liver. Due to this resistance, in T2D, the capacity of insulin to stimulate glucose uptake, to promote glycogenesis or to inhibit gluconeogenesis and lipolysis, is blunted thus leading to uncontrolled hyperglycemia. Among all the insulin sensitive-tissues, skeletal muscle is responsible for the utilization of ~80% of postprandial blood glucose while it represents only 40% of the total body weight, making it one of the major targets of insulin. Skeletal muscle is also one of the earliest tissues affected by insulin resistance in pre-diabetic subjects (1-2).

At the cellular level, insulin mediates its actions by binding to the insulin receptor (IR), triggering IR dimerization and autophosphorylation of its tyrosine kinase domain. These molecular events result in the recruitment and phosphorylation of insulin receptor substrates (IRS) proteins leading to the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway that plays a critical role in the molecular response to insulin (3-5). Alterations in IR and PI3K/AKT activation or phosphorylation in response to insulin impact several cellular pathways including glucose uptake (5). A reduction in the level of activation of the insulin signaling cascade in the muscle has been associated with insulin resistance and contributes to the development of T2D (6-8). However, the cellular mechanisms involved in the development of muscle insulin resistance are still not fully understood.

Growth-arrest specific 6 (GAS6) is a secreted protein initially identified as upregulated in growth-arrested fibroblasts (9). GAS6 is composed of an N-terminal Gla domain, four central epidermal growth factor-like domains and two laminin G-like (LG) domains. The Gla domain contains multiple glutamic acid residues (Glu) which undergo vitamin K-dependent γ -carboxylation (10). GAS6 functions as a ligand for the TAM family of receptor tyrosine kinases (RTK), which includes 3 members: TYRO3, AXL and MERTK (11). Several studies have demonstrated that γ -carboxylation in the Gla domain of GAS6 is required for the full activation of TAM receptors by this protein (12-

14). Protein S (PROS), which functions as an anticoagulant and shares 44% of its amino acid sequence with GAS6, also acts as a ligand for the TAM receptors *in vitro*. However, GAS6 and PROS may have different functions *in vivo* given that mice lacking *Pros1* dies in utero from hemorrhages, while *Gas6*^{-/-} mice are viable and do not suffer spontaneous bleeding or thrombosis (15, 16). Moreover, recent studies have established that only GAS6 can activate AXL, while TYRO3 and MERTK act as both PROS and GAS6 receptors (17, 18), suggesting that the non-redundant functions of GAS6 are mediated by AXL. TAM receptors have been implicated in several homeostatic functions in adult mice including spermatogenesis, clearance of apoptotic cells, suppression of inflammation and platelet activation (19-22). Additional studies suggest that AXL promotes cancer cell survival and migration and is involved in tumor progression and cancer metastasis (23-28). Yet, the physiological function of GAS6 remains unclear, since mice lacking *Gas6* are apparently devoid of phenotype under normal conditions (16, 29).

Recent studies in humans suggest a potential role of GAS6 and AXL in insulin sensitivity, glucose homeostasis and T2D (30-32). Serum levels of GAS6 were found to be elevated in obese adolescents compared to lean subjects and circulating levels of GAS6 were strongly correlated with insulin resistance in this population (32). *GAS6* and *AXL* gene polymorphisms were also reported to be associated with insulin resistance and T2D in humans (33, 34). Similarly, genome-wide association studies (GWAS) have identified a positive association between non-coding single-nucleotide polymorphisms (SNP) in the human *GAS6* gene and the circulating levels of glycated hemoglobin (HbA1c), a marker of hyperglycemia (35, 36). Although these data suggest that GAS6 may play a role in the development of insulin resistance and T2D in humans, the physiological and molecular mechanisms through which GAS6 and its receptor(s) might influence these metabolic disorders are currently unknown. Likewise, the target cell type(s) implicated in the function of GAS6 in metabolism remain to be identified.

Here, we first completed a comprehensive characterization of the metabolic phenotype of *Gas6*-deficient mice on two different genetic backgrounds and showed that the absence of GAS6 in mice improves glucose tolerance and insulin sensitivity, without affecting insulin secretion, body weight or energy expenditure. Conversely, mice with increased circulating levels of GAS6 had

reduced insulin sensitivity. Next, we established that AXL is highly expressed and functional in muscle cells suggesting that these insulin-sensitive cells could be an important target of GAS6. Mechanistically, we showed that AXL interacts with IR in an insulin-dependent manner and through quantitative phosphoproteomic we demonstrated that GAS6 profoundly modifies insulin signaling in muscle cells. GAS6 rewiring of insulin signaling pathways leads to increased insulin receptor trafficking to late endosomes, thus explaining its negative impact on insulin sensitivity. Together, these results uncovered a crosstalk between GAS6 and insulin signaling and provide the basis of a molecular mechanism by which GAS6 promotes insulin resistance and T2D.

RESULTS

GAS6 deficiency improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice fed a normal diet

Mice lacking GAS6 in all tissues (*Gas6*^{-/-}) are viable and do not display any overt phenotype under normal conditions, as previously reported (16). Therefore, as a first step to evaluate GAS6 function in glucose homeostasis, we characterized the metabolic phenotype of 3-month-old *Gas6*^{-/-} male mice fed a standard chow diet in two inbred genetic backgrounds: FVB/N and C57BL/6J. These two strains were selected because they are both widely used in metabolic studies but have significant differences in whole-body glucose metabolism (37). When compared to control littermates on the same genetic background, *Gas6*^{-/-} mice did not display any differences in energy expenditure parameters assessed through indirect calorimetry, including O₂ consumption, CO₂ release and overall energy expenditure (**Fig.S1A-F**). Ambulatory and vertical measurements of spontaneous physical activity did not differ between genotypes (**Fig.S1G-L**). Accordingly, *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice had similar body weight and did not exhibit significant differences in food intake on either of the two studied genetic backgrounds (**Fig.S1M-P**). However, on both genetic backgrounds, *Gas6*^{-/-} mice have significantly reduced serum glucose levels in fed conditions compared to *Gas6*^{+/+} mice (**Fig. 1A-B**). Blood glucose was not changed following short (5h) or prolonged (16h) fasting between *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice. Next, the impact of GAS6 deficiency on glucose handling was assessed through glucose tolerance tests (GTT), revealing that *Gas6*^{-/-} mice had a significant decrease in serum glucose levels compared to control mice following a glucose load (**Fig.1C-D**). Additional metabolic tests were performed to further characterize the impact of GAS6 on insulin sensitivity and secretion. Insulin tolerance tests (ITT) suggested that *Gas6*^{-/-} mice on both genetic backgrounds had significantly better insulin sensitivity (**Fig.1E-F**). In contrast, glucose-stimulated insulin secretion tests (GSIS) showed that *Gas6*^{-/-} mice had normal insulin secretion in response to glucose (**Fig.1G-H**). Insulin reduces blood glucose mainly by increasing glucose uptake by skeletal muscle and adipose tissues, and by suppressing gluconeogenesis in the liver. Pyruvate tolerance tests (PTT) were therefore performed to assess the impact of GAS6 deficiency on gluconeogenesis. These experiments revealed that gluconeogenesis from pyruvate is not significantly affected in *Gas6*^{-/-} mice on both genetic

backgrounds (**Fig.S1Q-R**). Together, these data suggest that GAS6-deficiency improves glucose tolerance by affecting insulin sensitivity and not insulin secretion.

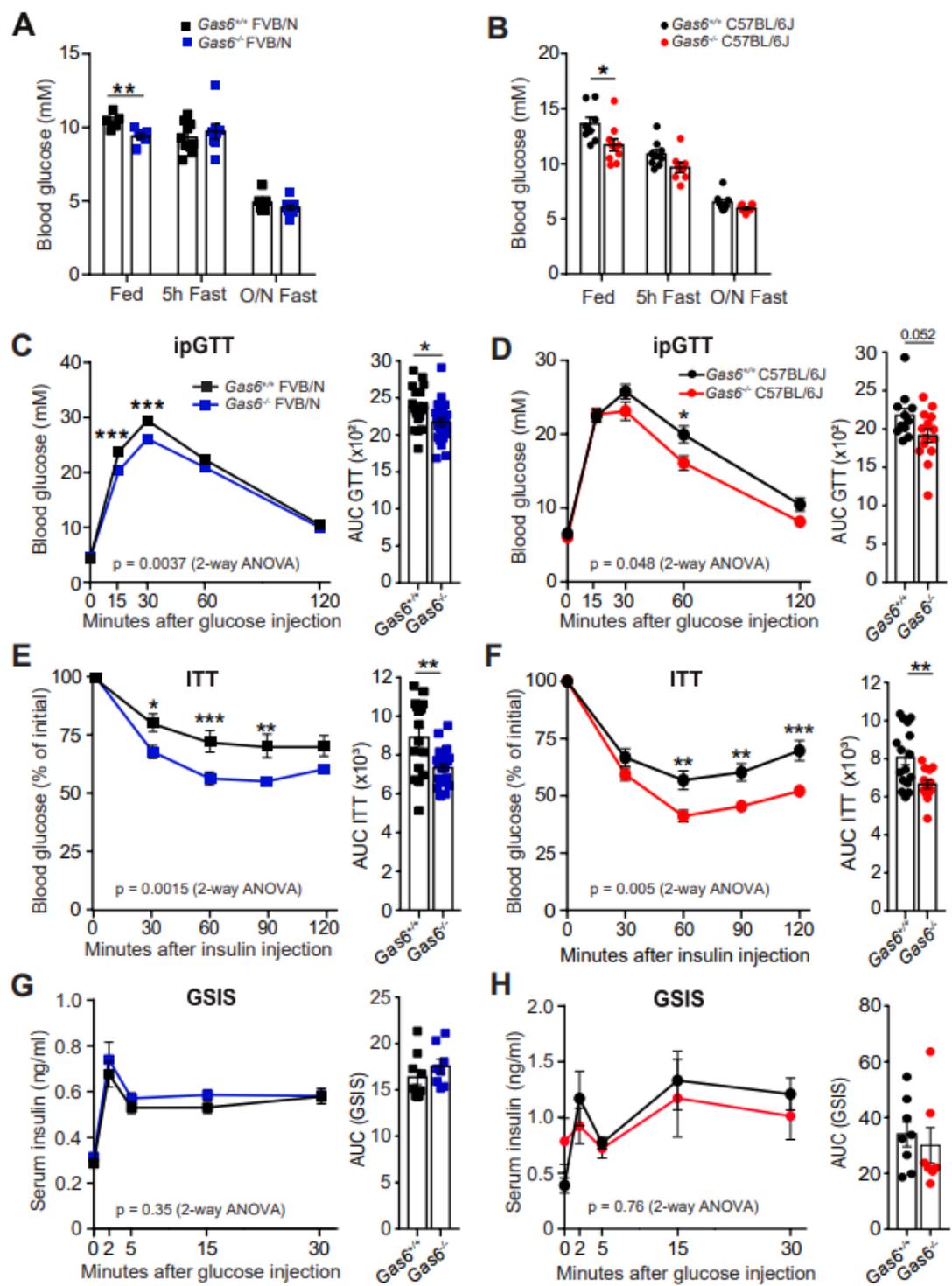


Figure 1. GAS6 deficiency improves glucose tolerance and insulin sensitivity in FVB/N and C57BL/6J mice under normal diet.

Metabolic parameters of 3-month-old *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} FVB/N (blue) and C57BL/6J (red) male mice. **(A-B)** Fed and fasting (5h or 16h) blood glucose levels in *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice (n=5-10). **(C-D)** Glucose Tolerance Test (GTT) results for *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice and Area Under the Curve (AUC) (n=11-25). Mice were fasted for 16 hours and injected i.p. with 2g/kg of glucose. **(E-F)** Insulin Tolerance Test (ITT) was performed in *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice that were subjected to a 5h-fast and injected i.p. with 0.6 U/kg of insulin (n=14-25). Results are expressed as a percentage of basal glycemia and AUC. **(G-H)** Glucose Stimulated Insulin Secretion (GSIS) test and AUC in *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice injected i.p. with 3g/kg of glucose after 16 hours of fasting (n=7-9). Serum was harvested at 0, 2, 5, 15 and 30 minutes and insulin was measured by ELISA. Results represent mean \pm SEM, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 by unpaired, 2-tailed Student's *t* test **(A-B)** and for AUC **(C-H)**, or by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiple comparisons test **(C-H)**.

Gas6-deficient mice are protected from diet-induced insulin resistance

Gas6^{-/-} mice fed a normal chow diet displayed improved insulin sensitivity, therefore we then investigated whether GAS6 deficiency could also have beneficial effects on glucose metabolism in a model of obesity induced by a high-fat and high-sucrose diet (HFHS). This study was performed only in *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice on C57BL/6J genetic background, since this inbred strain is more susceptible to diet-induced obesity compared to FVB/N (38, 39). As expected, HFHS-fed mice gained significantly more weight compared to the mice fed standard chow diet throughout the 12 weeks of the study (**Fig.2A**). Of note, *Gas6*-deficient mice gained as much weight as their control littermates. Analysis of whole-body composition by EchoMRI revealed that mice fed HFHS diet have increased fat mass and reduced lean mass regardless of the genotype of the animals (**Fig.2B-C**). The weight of individual epididymal and subcutaneous white adipose tissues (eWAT and scWAT) was also increased significantly in mice under HFHS diet compared to chow diet, but no difference was detected between *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice (**Fig. 2D-E**). Moreover, obesity is associated with increased in WAT inflammation. To assess the role of GAS6 in inflammation, we performed histological analysis on eWAT of *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice fed with chow or HFHS diet. The analysis revealed an increase in macrophages infiltration induced by the diet but not by the genotype (**Fig.S2**). Altogether, these results suggest that inactivation of *Gas6* in mice does not protect against diet-induced obesity.

Next, we examined the impact of *Gas6* inactivation on glucose intolerance and insulin resistance in the context of this diet-induced obesity. As expected from previous studies (40), following a 6h fast, control mice (*Gas6*^{+/+}) under HFHS diet displayed a significant increase in blood glucose in comparison with those fed chow diet (**Fig.2F**). In contrast, in *Gas6*^{-/-} mice fed HFHS diet there was no increase in fasting glycemia, and their fasting blood glucose was comparable with the ones of control chow-fed mice (**Fig.2F**). Strikingly, the glucose tolerance determined by GTT of *Gas6*^{-/-} mice fed HFHS diet was similar to *Gas6*^{+/+} mice fed with chow diet, whereas *Gas6*^{+/+} mice fed HFHS diet were glucose intolerant (**Fig.2G**). Insulin sensitivity, assessed through ITT, was also markedly improved in *Gas6*^{-/-} mice fed HFHS diet compared to *Gas6*^{+/+} littermates (**Fig.2H**). Insulin secretion following a glucose load (GSIS) tended to be higher in some of the *Gas6*-deficient mice under HFHS diet, but this difference did not reach statistical significance (**Fig.2I**). Altogether, these data

indicate that the inactivation of *Gas6* can prevent insulin resistance and glucose intolerance induced by HFHS diet without affecting body weight and body composition.

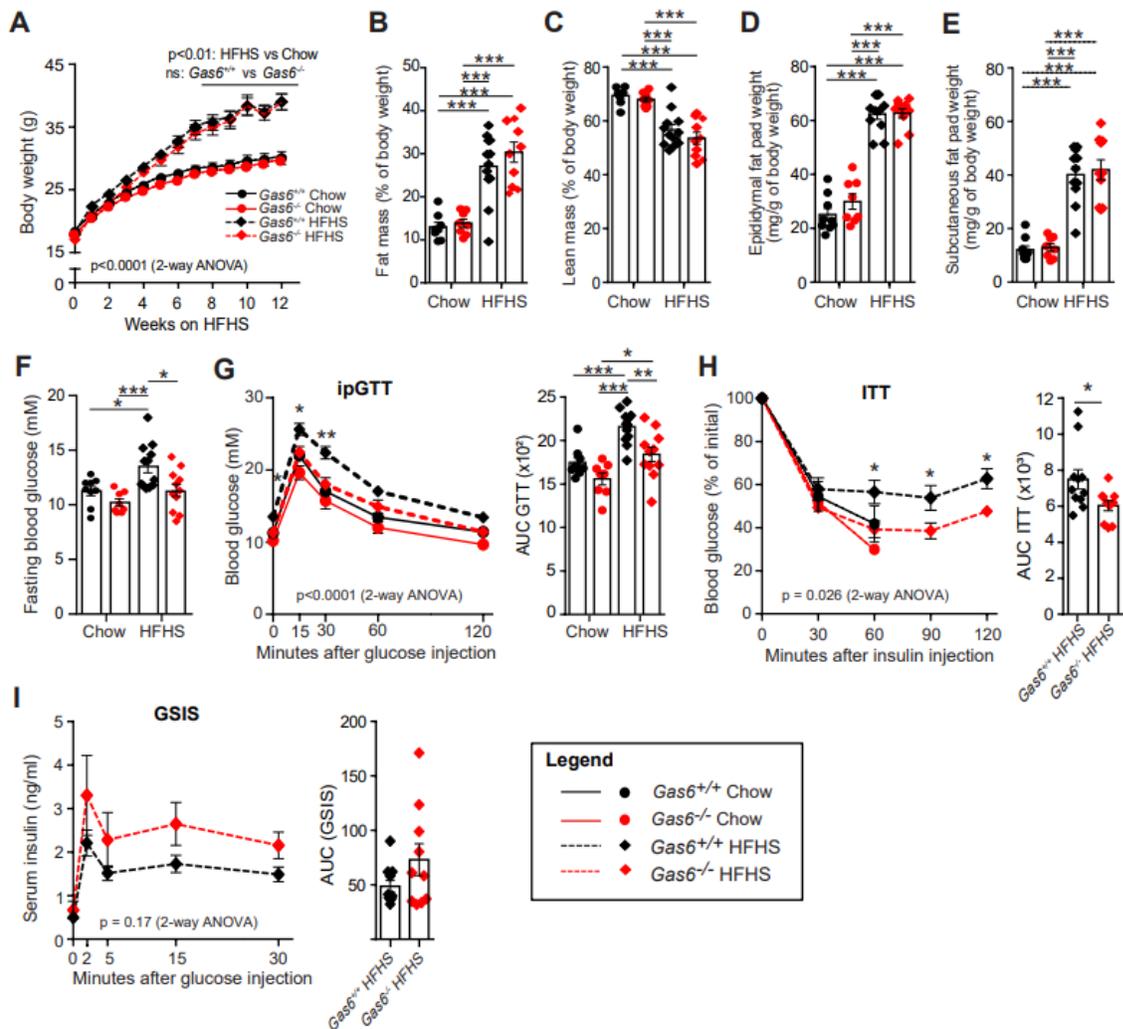


Figure 2. GAS6 deficiency protects from High-Fat/High-Sucrose diet-induced insulin resistance independently of body weight in mice.

(A) Body weight, percentage of total (B) fat and (C) lean mass over body weight and (D) epididymal and (E) subcutaneous fat pad weight of $Gas6^{+/+}$ and $Gas6^{-/-}$ mice fed with chow diet (Chow) or a High-Fat/High-Sucrose diet (HFHS) for 12 weeks (n=8-12). (F) Six hours fasting blood glucose. (G) GTT results and AUC for $Gas6^{+/+}$ and $Gas6^{-/-}$ mice (n=8-12). Mice were fasted for 5 hours and injected i.p. with 1g/kg glucose. (H) ITT performed in $Gas6^{+/+}$ and $Gas6^{-/-}$ mice that were subjected to a 5h-fast and injected i.p. with 0.75U/kg of insulin (n=7-11). Results are expressed as a percentage of basal glycemia and AUC. (I) GSIS test in $Gas6^{+/+}$ and $Gas6^{-/-}$ mice fasted for 16 hours and injected i.p. with 3g/kg glucose (n=10-11) and AUC. Results represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiples comparisons test (A and G-I), by 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post test (B-F and AUC for G) or by unpaired, 2-tailed Student's *t* test (AUC for H-I).

Increasing GAS6 circulating levels reduces insulin sensitivity in mice

Having established that a GAS6 loss-of-function model has improved insulin sensitivity, we then aimed to determine if increasing circulating GAS6 levels is sufficient to decrease insulin sensitivity. For that purpose, we generated a transgenic gain-of-function mouse model in which the liver-specific regulatory sequences of the human *APOE* gene (41, 42) were used to achieve ectopic expression of a MYC-HIS-tagged version of GAS6 in hepatocytes and thereby in blood (**Fig.3A**). The liver was selected as a site of expression for two reasons. First, overexpression of secreted proteins in hepatocytes using the human *APOE* promoter was previously shown to result in significantly increased circulating levels of these proteins (43). Second, the liver being a major site of production for vitamin K-dependent proteins such as prothrombin, the GAS6-MYC ectopically produced by this organ will be fully carboxylated and active.

Quantitative PCR (qPCR) confirmed that *Gas6* mRNA levels were ~18 times higher in the liver of the *ApoE-Gas6^{Tg}* mice compared to wild type (WT) littermate mice (**Fig.3B**). *Gas6* expression was unaffected in other tissues such as skeletal muscle, epididymal white adipose tissue (eWAT) or brown adipose tissue (BAT). Circulating levels of GAS6, measured using a specific ELISA assay, were approximately 8 times higher in the transgenic animals as compared to WT (**Fig.3C**). The impact of this chronic increase in serum GAS6 levels on insulin sensitivity was next assessed in mice fed standard chow diet. Systemic elevation of GAS6 had no impact on body weight at 3 or 6 months of age compared to WT mice (**Fig.3D**). At 3 months of age, *ApoE-Gas6^{Tg}* mice did not show any changes in glycemia, in fed or fasted conditions, when compared with control mice (**Fig.3E**). However, we observed at this age a significantly reduced insulin sensitivity in the *ApoE-Gas6^{Tg}* mice (**Fig.3F**). Six-month-old *ApoE-Gas6^{Tg}* mice displayed a significantly increased glycemia in fed conditions and after a 5h fasting period (**Fig. 3G**), while insulin sensitivity was still reduced compared to WT mice (**Fig.3H**). Glucose tolerance was not significantly affected in *ApoE-Gas6^{Tg}* mice, at 3 and 6 months (**Fig. S3A-B**), suggesting that the reduced insulin sensitivity was counterbalanced by glucose disposal mechanisms independently of insulin (44). Altogether, these results show that increasing GAS6 circulating levels is sufficient to reduce insulin sensitivity *in vivo*.

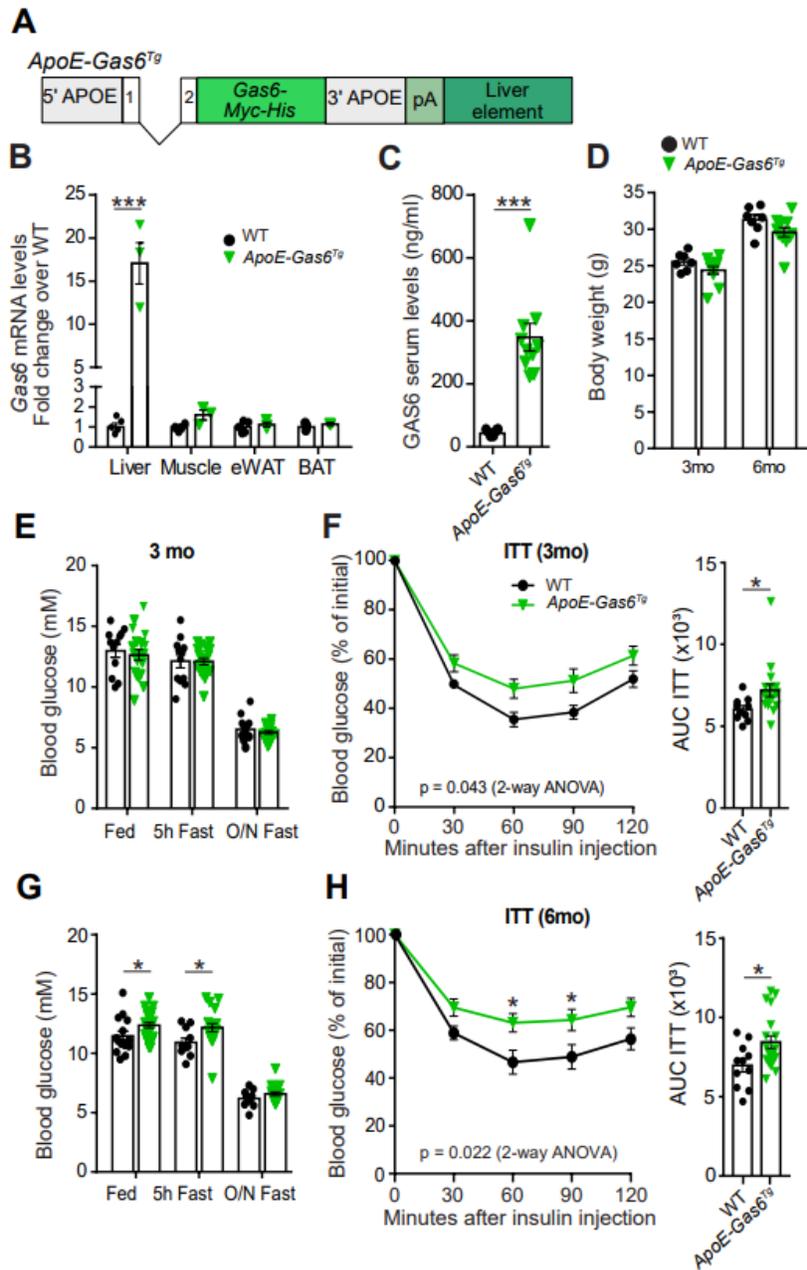


Figure 3. Increasing GAS6 circulating levels reduces insulin sensitivity.

(A) Schematic representation of the construct used to generate *ApoE-Gas6^{Tg}* mice. *Gas6-Myc-6xHis* was cloned in the pLIV.7 vector containing exon 1 and 2, liver-specific regulatory sequences and 5' and 3' flanking sequences of the human *APOE* gene. **(B)** *Gas6* gene expression in tissues from WT and *ApoE-Gas6^{Tg}* mice was assessed by quantitative PCR (qPCR) and normalized to *Actb* ($n = 3-5$). **(C)** GAS6 serum levels in WT and *ApoE-Gas6^{Tg}* mice were measured by ELISA ($n=6-10$). **(D)** Body weight of WT and *ApoE-Gas6^{Tg}* mice at 3 and 6 months of age ($n=5-11$). **(E and G)** Fed and fasting (5h or 16h) blood glucose levels in WT and *ApoE-Gas6^{Tg}* mice at 3 and 6 months of age ($n=12-24$). **(F and H)** ITT results for WT and *ApoE-Gas6^{Tg}* at 3 and 6 months of age mice that were subjected to a 5h-fast and injected i.p. with 0.75U/kg of insulin ($n=10-19$). Results are expressed as a percentage of basal glycemia. Results represent mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by unpaired, 2-tailed Student's *t* test (**B-G** and AUC for **F** and **H**), or by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiple comparisons test (**F-H**).

AXL is expressed and activated by GAS6 in muscle cells

The analyses of gain- and loss-of-function mouse models presented above suggest that GAS6 influences glucose metabolism by altering the response to insulin. We hypothesized that GAS6 may influence insulin response in insulin-sensitive tissues through binding and activation of one or several of its receptor(s). We therefore investigated the expression pattern of GAS6 and TAM receptors across tissues involved in glucose metabolism, including several insulin-sensitive tissues. *Gas6* was strongly expressed in eWAT and scWAT but significantly less in BAT, liver and pancreatic islets (**Fig.4A**). Interestingly, *Gas6* mRNA was also highly expressed in oxidative (i.e., soleus) and glycolytic (i.e., gastrocnemius, tibialis anterior, extensor digitorum longus) skeletal muscles (**Fig.4A**). To identify potential GAS6 target tissues, we then assessed by qPCR the expression pattern of the TAM receptors, *Axl*, *MerTK* and *Tyro3* (**Fig.4B-E**). *Axl* and *MerTK*, but not *Tyro3*, were highly expressed in adipose tissues (**Fig.4B**). *MerTK* was more expressed than *Axl* in both liver and islets (**Fig.4C-D**). *Axl* was the most highly expressed TAM receptor in all types of muscles studied compared to *MerTK* which is weakly present, while *Tyro3* is almost undetectable (**Fig.4E**). Comparing the expression levels of TAM in all tested tissues, *Axl* is the most strongly expressed TAM in skeletal muscles. It is worth noting that *Gas6* and *Axl* expression patterns are very similar with high levels in both skeletal muscle and white adipose tissue. Since *Gas6* and *Axl* are most strongly expressed in skeletal muscle and because this tissue is responsible for ~80% of glucose uptake in response to insulin in the postprandial state (45), we decided to further investigate a potential role of GAS6 on insulin response in skeletal muscle cells.

To study the action of GAS6 and its receptors on insulin-sensitive cells *in vitro*, we used the C2C12 myoblast cell model which can be differentiated into myotubes, which responds robustly to insulin (46). As it was observed in primary skeletal muscles, we found that *Axl* is highly expressed in C2C12 cells (**Fig.4F**). Since AXL is the TAM family member with the highest affinity for GAS6 (18), we focused our study on this receptor. To determine if GAS6 can activate its receptor in insulin-sensitive cells, we first produced and purified recombinant mouse GAS6. To do this, we generated HEK Flp-In T-REx 293 cells so that GAS6-MYC-His could be expressed in a tetracycline-

inducible manner. Cells were cultured in the presence of vitamin K to induce GAS6 γ -carboxylation (GAS6) or warfarin to produce uncarboxylated GAS6 (ucGAS6).

The level of γ -carboxylation of these recombinant GAS6 was confirmed by Western blot using an α -Gla-specific antibody (**Fig.4G**). We then tested the activity of these proteins in a cell culture context. Phosphorylation of AXL and its downstream target AKT increased when myotubes were treated with GAS6 (100 or 200ng/ml), but not with ucGAS6 (**Fig.4H**), confirming that GAS6 was active, and that γ -carboxylation is necessary for its activity. We also found that GAS6 induces AXL and AKT phosphorylation in a dose-dependent manner with maximal activation at 200ng/ml (**Fig.4I**).

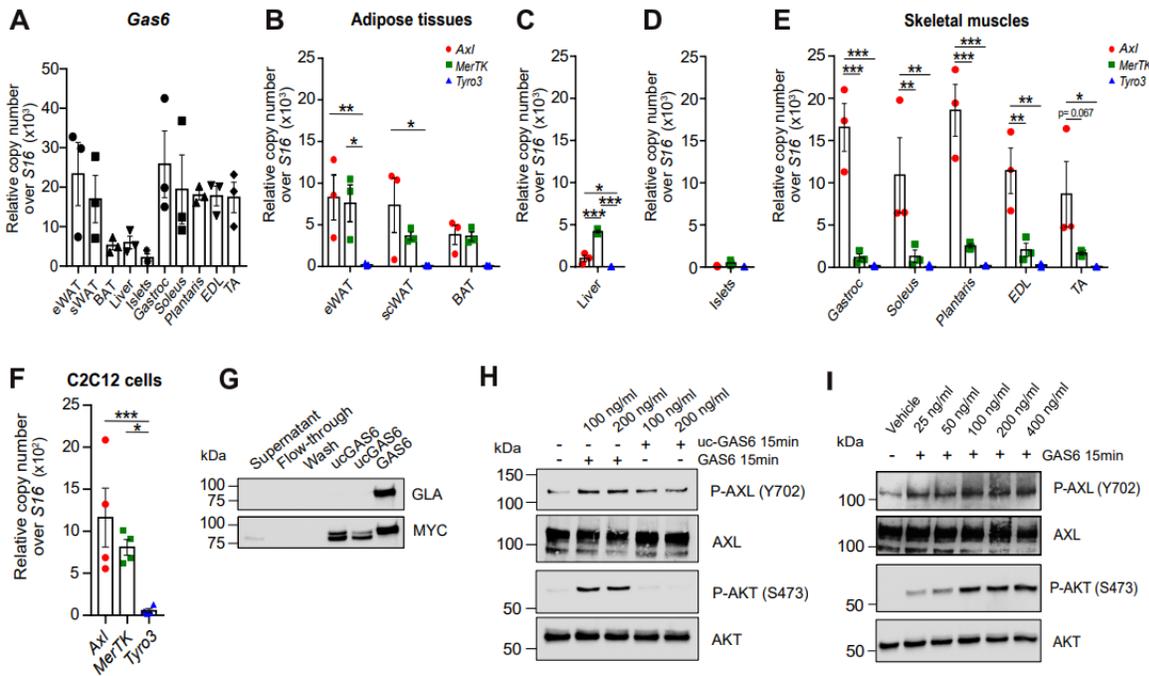


Figure 4. GAS6 can activate AXL receptor in muscle cells.

(A) *Gas6* and **(B-E)** *Axl*, *Mertk* and *Tyro3* (TAM receptors) expression in tissues from WT mice was measured by quantitative PCR (qPCR) (n=3). *eWAT*: epididymal White Adipose Tissue, *scWAT*: subcutaneous White Adipose Tissue, *BAT*: Brown Adipose Tissue, *Gastroc*: Gastrocnemius, *EDL*: Extensor Digitorum Longus, *TA*: Tibialis Anterior. Results are represented as copy number normalized to *S16*. **(F)** TAM receptors expression in C2C12 cells was measured by qPCR (n=4). Results are represented as copy number normalized to *S16*. **(G)** Carboxylation at different steps of GAS6 purification, tested using α -Gla antibodies on Western blot analysis. MYC was used to identify GAS6-Myc-His protein. **(H)** Phosphorylation of AXL (Y702) and AKT (S473) in C2C12 myotubes treated with uncarboxylated (uc) or carboxylated GAS6 (200 ng/mL) for 15 minutes was detected by Western blot analysis. Total AXL and total AKT were used as loading controls. **(I)** Dose-response of AXL and AKT activation in C2C12 cells treated with GAS6. Results represent mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by 1-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiple comparisons test **(B-E)**.

GAS6 suppresses insulin response in muscle cells

Next, we aimed to determine if GAS6 and AXL could impact insulin signaling. C2C12 cells were pre-treated for 8 or 24 hours with GAS6 (200 ng/ml) or a vehicle, followed by a 15-minute treatment with insulin. A 24-hour long treatment with GAS6 significantly decreases by ~2-fold the phosphorylation of the insulin receptor (IR) induced by insulin treatment (**Fig.5A-B**). An intermediate reduction was observed with the 8-hour GAS6 treatment. To evaluate the impact of GAS6 on the downstream insulin signaling pathway, we also assessed AKT phosphorylation. After 24 hours of GAS6 treatment, AKT phosphorylation on S473 was significantly reduced following stimulation with insulin (**Fig.5A-B**). Similar results were obtained in L6-GLUT4myc cells, a rat myoblastic cell line that stably expresses GLUT4 protein coupled with a myc tag (**Fig.S4A**). Using this model, we observed that 24 hours of GAS6 treatment affected insulin-induced translocation of GLUT4 to the plasma membrane (**Fig. S4B-C**). These results suggest that chronic exposure to GAS6 reduces the capacity of these muscle cells to respond to insulin.

AXL interacts with the insulin receptor

It was previously reported that AXL can heterodimerize with other plasma membrane receptors, such as EGFR, and rewire the signaling pathways normally elicited by these receptors (47, 48). Having established that GAS6 activates AXL at the surface of C2C12 cells and concomitantly reduces insulin-dependent signaling, we then sought to determine if AXL interacts with IR. We first performed co-immunoprecipitation (co-IP) in HEK293 cells transfected with AXL-Flag and/or IR-HA expression vectors. The result of these experiments indicate that IR can be co-immunoprecipitated with AXL (**Fig.5C**). To corroborate these results, we next used BioID, a proximity biotin labeling assay (49). HEK293 Flp-In T-REx cells expressing the AXL-BirA*-Flag fusion protein were treated with biotin for 24h to induce the biotinylation of AXL proximal proteins which were then pulled down using streptavidin Sepharose beads and detected by Western blot. The results obtained using this approach also suggest that endogenous IR does interact with AXL in mammalian cells (**Fig.5D**). Interestingly, we also observed that the interaction between AXL and IR is about 4-fold stronger when the cells are stimulated with insulin (**Fig.5E**). In these experiments performed in HEK293 cells and as previously reported (26), we observed that overexpressed AXL-BirA*-Flag was phosphorylated even in the absence of ligand, indicating ligand-independent

activation of AXL kinase activity. Taken together, these results suggest that AXL interacts with IR in an insulin-dependent manner.

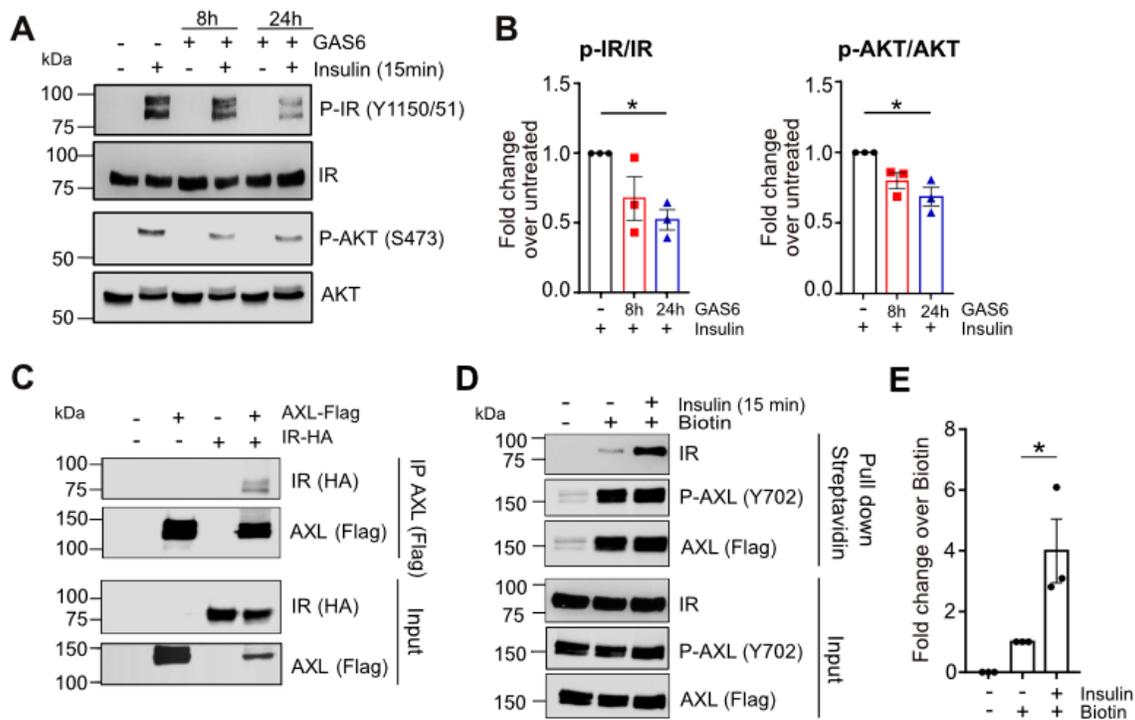


Figure 5. Crosstalk between AXL and Insulin Receptor signaling pathways.

(A) Insulin signaling pathway activation in C2C12 cells treated with GAS6 (200 ng/ml) for 8h or 24h followed by insulin stimulation (100 nM) for 15 minutes. Phosphorylation of Insulin Receptor (IR-Y1150/1151) and AKT (S473) assessed by Western blot analysis. Total IR and total AKT were used as loading controls. **(B)** Quantification of phosphorylation levels of the different phosphorylated protein on the amount of total protein. **(C)** AXL and IR interaction was tested by co-immunoprecipitation in HEK293 transfected with AXL-BirA*-Flag and IR-HA plasmids using α -Flag immunoprecipitation followed by Western blot analysis with α -HA and α -Flag antibodies. **(D)** Proximity-dependent biotinylation (BiOIDD) assay performed with AXL-BirA*-Flag in HEK293 Flp-In T-REx cells show that AXL interacts with endogenous IR. **(E)** Quantification of endogenous IR signal detected by streptavidin pulldown. Results represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, by 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post test ($n=3$).

GAS6 reprograms insulin-dependent signaling pathways in muscle cells.

To uncover signaling pathways modulated by GAS6 in muscle cells which could impact insulin signaling, we compared the skeletal muscle (gastrocnemius) transcriptome of *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice. This analysis revealed that only 17 genes were significantly dysregulated in the absence of GAS6 (P -adj < 0.05; **Fig.S5A-B**). Pathway enrichment analysis on this small group of genes failed to detect any significantly enriched pathways or Gene Ontology term. The mRNA encoding for IR (*Insr*) was reduced by ~30% in the muscle of *Gas6*^{-/-} mice, however, this did not translate into a significant change at the protein level (**Fig.S5C**). These results show that GAS6 has a limited effect on muscle gene expression, suggesting that it may influence insulin signaling through post-translational mechanisms.

To have a better understanding of the molecular effects of GAS6 on insulin-dependent signaling, we performed a quantitative phosphoproteomic analysis. C2C12 cells were treated with 200ng/ml of GAS6 or a vehicle for 24h, before being stimulated or not with 100 nM of insulin for 15 minutes (**Fig.6A**). Following cell lysis and proteolytic digestion, phosphoserine and phosphothreonine containing peptides were enriched using TiO₂ chromatography. Samples were then labeled with Tandem Mass Tags (TMT) and combined to be analyzed by high-resolution liquid chromatography–tandem MS (LC-MS/MS) to quantify the relative abundance of phosphopeptides modulated by GAS6, insulin or their combination (50). The experiment was independently repeated three times and normalized over untreated condition. Only the peptides detected and quantified in all the experiments were considered for further analysis. Using this approach, quantitative data were obtained for a total of 1491 unique phosphopeptides, originating from 712 different proteins. We then performed a series of pairwise comparisons between each of the 4 conditions. For the following analyses, we only included peptides that were modulated by at least 1.5-fold between two given conditions with a P value \leq 0.05.

Only 54 phosphopeptides were found to be significantly modulated by the 24h GAS6 pretreatment compared to untreated cells (**Fig.6B**). A larger number of phosphorylation sites were up- or down-regulated following the 15 minutes insulin treatment, both in the presence and absence of GAS6 pretreatment (**Fig.6B-C**). Interestingly, the total number of unique phosphopeptides changed by insulin following GAS6 pretreatment was approximately 6-times

higher when compared to insulin alone (549 vs. 107 phosphopeptides; **Fig.6B-C**). However, the overlap between these two groups was limited, with only 24 phosphopeptides upregulated and 16 downregulated by insulin both in the presence and absence of GAS6 (**Fig.6C**). These results suggest that GAS6 treatment significantly modifies the insulin-dependent phosphoproteome in C2C12 cells.

Phosphopeptides were next grouped into 6 clusters, based on their significant change of abundance caused by insulin and/or GAS6 treatment (**Fig.6D**). In cluster 1, we identified 70 phosphosites, contained in 49 different proteins, upregulated by insulin alone (Cluster 1- **Fig.6D**). Among those, we were able to identify known downstream targets of the insulin signaling pathway, including IRS1 (S325), AKT1S1 (S210/T273), JUN (S63) or RPS6 (S240). This cluster also includes several additional phosphoproteins involved in cytoskeletal remodeling processes, such as DOCK7 (S180), plectin (S4391/S4393/S4413), Afadin (S1780) or vimentin (S39).

Within the cluster of proteins whose phosphorylation level was decreased after insulin stimulation, we identified 37 phosphosites in a total of 32 proteins (Cluster 2- **Fig.6D**). These proteins are involved in various biological processes such as cell polarity and cell junctions, including microtubule-associated proteins like CLASP1 (S750) and alpha-1-catenin (CTNNA1; S641). A small group of proteins implicated in cytoskeletal regulation was found in both insulin-dependent clusters (Clusters 1-2), including some that were previously mentioned: plectin (S4620/S4629/S4633), vimentin (S56/S83/S419/S430) or DOCK7 (S900). In addition, the phosphorylation of several nuclear proteins, such as MYBBP1A (S1325), ribonucleoprotein NOP58 (S509) and nucleolin (S303), were negatively regulated by insulin. These data are in line with previous phosphoproteomic studies on human muscle cells which also identified several phosphorylation sites negatively regulated by insulin stimulation in nuclear proteins (51, 52).

As noted above, the number of phosphopeptides regulated only by GAS6 treatment is very limited (Clusters 3-4 – **Fig.6D**). No specific known signaling pathway was detected by gene ontology analysis in these two clusters.

The largest number of significantly dysregulated phosphosites was found in clusters 5 and 6, which corresponded to insulin-modulated phosphorylation events significantly influenced by the GAS6 pretreatment. Among these 672 phosphosites, 242 were up-regulated, while 430 were

down-regulated (Clusters 5-6, **Fig.6D**). A total of 436 proteins were affected; 131 showing increased phosphorylation, 217 with decreased phosphorylation, while 44 proteins contained sites regulated in both ways.

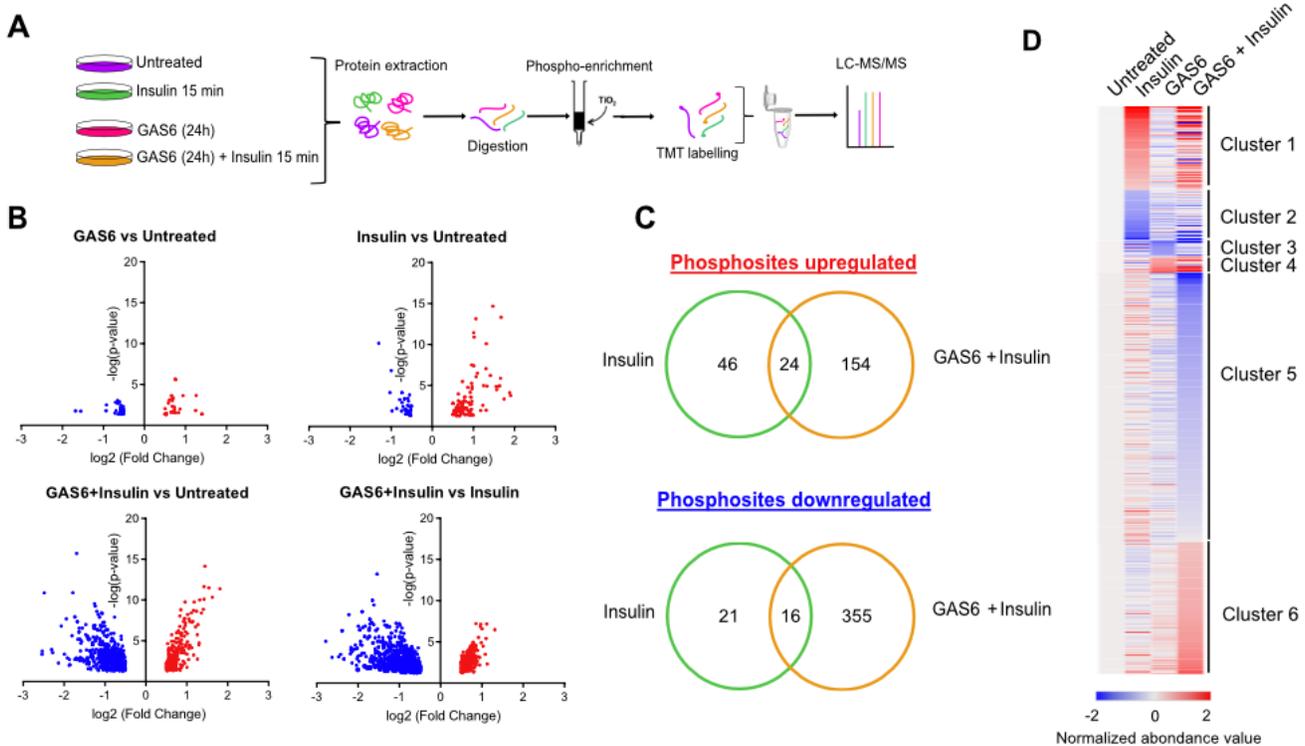


Figure 6. GAS6 regulates the insulin-dependent phosphoproteome in muscle cells.

(A) Representative scheme of phospho-enrichment, TMT labelling and LC-MS/MS analysis of C2C12 treated for 24h with GAS6 (200ng/ml) followed by 15 minutes of insulin stimulation (100nM). **(B)** Volcanoplots of the distribution of phosphopeptides significantly changed between the different treatments. Phosphorylated sites are significantly modulated (p -value < 0.05) and \log_2 Fold change ≥ 0.5 (red plots) or ≤ -0.5 (blue plots) compared to respective control **(C)** Venn diagram of phosphosites upregulated and downregulated by insulin or GAS6 + insulin treatments in comparison to untreated condition. **(D)** Heatmap and clustering of the phosphopeptides regulated by GAS6 and insulin or a combination of both compared to untreated condition.

To characterize how GAS6 influences the response to insulin, we next focused our analysis on the phosphorylation events differentially affected when comparing insulin with insulin in combination with GAS6 (P -adj < 0.05; fold-change \geq 1.5). Using genes names from these special phospho-modulated proteins, we performed gene set enrichment analyses (GSEA) to identify specific cellular processes co-regulated by insulin and GAS6. Reactome pathways enrichment analysis showed that proteins whose phosphorylation was decreased in response to insulin in the presence of GAS6, were mainly associated with RNA metabolism processes such as mRNA splicing, deadenylation-dependent mRNA decay or RNA transport (**Fig.7A-B**). This group of proteins includes members of serine/arginine-rich splicing factors implicated in alternative splicing such as SRSF1 (S199/S201), SRSF2 (S220/S221) or SRSF6 (S301/S303/S314/S316). This group also includes RNA-binding proteins like GEMIN5 (S1413), CNOT2 (S165), a protein involved in RNA degradation, and ribosomal proteins involved in mRNA translation, such as RPS6 (S235/T241), RPL28 (S92), RPL34 (S12). Our data corroborate observations made on myotubes from T2D patients showing decreased phosphorylation levels of proteins involved in different aspects of RNA processing such as several SRSF like SRSF2 (S220) or SRF5 (S253) for splicing, or CNOT2 (S165/S170) for deadenylation (51).

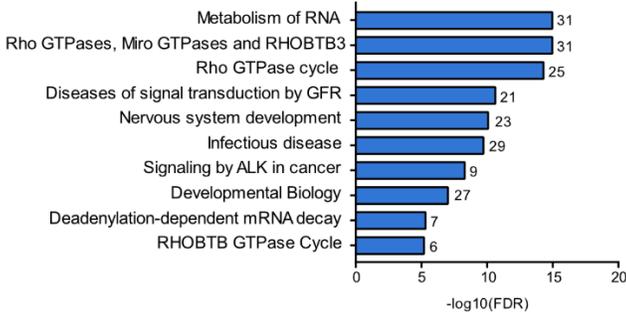
The group of proteins containing phosphorylation sites that are increased by insulin in the presence of GAS6 displayed a very strong enrichment in pathways involving small GTPases of the Rho, Rab, RAC and CDC42 families (**Fig.7C-D**). Importantly, several proteins involved in Rho GTPases signaling contained multiple phosphorylation sites that were up- and down-regulated by insulin in the presence of GAS6 (**Fig.7**). Indeed, we observed that, while there were no specific changes in phosphorylation on RAC1 and CDC42 GTPases, GAS6 altered the phosphorylation of their GEFs, in response to insulin, respectively DOCK7 and ARHGEF40, as well as their kinase targets from the PAK family (PAK1, PAK2 and PAK4) (**Fig.7C-D**).

RAC1 and CDC42 pathways and especially PAK kinases are known to be involved in cytoskeletal remodeling and microtubule stabilization. Accordingly, we also detected cytoskeletal effectors involved in Rho GTPases pathways such as vimentin (S25/S38), filamin A (S942/S944/S2088/S2263), filamin B (S2478) and stathmin (S25/S38).

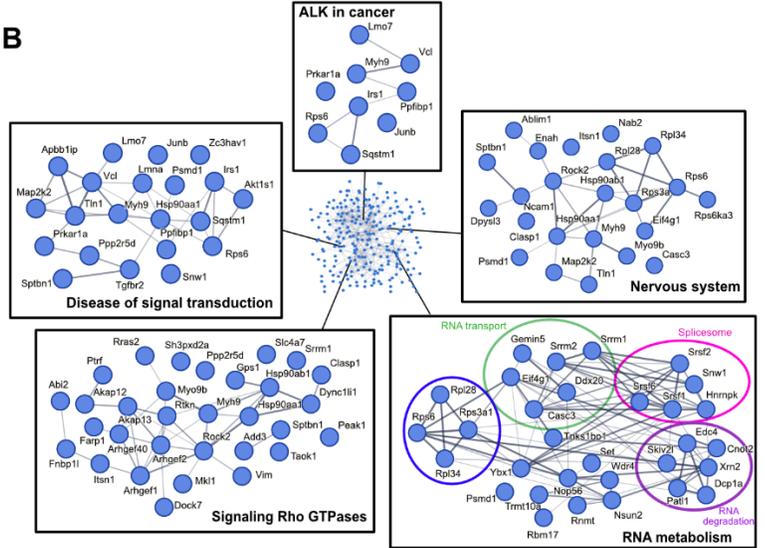
The group of proteins containing phosphorylation sites upregulated by insulin in the presence of GAS6 was also enriched in pathways involved in membrane trafficking and vesicle-mediated transport (**Fig.7C-D**). These include SEC31A (S526) which is a component of the COPII protein complex responsible for vesicle budding from the endoplasmic reticulum (ER) and adaptor-associated protein kinase 1 (AAK1; S635) involved in clathrin-mediated endocytosis. Several proteins of these pathways have a function in endocytosis and endosomal trafficking which concur with the enrichment of Rab family small GTPases pathways known to control vesicular membrane trafficking to late endosomes (**Fig.7D**). Altogether, the analysis of this phosphoproteomic study demonstrates that GAS6 significantly modifies the molecular response to insulin. Instead of affecting the canonical insulin signaling pathway, GAS6 appears to regulate proteins involved in small GTPases signaling, vesicular trafficking and cytoskeleton organization.

A

Reactome decreased by GAS6 + Insulin vs Insulin

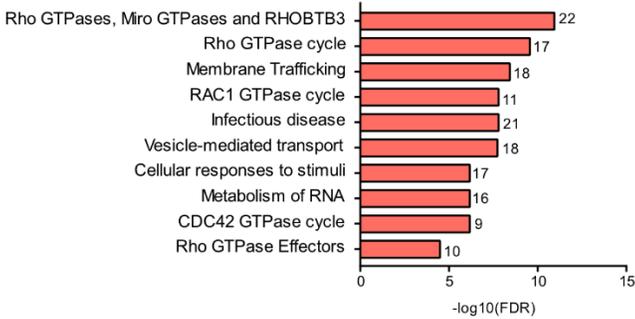


B



C

Reactome increased by GAS6 + Insulin vs Insulin



D

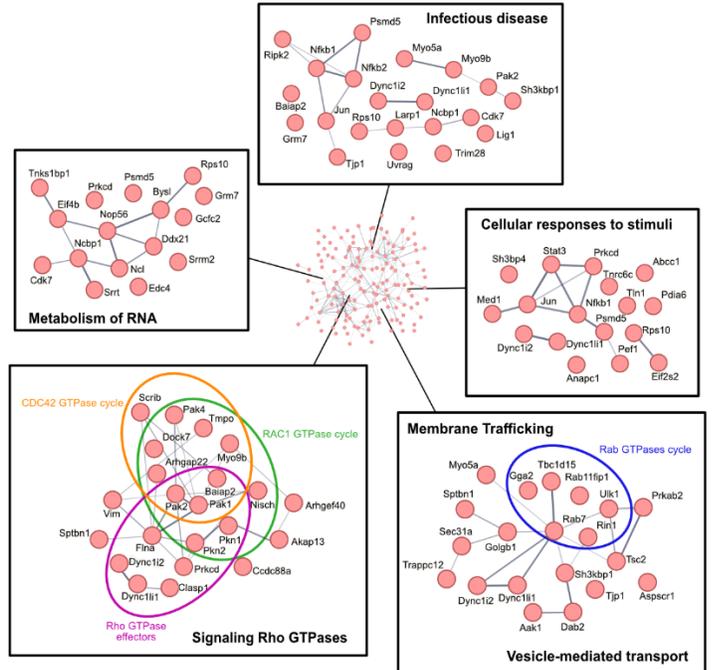


Figure 7. GAS6 reprograms signaling pathways in response to insulin in muscle cells.

(A) Reactome pathway analysis of proteins with decreased phosphorylation when C2C12 cells were treated with GAS6 in combination with insulin or insulin alone, generated by Gene Set Enrichment Analysis (FDR q-value < 0.05). **(B)** Protein-protein interaction network analysis of proteins with decreased phosphorylation when treated with GAS6 and insulin or insulin alone, generated using STRING and Cytoscape. **(C)** Results of GSEA Reactome pathway analysis of proteins with increased phosphorylation when treated with GAS6 in combination with insulin or insulin alone (FDR q-value < 0.05). **(D)** Network layout of protein-protein interaction of proteins with increased phosphorylation when C2C12 cells were treated with GAS6 in combination with insulin or insulin alone, generated using STRING and Cytoscape.

AXL signaling increases insulin receptor endocytosis in response to insulin

The phosphoproteome analysis described above indicates that GAS6 modulates the capacity of insulin to activate cellular pathways linked to endocytosis, vesicle-mediated transport and membrane trafficking. Endocytosis is the major regulator of signaling from receptor tyrosine kinases, including IR (53). Moreover, Rab GTPases are known to play a critical role in endosomal trafficking (54). Further analysis of the phosphoproteins specifically modulated by insulin in the presence of GAS6, uncovered an endosomal trafficking pathway implicating the Rab GTPases, their effectors and other regulators of endocytosis (**Fig.7C-D and 8A**). Early endosomes (EE) are characterized by the presence of Rab5 on their membrane, which allows the recruitment of specific effectors. The Rab5 GEF RIN1 (S257) shows a significant increase in phosphorylation following insulin treatment in the presence of GAS6. Formation of late endosomes consists of a transition of Rab5 to Rab7a at their surface. Our quantitative proteomic data also indicate that Rab7a (S72) itself and TBC1D15 (S205), one of its GAPs, are more phosphorylated following insulin stimulation in the presence of GAS6 (**Fig.8A**). Phosphorylation of Rab7a on S72 was previously shown to facilitate the dynein-driven transport of EGFR, another RTK, toward the perinuclear region (55). These observations suggest that GAS6-dependent signaling may increase the endosomal trafficking following insulin stimulation. This prompted us to investigate whether GAS6- and AXL-elicited signaling could impact insulin receptor (IR) trafficking to late endosomes, thereby leading to insulin resistance.

Visualizing IR trafficking in myoblasts or myotubes is challenging due to cell shape and size, and autofluorescence. We therefore used HEK293 cells, which express endogenous IR and respond to insulin (56) but do not express AXL (57). These cells were transfected with AXL-Flag or an empty vector, treated with insulin for 15 minutes and the cellular localization of IR was assessed by immunofluorescence (**Fig.8B**). Stimulation with exogenous GAS6 was not required since AXL is already robustly phosphorylated in the absence of ligand in this experimental model (see **Fig.5D**) (26). In the absence of AXL and insulin stimulation, IR was detected mostly at the level of the plasma membrane (**Fig.8B**). Following a 15-minute treatment with insulin, IR accumulation is detected inside the cell body closest to the nucleus. In the presence of AXL and in the absence of insulin, the IR exhibits a cellular distribution similar to the one observed in untransfected cells.

However, when the AXL-transfected cells were treated with insulin, a significantly stronger perinuclear accumulation of IR was observed (**Fig. 8B-D**). Moreover, the intracellular IR co-localized with AXL, consistent with the observation that these two receptors interact following insulin stimulation (**Fig. 5C-E**). These results suggest that in the presence of insulin stimulation AXL promotes intracellular IR accumulation.

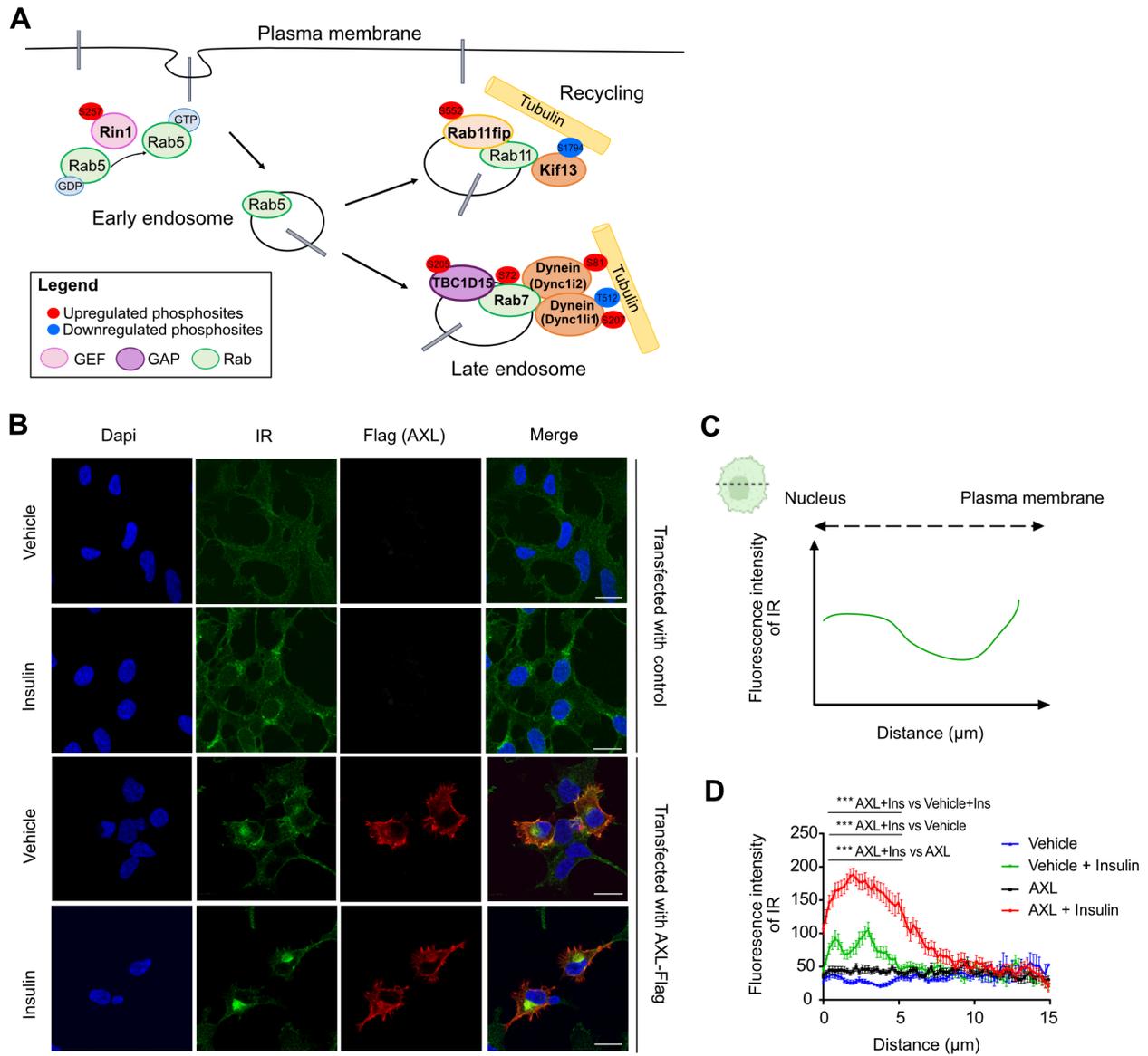


Figure 8. AXL signaling increases insulin receptor endocytosis in response to insulin.

(A) Schematic of the endocytosis pathway involving specific Rab proteins affected by GAS6 pretreatment in combination with insulin. Upregulated and downregulated phosphosites are represented in red and blue respectively. **(B)** Representative confocal images of HEK cells transfected with AXL-Flag treated or not with 100 nM insulin for 15 minutes. Cells were stained for AXL-Flag (Cy3/red) and endogenous IR (Alexa-Fluor 488/green). Scale bar, 20 μm . **(C)** Representation of the fluorescence intensity quantification across the cell. Fluorescence intensity is defined as the distance between the edge of the nucleus and the plasma membrane. **(D)** Quantification of IR fluorescence signal in the different conditions. Results represent mean \pm SEM. *** $P < 0.001$, by 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post test ($n=3$ experiments).

Based on the phosphorylation events induced by GAS6 and insulin in myoblastic cells, we next hypothesized that the intracellular accumulation of IR in the presence of AXL and insulin was due to increased trafficking of this receptor to the late endosomes. To visualize late endosomes, the cells were transfected with mScarlet-tagged Rab7a in the presence or absence of AXL and the IR localization was examined before and after treatment with insulin. We verified that Rab7a-mScarlet expression did not affect the trafficking of IR and AXL in the presence and absence of insulin stimulation (**Fig. 9B**). The cellular distribution of IR and Rab7 was then quantified in the different conditions. These analyses revealed that in the presence of insulin, IR is partly redistributed from the membrane toward the perinuclear region in Rab7-positive endosomes (**Fig. 9A-C**). Strikingly, in the presence of AXL, the intracellular accumulation of IR in the Rab7-labeled late endosomes was significantly increased (**Fig. 9A-C**). Altogether, these data suggest that AXL signaling potentiates insulin-induced IR trafficking to the late endosomes, potentially explaining the inhibitory effect of GAS6 on insulin signaling and insulin sensitivity.

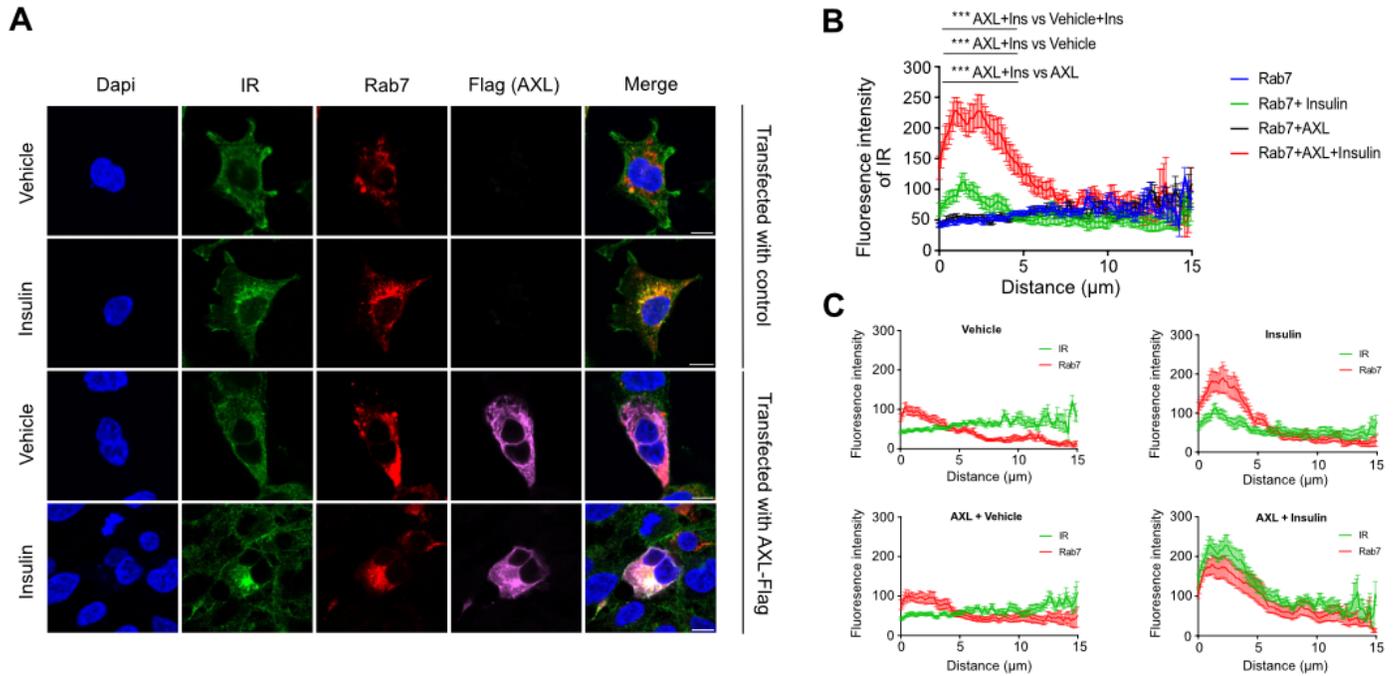


Figure 9. AXL signaling increases insulin receptor endocytosis trafficking to the late-endosomes in response to insulin

(A) Confocal images of HEK cells transfected with AXL-Flag and Rab7-mScarlet treated or not with 100 nM insulin for 15 minutes. Cells were stained for AXL-Flag (Alexa Fluor 633 -magenta) and endogenous IR (Alexa-Fluor 488/green). Scale bar, 10 μm . **(B)** Quantification of IR fluorescence signal in the different conditions. **(C)** IR and Rab7 fluorescence signal across the cells in the respective conditions. Results represent mean \pm SEM. *** $P < 0.001$, by 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post test ($n=3$ experiments).

DISCUSSION

Genetic and cross-sectional studies previously suggested an association between GAS6, glucose metabolism, insulin resistance and diabetes in humans. However, the directionality of the connection between GAS6 levels and glucose metabolism, and the potential mechanism by which GAS6 may influence insulin sensitivity were unknown. Using gain- and loss-of-function mouse models, the present study establishes that GAS6 negatively impacts glucose tolerance mainly by reducing insulin sensitivity *in vivo*. Moreover, our data indicate that GAS6/AXL signaling profoundly affects the molecular pathways downstream of the IR in insulin-sensitive cells leading to increased IR trafficking to the late endosomes and reduced insulin response. Altogether, this work delineates a physiological and cellular mechanism by which GAS6 influences glucose metabolism.

Impact of GAS6 on glucose metabolism *in vivo*

A few studies have investigated the role of GAS6 and AXL in obesity and glucose metabolism using various mouse models, leading to conflicting results. It was reported for instance that *Gas6*^{-/-} mice on a mixed genetic background (Swiss:129SV, 50:50) accumulate less WAT compared to *Gas6*^{+/+} mice when fed a high-fat diet (58). Similarly, treatment with R428 (25mg/kg twice a day), a pharmacological inhibitor of AXL, resulted in significantly reduced weight gain and subcutaneous and gonadal fat mass in C57Bl/6 mice fed a HFD (59). Interestingly, fed blood glucose was also reduced by the R428 treatment. In contrast, *Axl*^{-/-} mice on a different mixed genetic background (C57Bl/6:129S1, 50:50) fed a HFD displayed no difference in adipose depot mass compared to controls (60). Importantly, glucose tolerance and insulin sensitivity were not investigated in detail in these different studies.

In contrast to these studies, here we extensively characterize the glucose and metabolic phenotype of *Gas6*^{-/-} mice on pure inbred genetic backgrounds. Our data show that in these well-controlled conditions, *Gas6*-deficiency does not impact body weight and adipose tissue mass on normal chow diet or HFHS diet. Our data also show that GAS6 does not affect food intake and energy expenditure. However, genetic ablation of GAS6 was associated with reduced blood glucose and improved glucose tolerance and insulin sensitivity in our models. Our data are in line

with the previously reported lack of impact of *Axl* inactivation on fat mass on chow or HFD. R428 is a specific inhibitor of AXL but can inhibit other receptor tyrosine kinases at high doses, including IR, EGFR, MerTK and TYRO3. Off-target effects may therefore potentially explain the reported impact of R428 treatment on fat depots in mice.

It was also reported that recombinant GAS6 can increase neonatal pancreatic b-cell proliferation, while inhibiting glucose-stimulated insulin secretion and downregulating the adult b-cell marker *Mafa* (61). Inversely, R428 increases *MAFA* expression *in vitro*, in a dose-dependent manner, in b-cells differentiated from human embryonic stem cells (hESC)(62). Although we did not directly investigate b-cell proliferation in our *Gas6*^{-/-} mice, glucose-stimulated insulin secretion was not affected by the absence of GAS6 in adult animals. This does not rule out a potential role for GAS6 and AXL during b-cell development but indicates that in adult mice this signaling pathway is not required for normal b-cell function. Altogether, the comprehensive phenotyping of *Gas6*^{-/-} mice presented here reveals that GAS6 negatively impacts glucose handling, mainly by improving whole body insulin sensitivity.

AXL and IR interaction

Using two different approaches, co-IP and BioID, we provide evidence of AXL and IR heterodimerization in mammalian cells in an AXL overexpression context. AXL has been shown to heterodimerize and/or to crosstalk with other RTK including HER2, EGFR, MET, VEGFR-2 and PDGFRb (47, 63-65). In most cases, the heterodimerization of AXL with another RTK was observed in cancer cells overexpressing AXL and was found to be critical for tumor cells invasiveness and metastasis (26). In these instances, AXL appears to potentiate or diversify the signaling pathways emanating from its partner RTK. The IR-AXL crosstalk we describe here is distinctive since it results in a downregulation of classical IR signaling pathways and an increased trafficking of IR to the late endosomes. Moreover, the IR and AXL interaction appears to be positively regulated by insulin, the IR ligand.

GAS6 rewires insulin molecular response

Through a quantitative phosphoproteomic screen we investigated how a 24h-long GAS6 treatment influences the signaling pathways activated by insulin in muscle cells. In a previous study, we reported the phosphoproteome regulated by a 5-, 10- or 20-minutes stimulation with GAS6 in triple-negative breast cancer (TNBC) (66). Interestingly, this short stimulation revealed that multiple targets of AXL signaling are shared with IR downstream pathways, including PI3KCA, JNK1/2, ERK1/2 and GSK3a. It was also observed that acute activation of the GAS6/AXL axis influences large phosphoprotein networks involved in actin remodeling, GTPases regulation and RNA transport. Some of those pathways appear to be also co-regulated by GAS6 and insulin in our cellular model.

One surprising observation in our screen was that a very limited number of phosphopeptides were affected by the chronic 24h pretreatment of GAS6 alone, while the same treatment in combination with 15 minutes of insulin considerably impacted the phosphoproteome of the cell. This suggests that these few phosphorylation events that are maintained after this long GAS6 stimulation are sufficient to prime the cell for a differential insulin response. Of note, among the proteins differentially phosphorylated following GAS6 treatment we found two serine/threonine kinases involved in the mTORC1 pathway, ULK1 (S450 down) and SIK3 (S456 up) (67, 68). The phosphorylation of RAGTOR1 (T28 up), a subunit of the Ragulator complex involved in the activation of mTORC1, is also modulated by GAS6 alone in C2C12. In addition, the phosphorylation of the tyrosine phosphatase PTPN12/PTP-PEST (S673) was reduced by chronic GAS6 treatment. Interestingly, known targets of this enzyme include several phosphoproteins involved in cytoskeleton remodeling (69). Finally, one regulator of the serine/threonine-protein phosphatase 1 (PP1), PHACTR4 (S264) is phosphorylated in response to GAS6 alone. Therefore, it is likely that the modulation of phosphorylation events in these few kinases and phosphatases by GAS6 is sufficient to influence the molecular response to insulin in muscle cells. Future work will focus on deciphering how these molecular changes occur in response to GAS6/AXL activation and how they control the rewiring of the IR downstream signaling pathways.

Overlap between GAS6-dependent and human T2D phosphoproteome in muscle cells

Two recent studies have investigated the phosphoproteomic changes in human T2D pluripotent stem cell-derived (iPSC-derived) myoblasts (iMyos) (51, 52). When comparing the pathways affected in T2D iMyos and by GAS6/insulin in C2C12, we found a remarkable overlap. For instance, phosphoproteins involved in RNA metabolism, mRNA splicing, diseases of signal transduction, vesicle-mediated transport and signaling by Rho GTPases, are dysregulated in both cases. There was also a strong overlap when looking at the phosphoproteins specifically. These observations suggest that GAS6 induces signaling changes in myocytes that resemble those present in T2D muscle. This is further supporting the notion that GAS6 is a negative regulator of insulin sensitivity in this organ.

GAS6/AXL signaling promotes IR endocytosis

Our phosphoproteomic data have shown that chronic pretreatment of GAS6 on muscle cells significantly increases phosphorylation of several proteins involved in vesicular trafficking in response to insulin, including proteins of Rab GTPases signaling pathway (i.e. Rab7a S72). Our study revealed that AXL increases the internalization of the IR and in particular its localization at the level of RAB7-positive endosomes after insulin stimulation. This change in localization would corroborate several studies showing a decrease in the levels of IR at the plasma membrane in obese and diabetic conditions (70, 71). Moreover, a functional study of specific IR mutations causing severe insulin resistance in humans revealed an enrichment of the IR in the late endosomes (72). We thus propose that GAS6 and AXL reprogram the insulin signaling pathways and promote the endocytosis of the IR which would be responsible for the development of insulin resistance.

In conclusion, our results establish a new role of GAS6 and AXL in the remodeling of insulin signaling in muscle cells and in the development of insulin resistance. This study paves the way for the investigation and development of potential therapeutic approaches using existing pharmacological inhibitors of GAS6/AXL signaling to improve insulin sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs M.D. Blostein and P. Carmeliet for providing the *Gas6*^{-/-} strain and Dr V. Calderon for RNA-Seq analysis. We also thank the staff of IRCM Proteomics, Microscopy, Molecular Biology and Histology Core Facilities for their technical support. This work was supported by funding from the Canada Research Chair program (MF), Diabetes Canada (MF), the Canadian Institutes of Health Research (MF, PJT-159534), and the Cardiometabolic health- Diabetes-Obesity (CMDO) Network (MF). CS received scholarships from IRCM and the Fonds de Recherche du Québec Santé (FRQS). AG received scholarships from IRCM and the Montreal Diabetes Research Center. JL received a fellowship from Diabetes Canada.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF and JL conceived and designed the project. CS, AG, JL, DF, JB and MF collected and analyzed data. JFC provided unique reagents and critical advice for experiments. CS and MF wrote the manuscript.

MATERIALS AND METHODS

Animal models

Gas6^{-/-} mice on a C57BL/6J genetic background were given generously by Dr Peter Carmeliet (The Center for Transgene Technology and Gene Therapy, Flanders Interuniversity Institute of biotechnology, Belgium) (16). *Gas6*^{-/-} mice on a FVB/N genetic background were obtained from Dr Jean-François Côté (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Canada) (26). *ApoE-Gas6*^{Tg} transgenic mice were generated in our laboratory, we added to pLiv.7 plasmid containing liver-specific human APOE promoter and hepatic enhancers the sequence of mouse *Gas6-Myc-His* cDNA (41) (**Supplemental Table 1**). After removing *ApoE-Gas6* transgenic construct from pLiv.7 plasmid with KpnI and XhoI restriction enzymes, we purified and microinjected it into mouse fertilized oocytes (C57BL6/J). We identified transgenic by genotyping using specific primers (**Supplemental Table 1**).

All strains were maintained in an IRCM specific pathogen-free animal facility (SPF+) under 12-hour dark/12-hour light cycles. Mice were fed ad libitum a normal chow diet, unless otherwise specified. Male mice were used in all experiments.

Metabolic Analysis

For glucose tolerance tests (GTT), mice were fasted 5 or 16 hours and injected intraperitoneally (i.p.) with 1 or 2 g/kg glucose respectively. Blood glucose levels were measured at fasting and at 15, 30, 60, and 120 minutes following i.p. injection using Bravo glucometer (EndoMedical Inc.).

For insulin tolerance test (ITT), mice were fasted 6 hours, injected i.p. with Insulin (Humulin R Lilly) (0.6 U/kg for *Gas6*^{-/-} mice or 0.75 U/kg for *ApoE-Gas6*^{Tg} transgenic mice) and blood glucose levels were measured after fasting and at 30, 60, 90, and 120 minutes following injection.

In vivo glucose stimulated insulin secretion test (GSIS) were performed after 16 hours of fasting. Serum insulin levels were measured after fasting and 2, 5, 15, and 30 minutes after i.p. injection with 3 g/kg glucose using a commercial insulin ELISA (Mercodia).

For pyruvate tolerance test, mice were fasted 16 hours, injected i.p with sodium pyruvate (2 g/kg) and blood glucose levels were measured after fasting and at 15, 30, 60 and 120 minutes after injection.

In some experiments, mice were fed a 60% high-fat high-sucrose diet (D12331-5I; Research Diets) for 12 weeks starting from 5 weeks of age. In this case, mice were fasted for 6 hours and injected i.p. with 1 g/kg glucose for the GTT and with 0.75 U/kg insulin for ITT.

Mouse physiological parameters such as food intake, physical activity, O₂ consumption, CO₂ release, and energy expenditure were measured using an 8-chamber Promethion Continuous Metabolic System (Sable Systems International). Data were acquired for 4 days after a 48-hour acclimation period. Body composition was evaluated with an echo-MRI and normalized to body weight.

Cell culture

C2C12 cells (ATCC) were cultured as myoblasts (undifferentiated form) in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (P/S). Differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes was induced by replacing media, after cells reached approximately 70-80% of confluency, with DMEM containing 2% horse serum and 1% P/S, for 5 days and changing media every 2 days. HEK293 cells were cultured in EMEM with 10% heat inactivated FBS and 1% P/S. HEK Flp-In T-REx 293 cells (Thermo Fisher) expressing or not AXL-BirA*-Flag were obtained from Dr Jean-François Côté, and maintained in DMEM, 10% FBS and 1% P/S. L6-GLUT4myc cells were obtained from Dr Nabil Seidah and were cultured as myoblasts in AMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S with 5µg/ml blasticidin. The cells were cultured at 37°C, with 5% CO₂.

Plasmid constructs

pcDNA5-AXL-BirA*-Flag, pOG44 and pmScarlet-C1-Rab7 were a kind gift from Dr. Jean-François Côté. Mouse GAS6-Myc-6xHis was generated by PCR amplification and cloning in the EcoRI and XbaI sites of pcDNA5/FRT/TO-pDEST. Human Insulin Receptor (IR) was generated by PCR amplification and ligated with HA-tag in the HindIII and EcoRI restriction sites of pcDNA3 plasmid. Sequences of the primers used for cloning are included in **Supplemental Table 1**.

Production and quantification of recombinant GAS6 protein

HEK293 Flp-In T-REx cells transfected with pcDNA5-pDEST-mGAS6-Myc-6xHis and pOG44 which expressed the Flp recombinase, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), were used to produce

recombinant mouse GAS6 in a Tetracycline-inducible manner. Cells were then selected with Hygromycin for 12 days. Cells were treated for 48 hours with Tetracycline and Vitamin K1 (22 μ M, Millipore Sigma) in DMEM media without serum. The supernatant was collected and centrifuged to eliminate cells. The recombinant GAS6 protein was purified via His-tag by affinity chromatography using a HisTrap column (Sigma, 1mL) connected to AKTA system. The supernatant was loaded onto the HisTrap column pre-equilibrated with 20-fold column volumes of binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.4) and washed with 10 column volumes of binding buffer at a flow rate of 1 mL/min. Elution was performed using buffer containing: 20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole (pH 7.4). Purified proteins were dialysed with PBS and quantified using mouse GAS6 ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, DY986) following manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation and Western blot assays

Proteins from tissues and cells were extracted with lysis buffer as previously described (42) supplemented with 1 mM PMSF, 1 mM Vanadate, and protease inhibitors (Roche Diagnostics). In order to study short GAS6 stimulation, C2C12 cells were starved overnight in DMEM media with 0.5% FBS and 1% P/S. After two PBS washes, cells were cultured for 2h in serum-free medium supplemented with 10 mM of HEPES pH 4, 0.1% BSA and 1% P/S. Cells were stimulated for 15 minutes with 200 ng/ml of recombinant GAS6. For long GAS6 treatment, C2C12 and L6-GLUT4myc cells were incubated in serum-free medium (supplemented as described above) with or without recombinant GAS6 (200ng/ml) for 8 or 24 hours. Proteins were quantified using Bradford assay (Biorad). For co-immunoprecipitation, HEK293 cells were transfected with pcDNA5-AXL-BirA*-Flag and pcDNA3-IR-HA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After two days, cells were harvested, and 500 μ g of protein lysate was incubated with anti-Flag agarose beads (Sigma) for 2 hours at 4°C with rotation, followed by 4 washes with lysis buffer. Loading buffer was added into co-immunoprecipitated proteins or input samples which were then heated for 10 minutes at 70 °C, followed by standard Western blot protocol. Immunoblots were incubated with the indicated primary antibodies, overnight at 4°C. Immunoblots were then washed with TBST (TBS with 0.1% Tween-20) three times and incubated with the corresponding secondary antibody for 1 hour at

room temperature. Protein signals were then revealed with western ECL substrate (Clarity, Biorad). Quantification of Western blot by densitometry analyses were performed using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories). Antibodies used in this study are listed in **Supplemental Table 2**.

Streptavidin Pull Down

HEK293 Flp-In T-REx cells expressing AXL-BirA*-Flag in a Tetracycline-inducible manner were cultured during 24h with Biotin (50 μ M) and tetracycline (1 μ g/ml). We included a negative control without Biotin. Cells were cultured in 0.5% FBS media overnight, then incubated in serum-free medium (with 0.1% BSA and 10 mM HEPES) for 2 hours followed by 15 min with insulin (100 nM). Proteins from cells were extracted with lysis buffer and 2mg of protein lysate was incubated with anti-streptavidin beads (Sigma) for 3 hours at 4°C with rotation. Beads were then washed 4-6 times with lysis buffer. Biotinylated proteins or input samples were diluted in loading buffer supplemented with 20mM DTT and 2mM biotin. Samples were boiled for 15 minutes at 95°C and used for Western blot analysis.

Immunofluorescence confocal microscopy

HEK293 cells were transfected with pcDNA5-AXL-BirA*-Flag or/and pmScarlet-C1-Rab7. Cells plated on glass coverslips with poly-L-Lysine were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min. Cells were blocked with 5% Normal Donkey Serum in 0.3% Triton for 1h and incubated with the indicated antibodies overnight at 4°C (**Supplemental Table 2**).

Cells were then washed 3 times with PBS and incubated with the corresponding fluorochrome-conjugated secondary antibody for 1h at room temperature (**Supplemental Table 2**). Following this incubation, cells were washed again 3 times with PBS and stained with DAPI. Cells were washed 3 additional times and coverslips were mounted on slides with FluorSave Reagent. Pictures were acquired with Zeiss LSM700 confocal microscope at objective 63X. We used Image J software to quantify Insulin Receptor (IR) and Rab7 localization. For each different condition, IR signal intensity (Alexa488) was measured across the cell, as the distance from the nucleus in order to determine if the localization was intracellular or at the plasma membrane.

Gene expression

Tissues and cells RNA extraction, RNA isolation and cDNA generation were performed as previously described (73). In brief, total mRNA was treated with DNaseI (Invitrogen) and reverse transcribed with random and oligo dT primers using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green qPCR Master Mix (BiMake) with gene-specific primers (**Supplemental Table 1**) on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). *Gas6* and TAM receptors gene copy numbers were calculated with a genomic DNA standard curve and variation between biological replicate was normalized to S16 expression.

Protein digestion for phosphoproteome

C2C12 cells were incubated in serum-free medium with or without recombinant GAS6 (200ng/ml) for 24 hours. Samples were treated with insulin (100 nM) for 15 minutes and collected in lysis buffer. A total of 2 mg of protein lysate per condition were reduced with 9 mM dithiothreitol at 37°C for 30 minutes and, after cooling for 5 minutes, alkylated with 17 mM iodoacetamide at room temperature for 30 minutes in the dark. Nucleic acids were digested for 2 hours at 37°C with benzonase in the presence of 2mM MgCl₂. The protein digestion was performed on-bead using the protein aggregation capture method to clean the samples from detergents and reagents. Proteins bound to SeraMag beads (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, United States) were digested with Lys-C/Trypsin (Promega), in 50mM triethylammoniumbicarbonate (TEAB) overnight at 37°C.

Peptide labeling, fractionation, and LC-MS/MS

Protein digests were acidified with trifluoroacetic acid (TFA) and cleaned from reagents with an Oasis HLB extraction plate (Waters UK) following the manufacturer's instructions. The recovered peptides were lyophilized and subjected to phosphopeptides enrichment using the MagReSyn[®] TiO₂ beads (ReSyn Biosciences, Edenvale, Gauteng, South Africa). All steps of the enrichment were performed according to the manufacturer's instructions. The enriched phosphopeptides were desalted with C18 ZipTip pipette tips (Millipore, Billerica, MA). Eluates were dried down in a vacuum centrifuge and reconstituted through agitation for 15 minutes in 25 µL of 100 mM Triethylammonium bicarbonate (TEAB). Isobaric labeling of the protein digests was performed using the 6-plex tandem mass tag (TMT) reagents following the manufacturer's instructions

(ThermoFisher Scientific). TMT labeled samples were pooled, acidified with TFA, cleaned with HLB (Waters Oasis HLB 96-well Elution Plate) following the manufacturer's instructions. Samples were evaporated to dryness and resuspended by agitation for 15 minutes in 20 μ L of 1% ACN-1% FA. Then, 5 μ L was loaded into a 75 μ m i.d. \times 150 mm Self-Pack C18 column installed in the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems). The buffers used for chromatography were 0.2% formic acid in water (buffer A) and 0.2% formic acid in acetonitrile (buffer B). Peptides were eluted with a three-slope gradient at a flowrate of 250 nL/min. Solvent B first increased from 2 to 27% in 140 min, then from 27 to 36% B in 40 minutes and finally from 36 to 89% B in 10 minutes. The HPLC system was coupled to Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Scientific) through a Nanospray Flex Ion Source. Nanospray and S-lens voltages were set to 1.3-1.8 kV and 60 V, respectively. Capillary temperature was set to 250 $^{\circ}$ C. Full scan MS survey spectra (m/z 360-1500) in profile mode were acquired in the Orbitrap at a resolution of 120,000 with a target value at $4e5$. The 20 most intense peptide ions were fragmented in the HCD collision cell and analyzed in the Orbitrap at a resolution of 60,000 with a target value at $5e4$ and a normalized collision energy at 38. A MS3 scanning was performed in the Orbitrap at a resolution of 30,000 upon detection of a neutral loss of phosphoric acid (48.99, 32.66 or 24.5 Th) in MS2 scans. Target ions selected for fragmentation were dynamically excluded for 10 sec.

MS data analyses

Raw data of TiO₂ phospho-enriched samples acquired by both neutral lost approach (NL1 and NL2) was analyzed with MaxQuant (version 2.0.1.0) by searching against Uniprot's mouse proteome database of sequences (August 2021 release) supplemented with MaxQuant's contaminants and reverse decoy sequences. All searches were performed using a 15-ppm precursor ion tolerance and a 0.5 Da fragment ion tolerance, while oxidation of methionine and phosphorylation of serine, threonine and tyrosine were set as variable modifications, whereas cysteine carbamidomethylation was set as fixed modification. A maximum of 5 modifications per peptide was allowed. Trypsin was selected as protease allowing up to two missed cleavages, and peptides were limited to a maximum of 4600 Da with minimum and maximum lengths of 8 and 25 amino acids respectively. PSMs were adjusted to a 1% false discovery rate (FDR), and a minimum of two peptides with at least one unique peptide was required. Match between runs

was enabled with a match time window of one minute and an alignment time window of 20 minutes. The type of analysis was set to reporter ion MS2, and reporter ion intensities were adjusted to correct for isotopic impurities of the different TMT 6-plex reagents according to the manufacturer's specifications.

Both neutral loss (NL) MaxQuant phosphopeptides datasets were analyzed separately in R (r-project.org). After removing "Reverse", "Potential Contaminants," and phosphopeptides showing a localization probability of less than 0.75, we applied a modified version of the internal reference scaling (IRS) procedure (74). First, sample loading and labeling reaction efficiency differences were corrected within each TMT 6-plex experiment. The total MS2 reporter ion intensity for each channel was multiplied by global scaling factors to adjust its total intensity to the average total intensity across the 6 channels. To correct the unavoidable between-run technical variations caused by the stochastic selection of peptide ions during MS data acquisition, we calculated, for each phosphopeptide, three reference values by summing intensities of MS2 reporter ions among the six channels of each of the three TMT experiments. The three reference values were then averaged by geometric mean, and we estimated scaling factors for each phosphopeptide to adjust its reference value to the geometric mean value. Statistical contrasts were performed with the exactTest function after we estimated the dispersion from the EdgeR package (75).

Bioinformatic analysis

We considered as modulated phosphosites those showing a normalized Log2 (≤ -0.5 or ≥ 0.5) between two given conditions and $p < 0.05$. Heatmap was drawn using Morpheus Broad Institute software. Reactome pathway analyses were performed to functionally annotate genes from proteins modulated in the phosphoproteome, using *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)* with an FDR threshold of 0.05. Graphical network representations of protein-protein interaction were performed with the STRING app (11.5) in Cytoscape (3.9.1).

F4/80 Immunostaining

Epididymal adipose tissue were fixed in 10% formalin overnight at 4°C. After paraffin embedding, 5 μ m thick sections were rehydrated as follows: 3 washes with xylene for 5 minutes each, 2 washes with 100% ethanol for 10 minutes each, 2 washes with 95% ethanol for 10 minutes each,

followed by 2 washes with water for 5 minutes each. Then, antigen retrieval was performed with 10 mM citrate buffer, pH 6.0 at 95°C for 10 minutes and cooled for 30 minutes at room temperature. Following 3 water washes of 5 minutes each, sections were incubated with 3% H₂O₂ for 10 min and blocked with goat serum (Vectastain kit) in TBST for 1 hour at room temperature. Slides were incubated with rabbit anti-mouse F4/80 antibody (**Supplemental Table 2**) overnight at 4°C in a humid chamber. Rabbit anti-F4/80 antibody detection was performed with Vectastain ABC-HRP Kit, Peroxidase (Rabbit IgG) (Vector Laboratories, #PK-4001). The next day, sections were washed with TBST and covered with diluted biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody solution (Vectastain kit) for 30 minutes at room temperature. Slides were incubated in Avidin-HRP (ABC complex (Vectastain kit) for 30 minutes at room temperature, and then stained with NovaRED substrate (Vector NovaRED Peroxydase Substrate Kit, Vector Laboratories, #SK-4800) until desired staining was obtained (15 minutes). Afterward, sections were washed with water to stop Vector NovaRED substrate reaction, and counterstained with hematoxylin. Slides were dehydrated and mounted with DPX Mount. For each individual mouse adipose section, fields were acquired at 20x objective using Leica DM4000B microscope and Osteomeasure software.

Quantification of GLUT4myc translocation

Optical detection of GLUT4 translocation at the cell surface was performed using L6 myoblast cell line expressing stably a rat GLUT4 with a human myc-epitope (L6-GLUT4myc). Briefly, cells were treated with either GAS6 or vehicle with or without insulin stimulation and colorimetric determination of GLUT4 translocation at the cell surface was detected as previously reported (76). The optical absorbance was measured at 492 nm using a microplate reader.

RNA sequencing

Gastrocnemius of *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice were homogenized in 1 mL of Trizol on ice. After centrifugation, 0.2 mL of chloroform is added to clear supernatant. Following agitation and new centrifugation, the aqueous phase was collected. Elimination of DNA and RNA purification were performed using Zymo-Spin IIICG columns according to the manufacturer's instructions (ZymoResearch, Irvin, CA). RNA libraries were prepared from 1000ng of total RNA. Poly(A)+

transcripts were enriched using the NEBNext[®] Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) and libraries were prepared with RNA Hyperprep Kit (KAPA). Libraries size distribution was assessed on a 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies) and libraries were quantified by qPCR. Equimolar libraries were sequenced in paired-end reads (PE50) on a Novaseq 6000 system (Illumina) with a SP flowcell and an average coverage of 50M fragments per library. The quality of the raw reads was assessed with FASTQC v0.11.8. After examining the quality of the raw reads, no trimming was deemed necessary. The reads were aligned to the GRCm38 genome with STAR v2.7.6a with more than 82% of reads uniquely mapped. Raw counts were computed using FeatureCounts v1.6.0 based on Ensembl mouse reference genome v101. Differential expression was performed using DESeq2 R package and 18 differentially expressed genes (DEGs) were obtained using p-adjusted <0.05. DEGs heatmap was drawn based on z-score using Morpheus Broad Institute software.

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Results are shown as the mean \pm SEM. For single measurements, an unpaired, 2-tailed Student's *t* test was used, while 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post test was used for comparison of more than 2 groups. For repeated measurements, a repeated-measures 2-way ANOVA followed by Bonferroni's post test was used. In all analysis, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Study approval

All animal use complied with the guidelines of the Canadian Committee for Animal Protection and was approved by the IRCM Animal Care Committee.

REFERENCES

1. DeFronzo RA, and Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S157-63.
2. Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG, et al. Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(4):983-7.
3. Myers MG, Jr., Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, et al. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10350-4.
4. Haeusler RA, McGraw TE, and Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):31-44.
5. Boucher J, Kleinridders A, and Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
6. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 2000;105(3):311-20.
7. Krook A, Bjornholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG, Jr., et al. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000;49(2):284-92.
8. Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou JP, et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(6):1319-25.
9. Schneider C, King RM, and Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*. 1988;54(6):787-93.
10. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, and Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol*. 1993;13(8):4976-85.
11. Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature*. 1995;373(6515):623-6.
12. Gely-Pernot A, Coronas V, Harnois T, Prestoz L, Mandairon N, Didier A, et al. An endogenous vitamin K-dependent mechanism regulates cell proliferation in the brain subventricular stem cell niche. *Stem cells*. 2012;30(4):719-31.
13. Hasanbasic I, Rajotte I, and Blostein M. The role of gamma-carboxylation in the anti-apoptotic function of gas6. *J Thromb Haemost*. 2005;3(12):2790-7.
14. Rajotte I, Hasanbasic I, and Blostein M. Gas6-mediated signaling is dependent on the engagement of its gamma-carboxyglutamic acid domain with phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(1):70-3.
15. Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, and Lemke G. Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2942-53.

16. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 2001;7(2):215-21.
17. Lew ED, Oh J, Burrola PG, Lax I, Zagorska A, Traves PG, et al. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife*. 2014;3.
18. Tsou WI, Nguyen KQ, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25750-63.
19. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):723-8.
20. Lemke G, and Burstyn-Cohen T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1209:23-9.
21. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, and Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007;131(6):1124-36.
22. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest*. 2005;115(2):237-46.
23. Abu-Thuraia A, Goyette MA, Boulais J, Delliaux C, Apcher C, Schott C, et al. *Nat Commun*. 2020:3586.
24. Wu G, Ma Z, Cheng Y, Hu W, Deng C, Jiang S, et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2018;17(1):20.
25. Asiedu MK, Beauchamp-Perez FD, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, and Knutson KL. AXL induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2014;33(10):1316-24.
26. Goyette MA, Duhamel S, Aubert L, Pelletier A, Savage P, Thibault MP, et al. The Receptor Tyrosine Kinase AXL Is Required at Multiple Steps of the Metastatic Cascade during HER2-Positive Breast Cancer Progression. *Cell Rep*. 2018;23(5):1476-90.
27. Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(3):1124-9.
28. Pacez JD, Vasques GJ, Correa RG, Vasconcellos JF, Duncan K, Gu X, et al. The receptor tyrosine kinase Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target. *Oncogene*. 2013;32(6):689-98.
29. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Traves PG, Burrola PG, Hash JC, and Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron*. 2012;76(6):1123-32.
30. Kuo FC, Hung YJ, Shieh YS, Hsieh CH, Hsiao FC, and Lee CH. The levels of plasma growth arrest-specific protein 6 is associated with insulin sensitivity and inflammation in women. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;103(2):304-9.
31. Hung YJ, Lee CH, Chu NF, and Shieh YS. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1840-4.
32. Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Shieh YS, Hsieh CH, et al. Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin

- resistance among overweight and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E267-74.
33. Lee CH, Chu NF, Shieh YS, and Hung YJ. The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;95(2):201-6.
 34. Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Chen YD, Shieh YS, et al. Effect of GAS6 and AXL Gene Polymorphisms on Adiposity, Systemic Inflammation, and Insulin Resistance in Adolescents. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:674069.
 35. Wheeler E, Leong A, Liu CT, Hivert MF, Strawbridge RJ, Podmore C, et al. Impact of common genetic determinants of Hemoglobin A1c on type 2 diabetes risk and diagnosis in ancestrally diverse populations: A transethnic genome-wide meta-analysis. *PLoS Med.* 2017;14(9):e1002383.
 36. Nag A, Dhindsa RS, Mitchell J, Vasavda C, Harper AR, Vitsios D, et al. Human genetics uncovers MAP3K15 as an obesity-independent therapeutic target for diabetes. *Sci Adv.* 2022;8(46):eadd5430.
 37. Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, Ayala JE, Fueger PT, Willis SE, et al. Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes.* 2008;57(7):1790-9.
 38. Kim DH, Gutierrez-Aguilar R, Kim HJ, Woods SC, and Seeley RJ. Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared with diet-resistant FVB mice. *Int J Obes (Lond).* 2013;37(6):853-60.
 39. Murshed M, Schinke T, McKee MD, and Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol.* 2004;165(5):625-30.
 40. Ferron M, Lacombe J, Germain A, Oury F, and Karsenty G. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions. *J Cell Biol.* 2015;208(6):761-76.
 41. Allan CM, Taylor S, and Taylor JM. Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J Biol Chem.* 1997;272(46):29113-9.
 42. Lacombe J, Rishavy MA, Berkner KL, and Ferron M. VKOR paralog VKORC1L1 supports vitamin K-dependent protein carboxylation in vivo. *JCI Insight.* 2018;3(1).
 43. Denis M, Marcinkiewicz J, Zaid A, Gauthier D, Poirier S, Lazure C, et al. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2012;125(7):894-901.
 44. Alquier T, and Poitout V. Considerations and guidelines for mouse metabolic phenotyping in diabetes research. *Diabetologia.* 2018;61(3):526-38.
 45. Thiebaud D, Jacot E, DeFronzo RA, Maeder E, Jequier E, and Felber JP. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. *Diabetes.* 1982;31(11):957-63.
 46. Mangnall D, Bruce C, and Fraser RB. Insulin-stimulated glucose uptake in C2C12 myoblasts. *Biochem Soc Trans.* 1993;21(4):438S.
 47. Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, and Lauffenburger DA. The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Sci Signal.* 2013;6(287):ra66.

48. Axelrod H, and Pienta KJ. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget*. 2014;5(19):8818-52.
49. Roux KJ, Kim DI, Raida M, and Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2012;196(6):801-10.
50. Navarrete-Perea J, Yu Q, Gygi SP, and Paulo JA. Streamlined Tandem Mass Tag (SL-TMT) Protocol: An Efficient Strategy for Quantitative (Phospho)proteome Profiling Using Tandem Mass Tag-Synchronous Precursor Selection-MS3. *J Proteome Res*. 2018;17(6):2226-36.
51. Batista TM, Jayavelu AK, Wewer Albrechtsen NJ, Iovino S, Lebastchi J, Pan H, et al. A Cell-Autonomous Signature of Dysregulated Protein Phosphorylation Underlies Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2020;32(5):844-59 e5.
52. Haider N, Lebastchi J, Jayavelu AK, Batista TM, Pan H, Dreyfuss JM, et al. Signaling defects associated with insulin resistance in nondiabetic and diabetic individuals and modification by sex. *J Clin Invest*. 2021;131(21).
53. Goh LK, and Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a017459.
54. Wandinger-Ness A, and Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(11):a022616.
55. Hanafusa H, Yagi T, Ikeda H, Hisamoto N, Nishioka T, Kaibuchi K, et al. LRRK1 phosphorylation of Rab7 at S72 links trafficking of EGFR-containing endosomes to its effector RILP. *J Cell Sci*. 2019;132(11).
56. Wharton J, Meshulam T, Vallega G, and Pilch P. Dissociation of insulin receptor expression and signaling from caveolin-1 expression. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13483-6.
57. Zdzalik-Bielecka D, Poswiata A, Kozik K, Jastrzebski K, Schink KO, Brewinska-Olchowik M, et al. The GAS6-AXL signaling pathway triggers actin remodeling that drives membrane ruffling, macropinocytosis, and cancer-cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(28).
58. Maquoi E, Voros G, Carmeliet P, Collen D, and Lijnen HR. Role of Gas-6 in adipogenesis and nutritionally induced adipose tissue development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):1002-7.
59. Lijnen HR, Christiaens V, and Scroyen L. Growth arrest-specific protein 6 receptor antagonism impairs adipocyte differentiation and adipose tissue development in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;337(2):457-64.
60. Scroyen I, Frederix L, and Lijnen HR. Axl deficiency does not affect adipogenesis or adipose tissue development. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(6):1168-73.
61. Haase TN, Rasmussen M, Jaksch CA, Gaarn LW, Petersen CK, Billestrup N, et al. Growth arrest specific protein (GAS) 6: a role in the regulation of proliferation and functional capacity of the perinatal rat beta cell. *Diabetologia*. 2013;56(4):763-73.
62. Rezanian A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1121-33.
63. Adam-Artigues A, Arenas EJ, Martinez-Sabadell A, Braso-Maristany F, Cervera R, Tormo E, et al. Targeting HER2-AXL heterodimerization to overcome resistance to HER2 blockade in breast cancer. *Sci Adv*. 2022;8(20):eabk2746.

64. Ruan GX, and Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J.* 2012;31(7):1692-703.
65. Salian-Mehta S, Xu M, and Wierman ME. AXL and MET crosstalk to promote gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal cell migration and survival. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;374(1-2):92-100.
66. Abu-Thuraia A, Goyette MA, Boulais J, Delliaux C, Apcher C, Schott C, et al. AXL confers cell migration and invasion by hijacking a PEA3-regulated focal adhesion protein network. *Nat Commun.* 2020;11(1):3586.
67. Csukasi F, Duran I, Barad M, Barta T, Gudernova I, Trantirek L, et al. The PTH/PTHrP-SIK3 pathway affects skeletogenesis through altered mTOR signaling. *Sci Transl Med.* 2018;10(459).
68. Kim J, Kundu M, Viollet B, and Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011;13(2):132-41.
69. Li H, Yang F, Liu C, Xiao P, Xu Y, Liang Z, et al. Crystal Structure and Substrate Specificity of PTPN12. *Cell Rep.* 2016;15(6):1345-58.
70. Choi E, Kikuchi S, Gao H, Brodzik K, Nassour I, Yopp A, et al. Mitotic regulators and the SHP2-MAPK pathway promote IR endocytosis and feedback regulation of insulin signaling. *Nat Commun.* 2019;10(1):1473.
71. Soll AH, Kahn CR, and Neville DM, Jr. Insulin binding to liver plasma membranes in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse. Demonstration of a decreased number of functionally normal receptors. *J Biol Chem.* 1975;250(12):4702-7.
72. Hall C, Yu H, and Choi E. Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Exp Mol Med.* 2020;52(6):911-20.
73. Chomczynski P, and Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
74. Plubell DL, Wilmarth PA, Zhao Y, Fenton AM, Minnier J, Reddy AP, et al. Extended Multiplexing of Tandem Mass Tags (TMT) Labeling Reveals Age and High Fat Diet Specific Proteome Changes in Mouse Epididymal Adipose Tissue. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16(5):873-90.
75. Chen Y, Lun AT, and Smyth GK. From reads to genes to pathways: differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline. *F1000Res.* 2016;5:1438.
76. Ishikura S, Antonescu CN, and Klip A. Documenting GLUT4 exocytosis and endocytosis in muscle cell monolayers. *Curr Protoc Cell Biol.* 2010;Chapter 15:Unit 15

SUPPLEMENTALS

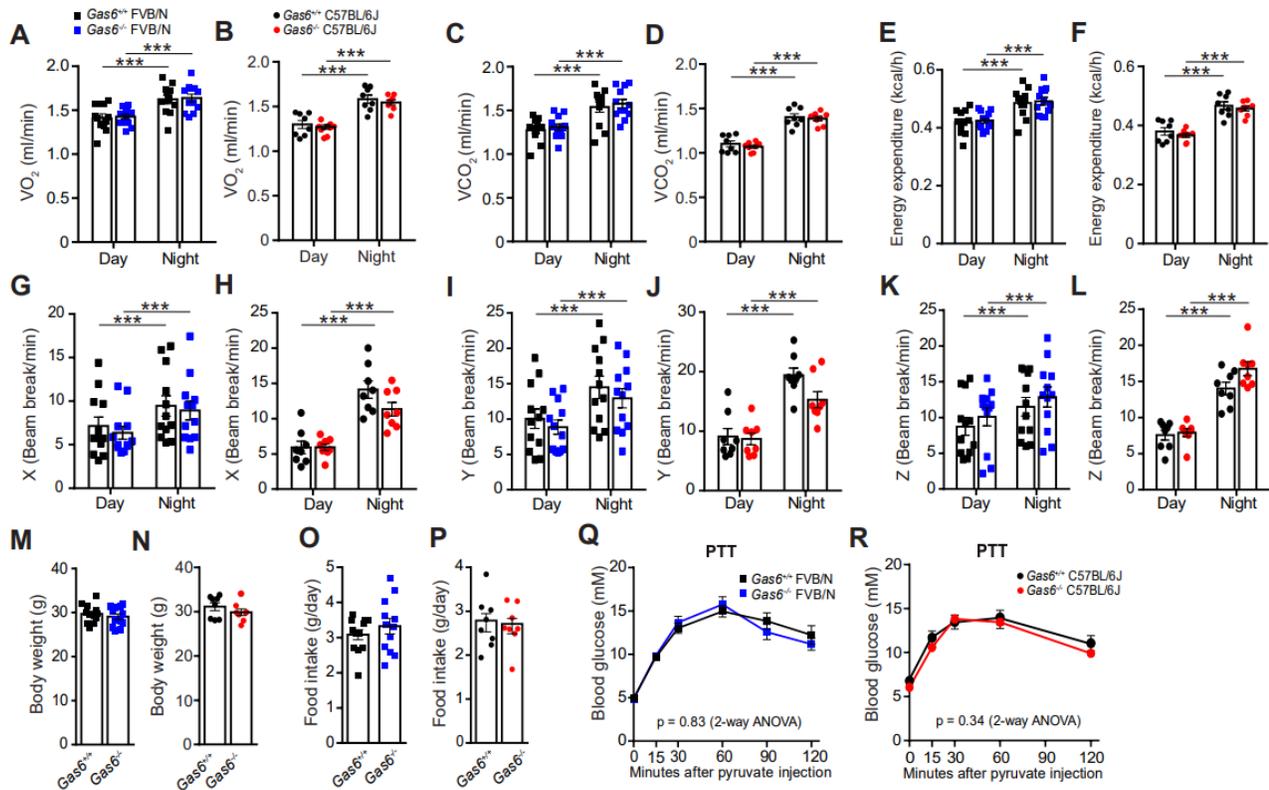


Figure S1. GAS6 deficiency does not affect energy expenditure, food intake or gluconeogenesis.

Supplemental metabolic parameters of 3-months old *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} FVB/N (blue) and C57BL/6J (red) male mice (n=8-12). **(A-B)** O_2 consumption, **(C-D)** CO_2 release, **(E-F)** energy expenditure, and activity on the **(G-H)** x axis, **(I-J)** y axis and **(K-L)** z axis. **(M-N)** Body weight and **(O-P)** Food intake. **(Q-R)** Pyruvate tolerance tests (PTT) results for *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice fasted 16h and i.p. with 2g/kg of pyruvate (n=8-17). Results represent the mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, by 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post test **(A-L)**, by unpaired, 2-tailed Student's *t* test **(M-P)** or by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiple comparisons test **(Q-R)**.

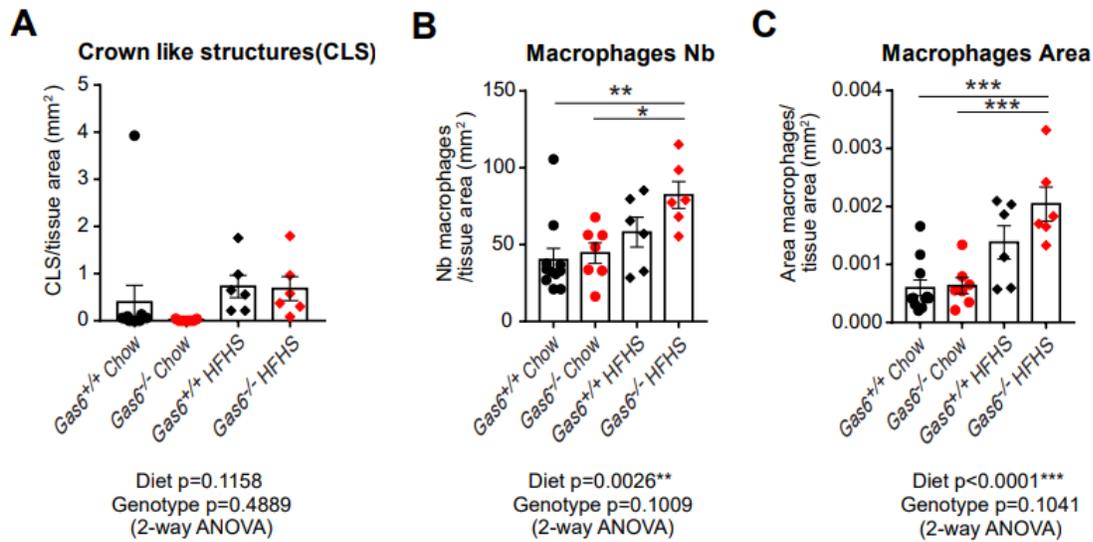


Figure S2. GAS6 deficiency does not protect against inflammation induced by High-Fat/High-Sucrose diet.

Quantification of macrophage infiltration in epididymal white adipose tissue by immunohistochemical staining for F4/80. **(A)** Counting of crown-like structures (CLS) of *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice (n=6-11) fed with chow diet (Chow) or a High-Fat/High-Sucrose diet (HFHS). **(B)** Quantification of macrophage numbers in eWAT. **(C)** Quantification of total area of anti-F4/80 positive signal. Results are the average of 5 sections per mouse and are normalized over tissue area (mm²). Results represent mean ± SEM, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiple comparisons test.

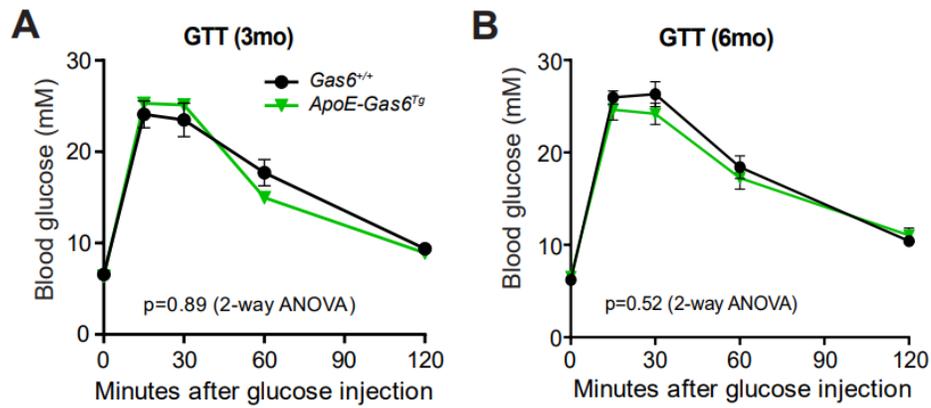


Figure S3. No change in glucose tolerance in transgenic ApoE-Gas6Tg mice

(A-B) Glucose Tolerance Test (GTT) was performed in *Gas6*^{+/+} and *ApoE-Gas6*^{Tg} mice that were subjected to a 16h-fast and injected i.p. with 2g/kg of glucose at 3 and 6 months of age (n=11-19). Results represent mean ± SEM, **P* < 0.05, by 2-way ANOVA for repeated measurements with Bonferroni's multiple comparisons test.

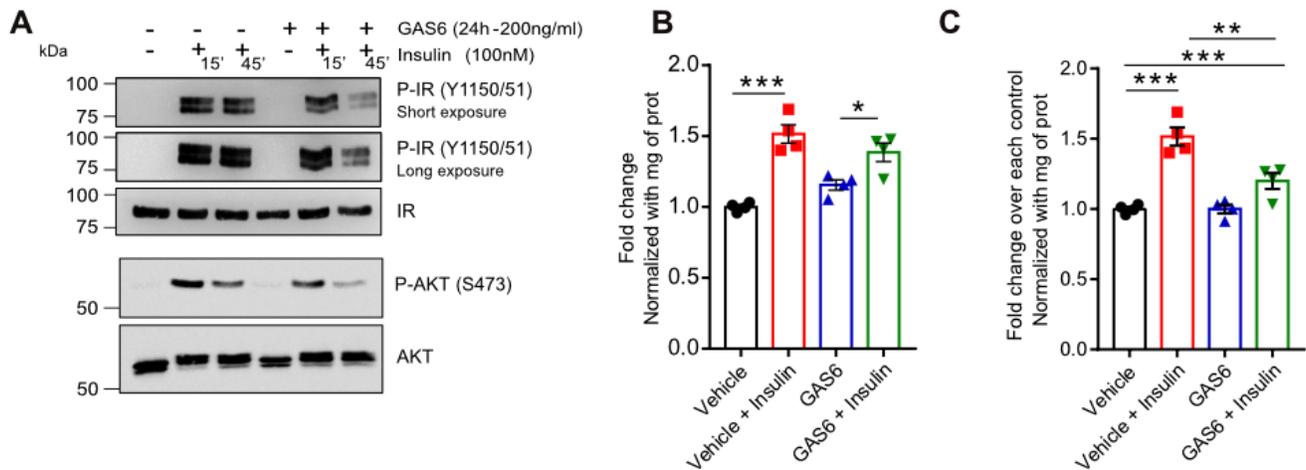


Figure S4. GAS6 affects insulin signaling and GLUT4 translocation in muscle cells.

(A) Insulin signaling pathway activation in L6-GLUT4myc cells treated with GAS6 (200 ng/ml) for 24h followed by insulin stimulation (100 nM) for 15 or 45 minutes. Phosphorylation of IR (Y1150/1151) and AKT (S473) assessed by Western blot analysis. Total IR and total AKT were used as loading controls. **(B-C)** Surface GLUT4 levels in L6-GLUT4myc myoblasts treated for 24h GAS6 (200ng/ml) and measured in response to stimulatory insulin (100 nM-15min). Colorimetric assay was quantified using the antibody myc-tagged GLUT4. For **(B)** fold change is relative to untreated control cells (Vehicle). For **(C)**, fold change of insulin response is relative to each corresponding control (Vehicle vs Vehicle + Insulin and GAS6 vs GAS6+ Insulin). Results represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, by 1-way ANOVA followed by Bonferroni's post test.

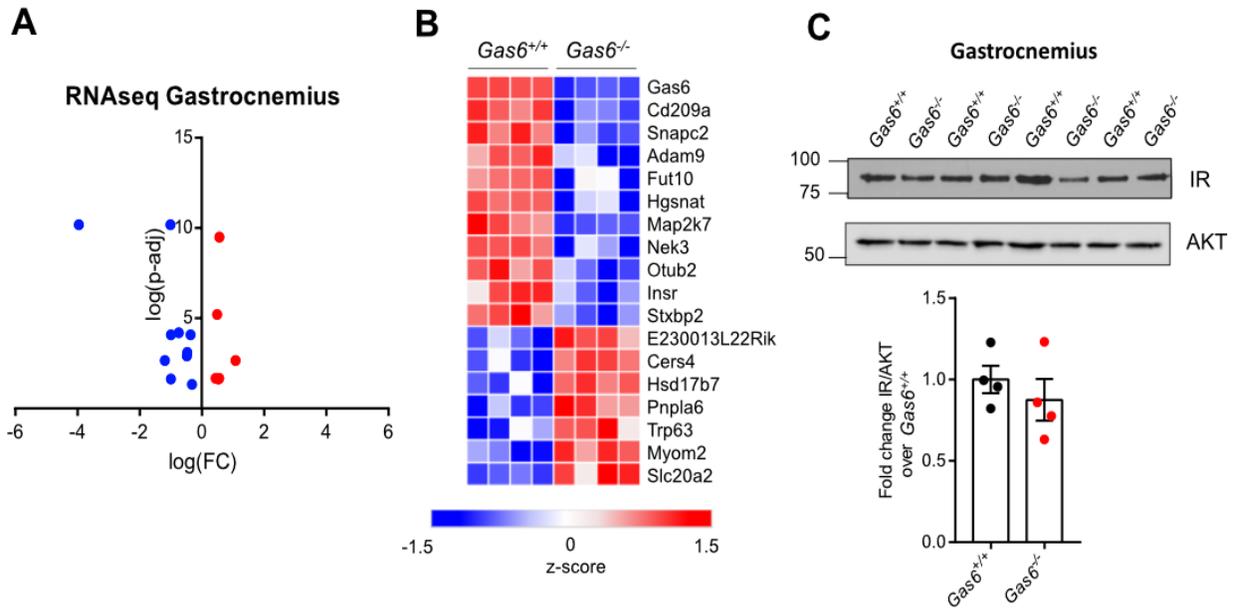


Figure S5. Transcriptional changes and Insulin Receptor protein level in skeletal muscle of GAS6-deficient mice.

(A) Volcano plot for the 18 significant differentially expressed genes (DEGs) in RNA sequencing performed on skeletal muscle (gastrocnemius) of *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice (n=4). **(B)** Heatmap representation of RNA-Seq expression z-scores for DEG (p-adj < 0.05). The blue and red dots represent the significantly downregulated and upregulated genes respectively. **(C)** Insulin Receptor protein levels in gastrocnemius of *Gas6*^{+/+} and *Gas6*^{-/-} mice assessed by Western blot analysis and quantification. Total AKT was used as loading control. Quantification analysis of Western blot represent mean ± SEM, p-value was assessed by unpaired, 2-tailed Student's *t* test.

Supplemental Table 1

Gene	Primers	Sequence 5'-3'	Purpose
<i>Axl</i>	Foward	ATAGGGCTAACTCGAGAGG	qPCR
<i>Axl</i>	Reverse	GGCTCTAGGGGCACAGGAAG	qPCR
<i>Gas6</i>	Foward	GATACGGCCTCGTACAAGCA	qPCR
<i>Gas6</i>	Reverse	CTCCAGTGTTCAGGACCAT	qPCR
<i>Mertk</i>	Foward	CAGTTGCTAGAGAGCTGCGA	qPCR
<i>Mertk</i>	Reverse	GGTGTGACTGCAGCAAAAGG	qPCR
<i>Tyro3</i>	Foward	TGTCTGCGAATGGAAGTGA	qPCR
<i>Tyro3</i>	Reverse	TGCCCTGGTGACTCGGATAG	qPCR
<i>S16</i>	Foward	AGGAGCGATTTGCTGGTGTGG	qPCR
<i>S16</i>	Reverse	GCTACCAGGGCCTTTGAGA	qPCR
<i>Gas6</i>	Sens	GAGTGCCGTGATTCTGGTC	Genotyping <i>Gas6</i> ^{-/-}
<i>Gas6</i>	Sens	ATCTCTCGTGGGATCATT	Genotyping <i>Gas6</i> ^{-/-}
<i>Gas6</i>	Antisens	CCACTAAGGAAACAATAACTG	Genotyping <i>Gas6</i> ^{-/-}
<i>ApoE promotor</i>	Foward	AAGGCTAACCTGGGGTGAGG	Genotyping <i>ApoE-Gas6Tg</i>
<i>Gas6</i>	Reverse	AAGTTCTGAACACATTTGGCGA	Genotyping <i>ApoE-Gas6Tg</i>
<i>IL-2</i>	Foward	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	Genotyping <i>ApoE-Gas6Tg</i>
<i>IL-2</i>	Reverse	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	Genotyping <i>ApoE-Gas6Tg</i>
<i>Insulin Receptor</i>	Foward	TTAAAAGCTTGCTCTGATCCGAGGAGACCC	Cloning
<i>Insulin Receptor</i>	Reverse	ATTGTCGACGGAAGGATTGGACCGAGG	Cloning
HA-tag	Foward	P- TCGACTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAAG	Cloning
HA-tag	Reverse	P- AATTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAG	Cloning
<i>Gas6</i>	Foward	ATTACAAGCTTGCCACCATGCCGCCACCG	Cloning
<i>Gas6</i>	Reverse	TTAATCTAGAGGGGTGGCATGCTCCACAGG	Cloning

Supplemental Table 2

Name of Antibody	Company	Catalog #	Purpose	Dilution
Gamma-carboxyglutamyl (Gla) residues	Sekisui Diagnostics	3570	Western Blot	1/500
Myc-Tag (9B11)	Cell Signaling	2276	Western Blot	1/1000
p-AXL (Y702)	Gene Script	-	Western Blot	1/1000
Axl Antibody (C-20)	SantaCruz	sc-1096	Western Blot	1/500
P-AKT (Ser473)	Cell Signaling	9271	Western Blot	1/1000
AKT (pan) (C67E7)	Cell Signaling	4691	Western Blot	1/1000
P-IGF-IR β (Tyr1135/1136)/Insulin Receptor β (Tyr1150/1151)	Cell Signaling	3024	Western Blot	1/1000
Insulin Receptor β (L55B10)	Cell Signaling	3020	Western Blot	1/1000
HA-Tag (C29F4)	Cell Signaling	3724	Western Blot	1/1000
DYKDDDDK Tag (D6W5B) / Flag	Cell Signaling	14793	Western Blot	1/1000
Anti-Mouse HRP	Jackson ImmunoResearch	115-035-174	Western Blot	1/5000
Anti-Rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch	211-032-171	Western Blot	1/5000
Monoclonal Anti-Flag [®] M2	Sigma	F1804	Immunofluorescence	1/2000
Insulin Receptor β (E9L5V)	Cell Signaling	23413	Immunofluorescence	1/100
Alexa Fluor 488-AffiniPure Donkey Anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch	711-545-152	Immunofluorescence	1/1000
Cy3-Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	715-165-150	Immunofluorescence	1/500
Alexa Fluor 633 Goat Anti-mouse IgG	Invitrogen	A21050	Immunofluorescence	1/500
F4/80	Cell Signaling	70076	Immunohistochemistry	1/500

CHAPITRE 4

GAS6 FAVORISE LE METABOLISME LACTIQUE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES

RÉSUMÉ

Introduction : GAS6 est une protéine γ -carboxylée, dépendante de la vitamine K. Cette protéine circulante module plusieurs processus biologiques comme la prolifération et la survie cellulaires. Ces fonctions sont médiées par son interaction et l'activation de ses récepteurs tyrosine kinase TYRO3, AXL et MERTK (TAM). Néanmoins, le rôle de GAS6 est peu caractérisé dans le muscle squelettique. Récemment, notre groupe de recherche a pu mettre en évidence que GAS6 diminue la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires.

Méthodes et Résultats : Dans un premier temps, nous avons établi une stratégie comparative du protéome de cellules musculaires mises en culture en présence ou non de GAS6 pendant 24h. De façon intéressante, GAS6 augmente les niveaux protéiques de la majorité des enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse. De plus, par utilisation d'analyseur de flux extracellulaire (Seahorse), nous avons mis en évidence qu'un traitement long de GAS6 augmente la capacité glycolytique des cellules musculaires. Cet effet est abrogé par l'inhibition pharmacologique des récepteurs TAM. Ces changements conduisent à l'élévation des niveaux de lactate sécrété par les cellules traitées par GAS6. D'autre part, le traitement prolongé de lactate sur les cellules musculaires conduit à l'inhibition de l'activation du RI par l'insuline.

Conclusion : Ces résultats révèlent un remodelage par GAS6 et ses récepteurs du profil métabolique et surtout glycolytique pouvant expliquer un nouveau mécanisme par lequel GAS6 affecte la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires.

INTRODUCTION

Notre organisme est composé de plus de 600 muscles squelettiques représentant 40% de la masse totale de notre corps. En plus d'être indispensable au bon déroulement des fonctions vitales comme la motricité, la thermogénèse ou la respiration, le muscle squelettique est un régulateur essentiel de l'homéostasie glucidique. Le muscle squelettique est le principal organe responsable de l'absorption du glucose en réponse à l'insuline et l'insulino-résistance musculaire représente un facteur central dans l'apparition de troubles métaboliques comme le syndrome métabolique ou le diabète de type 2 (221, 222) .

Par l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés, notre laboratoire de recherche a démontré le nouveau rôle de la protéine sécrétée GAS6 comme facteur contributif dans le développement de la résistance à l'insuline globale. Nous avons montré *in vitro* que GAS6 se fixe et active son récepteur à activité tyrosine kinase AXL au niveau des cellules musculaires C2C12. De même, nous avons aussi démontré qu'une exposition longue de GAS6 (24h) sur ces cellules était responsable d'une diminution de l'activation du récepteur de l'insuline et de son messenger AKT en réponse à l'insuline. Par des analyses phospho-protéomiques, nous avons établi que ce traitement chronique de GAS6 perturbe les voies de signalisation induites par l'insuline au niveau des cellules musculaires (223).

Nous avons voulu poursuivre ici nos investigations en étudiant la conséquence d'une exposition longue de GAS6 seul sur le métabolisme des cellules musculaires en culture. Pour ce faire, nous avons utilisé une stratégie couplant le marquage par tag de masse en tandem (TMT) et la spectrométrie de masse par chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS) afin de comparer le protéome total de cellules musculaires C2C12 traitées ou non pendant 24h avec GAS6. Nous rapportons ici que GAS6 affecte les niveaux des enzymes impliquées dans la glycolyse et modifie le métabolisme glycolytique des cellules musculaires.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Les cellules de la lignée C2C12 (ATCC) ont été cultivées en myoblastes avec du milieu DMEM, supplémenté de 10 % de sérum bovin fœtal (FBS) et de pénicilline/streptomycine (P/S). Les cellules ont été cultivées à 37°C, avec 5% de CO₂.

Protéome total

Traitement cellulaire et digestion des protéines

Les cellules C2C12 ont été incubées dans un milieu sans sérum complémenté avec 10 mM d'HEPES pH 4 et 0,1% de BSA, pendant 24 heures avec ou sans GAS6 recombinant (200 ng/ml). Pour chaque condition, des triplicats biologiques ont été réalisés. Après lavage au PBS, les cellules ont été lysées et un total de 20 µg de protéines par échantillon a été réduit avec 9 mM de dithiothréitol à 37°C pendant 30 minutes. Après 5 minutes de refroidissement, une étape d'alkylation a été réalisée avec de l'iodoacétamide 17 mM à température ambiante pendant 30 minutes dans l'obscurité. Les acides nucléiques ont été digérés pendant 2 heures à 37°C avec de la benzonase en présence de 2 mM de MgCl₂. La digestion des protéines a été effectuée sur billes en utilisant la méthode de capture par agrégation de protéines pour nettoyer les échantillons des détergents et des réactifs. Les protéines liées aux billes SeraMag (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, États-Unis) ont été digérées avec de la Lys-C/Trypsine (Promega), dans du bicarbonate de triéthylammonium 50 mM (TEAB) pendant une nuit à 37 °C.

Marquage TMT

Après digestion, 20µg de chaque échantillon ont été nettoyés par HLB (*Hydrophilic-Lipophilic Balance* (Waters Oasis HLB 96-well Elution Plate) en suivant les instructions du fabricant. Le marquage isobare des digestions protéiques a été effectué à l'aide des réactifs 6-plex tandem mass tag TMT (ThermoFisher Scientific). Les échantillons marqués au TMT ont été regroupés, acidifiés avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) et fractionnés en 10 fractions à l'aide du kit de fractionnement de peptides (Pierce) en phase inverse à pH élevé. Chaque fraction a été évaporée à sec et remise en suspension sous agitation pendant 15 minutes dans 12µL de 2% ACN-1% FA.

Environ 3µg de chaque fraction ont été chargés dans un diamètre intérieur de 75 µm × Colonne Self-Pack C18 de 150mm installée dans le système Easy-nLC II (Proxeon Biosystems). Les tampons utilisés pour la chromatographie étaient : 0,2 % d'acide formique dans l'eau (tampon A) et 0,2 % d'acide formique dans l'acétonitrile (tampon B). Les peptides ont été élués avec un gradient à trois pentes à un débit de 250 nL/min. Le tampon B est passé de 2 à 27 % en 140 min, puis de 27 à 36 % en 40 minutes et enfin de 36 à 89 % en 10 minutes. Le système HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) a été couplé au spectromètre de masse Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) via une source d'ions Nanospray Flex. Les tensions Nanospray et S-lens ont été fixées à 1,3-1,8 kV et 60 V, respectivement. La température capillaire a été fixée à 250°C. Les spectres de relevé MS à balayage complet (m/z 360-1500) en mode profil ont été acquis dans l'Orbitrap à une résolution de 120 000 avec une valeur cible à 4e5. Les 20 ions peptidiques les plus intenses ont été fragmentés dans la cellule de collision HCD et analysés dans l'Orbitrap à une résolution de 60 000 avec une valeur cible à 5e4 et une énergie de collision normalisée à 38. Les ions cibles sélectionnés pour la fragmentation ont été dynamiquement exclus pendant 40 secondes.

Identification des protéines

Les recherches dans la base de données de protéines ont été lancées à l'aide du logiciel Proteome Discoverer de ThermoFisher Scientific (version 2.4) et ont été effectuées avec Mascot 2.6.2 (Matrix Science) par rapport à la base de données de protéines de souris UniProt (version 2019). Les tolérances de masse pour les ions précurseurs et fragments ont été fixées à 10 ppm et 0,05 Dalton, respectivement. La trypsine a été utilisée comme enzyme permettant jusqu'à 1 clivage manqué. Les marquages TMT sur les résidus N-terminaux/lysine du peptide et la carbamidométhylation de la cystéine ont été spécifiées comme modifications fixes, et l'oxydation de la méthionine comme modification variable.

Analyse Bio-informatique

Les valeurs de probabilités *P* ont été calculées à l'aide d'un test t bilatéral non apparié à deux échantillons avec Benjamini-Hochberg FDR à 5 %. L'analyse de l'enrichissement et de la voie KEGG a été réalisée à l'aide du logiciel *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), les voies significatives sont déterminées par le logiciel selon un test FDR=5%.

Analyseur de flux extracellulaire (Seahorse)

Les myoblastes C2C12 ont été ensemencés à raison de 20 000 cellules par puits dans des plaques XF à 24 puits. Après 23 heures de traitement avec du GAS6 recombinant (200 ng/ml) ou véhicule, dans du milieu DMEM sans sérum, les cellules ont été lavées au PBS puis incubées dans du milieu Seahorse XF DMEM (supplémenté avec 2 mM de glutamine) pendant 1 h à 37 °C dans un incubateur sans CO₂ en présence de GAS6. Le profilage de la capacité glycolytique est mesuré par ajout de composés stimulateurs de la glycolyse : glucose (10 mM), l'oligomycine (1 µM, Sigma) et de l'inhibiteur 2-Deoxy-D-Glucose (100 mM, Sigma). L'analyse du métabolisme énergétique des cellules C2C12 a été réalisée à l'aide de l'analyseur de flux extracellulaire Seahorse XF24 (Seahorse Bioscience/Agilent, Santa Clara, CA). Les niveaux de glycolyse des cellules sont évalués par la mesure des taux d'acidification extracellulaire (ECAR). Les mesures sont prises à intervalle de temps régulier de 3 minutes.

Mesure des taux de lactate extracellulaire

La concentration de lactate sécrété a été déterminée sur des cellules C2C12 ensemencées dans les mêmes conditions que l'analyse Seahorse. Les cellules C2C12 ont été cultivées pendant 23 heures en présence ou non de GAS6 recombinant (200 ng/ml) dans du milieu DMEM sans sérum. Les cellules ont été lavées au PBS puis incubées dans du milieu DMEM sans sérum et sans glucose pendant 1h, le glucose (10 mM) a été rajouté 30 minutes avant la récolte des surnageants. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un essai commercial de détection bioluminescent de lactate (Promega) conformément aux instructions du fabricant. La bioluminescence a été mesurée dans des microplaques (Perkin Elmer) avec un luminomètre (SpectraMax MiniMax 300). Les résultats ont été normalisés sur les quantités de protéines totales (Bradford).

Western blot

Les cellules C2C12 ont été incubées dans un milieu sans sérum avec 10 mM d'HEPES pH 4; 0,1% de BSA pendant 24 heures dans différentes conditions de traitement : lactate (0,4-50mM), GAS6 recombinant (200ng/ml) ou oxamate (1mM). Les échantillons ont été traités avec de l'insuline

(100 nM) pendant 15 minutes. Les cellules ont été lysées par le tampon de lyse décrit précédemment (224), avec 1mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF), 1mM de vanadate, et des inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics). Les protéines ont été quantifiées par méthode de Bradford (Biorad). Le tampon de charge a été ajouté aux protéines qui ont ensuite été chauffées pendant 10 minutes à 70°C, en suivant le protocole standard de Western blot. Les immunoblots ont été incubés avec les anticorps primaires correspondant, pendant une nuit à 4°C. Les membranes de Western blot sont ensuite lavées avec du TBST (TBS avec 0,1 % de Tween-20) trois fois et incubées avec l'anticorps secondaire correspondant pendant 1 heure à température ambiante. Les signaux protéiques sont ensuite révélés avec le substrat Western ECL (Clarity, Biorad). Les anticorps primaires proviennent tous de la compagnie Cell Signaling Technology : Phospho-IGF-I Receptor β (Tyr1135/1136) /Insulin Receptor β (Tyr1150/1151) (19H7) Rabbit mAb, Insulin Receptor β (L55B10) Mouse mAb; Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb et AKT (pan) (C67E7) Rabbit mAb.

Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. Pour la comparaison de plus de 2 groupes, une analyse ANOVA unidirectionnelle suivie du post-test de Bonferroni a été utilisée. Pour les mesures répétées, une analyse ANOVA à 2 voies à mesures répétées suivie du post-test de Bonferroni a été réalisée. Dans toutes les analyses, $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RÉSULTATS

GAS6 augmente les niveaux protéiques des enzymes impliquées dans la glycolyse dans les cellules musculaires.

Pour explorer l'impact d'un traitement long de GAS6 sur les cellules musculaires, nous avons effectué une analyse protéomique quantitative. Pour cela, par triplicats biologiques, les cellules C2C12 ont été mises en présence ou non de GAS6 pendant 24h. À la suite de la lyse et de la quantification des échantillons, les protéines ont été digérées et soumis à un marquage TMT suivi d'une chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (**Fig.1A**).

Nous avons identifié un total de 5707 protéines et défini les protéines significativement régulées par GAS6 comme celles ayant un changement de facteur de 1,5 avec un taux de fausse découverte (FDR) inférieur ou égal à 5%. Ces analyses ont permis de déterminer 688 protéines augmentées significativement par les 24 heures de traitement avec le GAS6 recombinant.

A l'aide de la base de données d'analyse Gene Set Enrichment Analysis, en prenant en compte les gènes correspondant à ces protéines différentiellement exprimées, nous avons effectué une analyse d'enrichissement des voies KEGG pour élucider leurs rôles fonctionnels. Les résultats analytiques ont révélé que les voies augmentées par le traitement de GAS6 sont liées à plusieurs processus biologiques comme la voie du ribosome, signifiant l'augmentation de plusieurs protéines ribosomales RPS ou RPL composant les sous-unités 60S (*large*) ou 40S (*small*), la voie du protéasome, la régulation du cytosquelette d'actine avec les jonctions serrées ou l'adhérence focale, et aussi le spliceosome (**Fig.1B**). De manière intéressante, l'un des changements majeurs induit par GAS6 implique les enzymes engagées dans les voies métaboliques parallèles de la glycolyse et la néoglucogenèse, ayant un grand nombre de réactions et donc d'enzymes communes (**Fig.1B**). Parmi les 8 enzymes augmentées par GAS6 dans cette voie d'enrichissement KEGG, 6 sont engagés dans des réactions dites réversibles c'est-à-dire pouvant à la fois avoir lieu dans la glycolyse et la néoglucogenèse : la phosphoglucoisomérase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la phosphoglycérate kinase, la phosphoglycéromutase, l'énolase et enfin la lactate déshydrogénase (**Fig.1C**). Enfin, les 2 dernières sont exclusivement engagées dans les réactions irréversibles de la glycolyse : la phosphofructokinase (PFK1) et la

pyruvate kinase (**Fig.1C**). En conclusion, il semblerait que GAS6 augmente principalement l'expression protéique des enzymes glycolytiques.

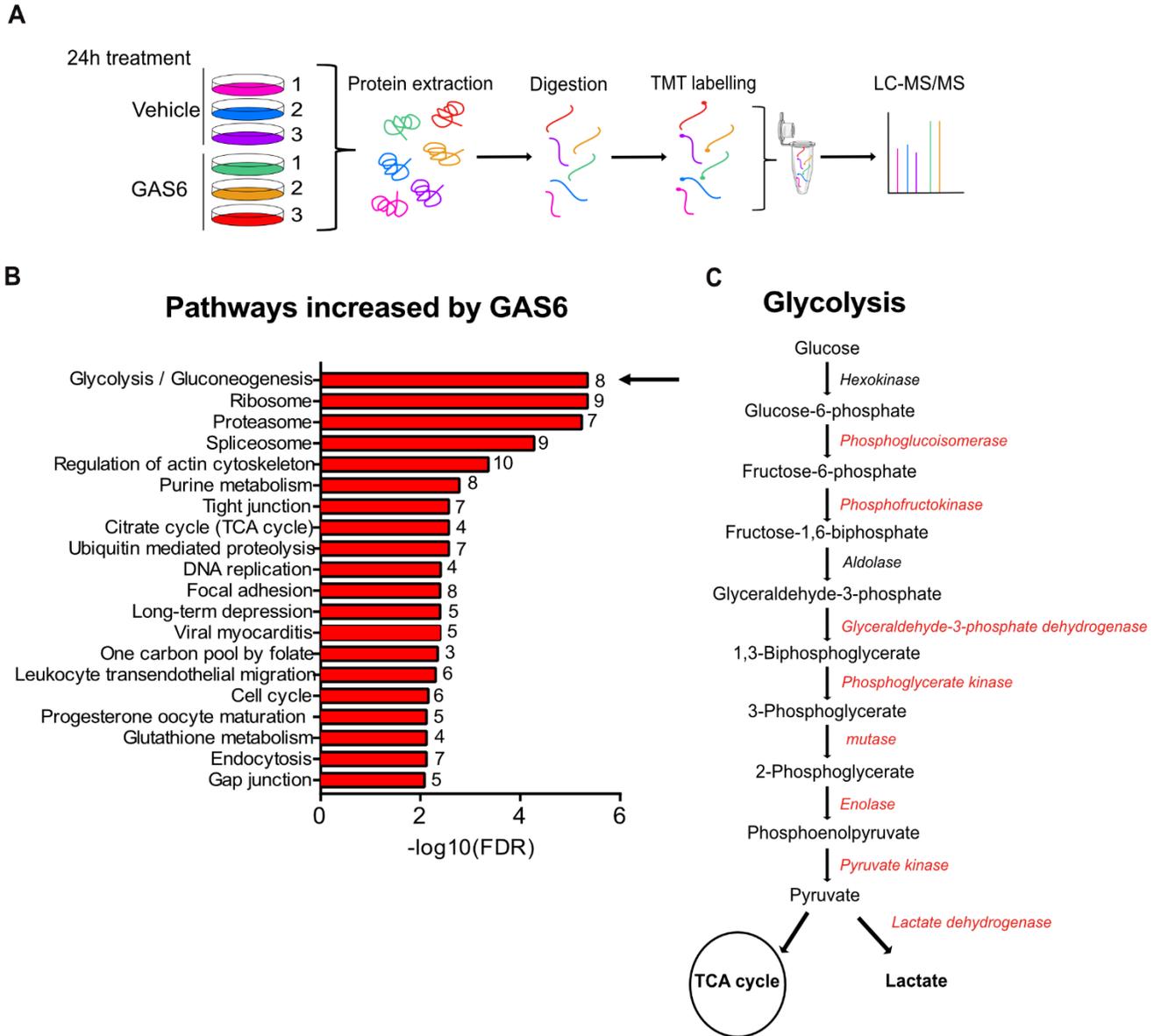


Figure 1. GAS6 augmente l'expression des enzymes impliquées dans la glycolyse dans les cellules musculaires.

(A) Schéma représentatif du protéome total par marquage TMT analysé par spectrométrie de masse des cellules musculaires C2C12 traitées ou non 24h avec GAS6 (200ng/ml). **(B)** Analyse d'enrichissement des voies KEGG surreprésentées dans les protéines régulées à la hausse par GAS6 dans les cellules C2C12 (FDR < 0,05). **(C)** Schéma simplifié de la voie glycolytique montrant les enzymes impliquées à chaque étape, leurs substrats et leurs produits. En rouge, les enzymes significativement augmentées par le traitement avec GAS6.

GAS6 augmente la capacité glycolytique des cellules musculaires.

Par la suite, nous avons voulu évaluer si l'augmentation de l'expression des enzymes de la glycolyse induite par GAS6 pouvait avoir une incidence directe sur les fonctions et capacités glycolytiques des cellules musculaires. Pour cela, nous avons mesuré l'impact de GAS6 sur le métabolisme énergétique des cellules C2C12 en utilisant l'analyseur de flux extracellulaire Seahorse et en effectuant des tests de stress de glycolyse. Brièvement, la technologie Seahorse permet de mesurer en temps réel le taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR) et le taux de consommation d'oxygène (OCR). Ainsi, l'activité de la glycolyse est évaluée par les changements des taux d'ECAR lors d'application séquentielle de glucose pour mesurer la glycolyse à l'état basal, suivie de l'inhibiteur d'ATP synthase l'oligomycine permettant d'évaluer la capacité glycolytique maximale et enfin de l'analogue non métabolisable du glucose le 2-Deoxy-D-glucose (2-DG) qui inhibe la glycolyse. Nous avons ainsi pu observer que le prétraitement long de 24h avec GAS6 augmente très significativement les taux d'ECAR à la suite de l'ajout du glucose, signifiant ainsi que GAS6 augmente la glycolyse basale des cellules musculaires C2C12 (**Fig.2A**). De plus, l'ajout d'oligomycine, bloquant l'ATP synthase et ainsi la production d'ATP par la chaîne de respiration mitochondriale, a pour effet de stimuler la glycolyse anaérobie. Nous avons pu ainsi également constater que GAS6 augmente significativement la capacité maximale de la glycolyse et ainsi la glycolyse anaérobie à l'origine de la conversion du pyruvate en lactate (**Fig.2A**). À noter qu'il n'y a pas de différence significative après ajout de l'inhibiteur 2-DG. Nous avons ensuite voulu savoir si inhiber la voie de signalisation de GAS6 et de ses récepteurs TAM pouvait bloquer cet effet sur la capacité glycolytique. Pour cela, nous avons traité les cellules C2C12 pendant 24h avec GAS6 ou l'inhibiteur pharmacologique des TAM, le LDC1267, ou une combinaison des deux. Nous avons observé à nouveau que GAS6 augmentait la capacité glycolytique basale et maximale des cellules musculaires (**Fig.2B**). En revanche, les prétraitements avec le LDC1267 permettent de contrecarrer cet effet pour revenir vers une tendance à la normale (**Fig.2B**). La normalisation de ces différences d'ECAR a été faite sur la quantification protéique de chaque condition. Les traitements de GAS6 et de l'inhibiteur LDC1267 n'induisent aucune différence significative sur les niveaux protéiques (**Fig.2C**). Ainsi, en normalisant nos résultats Seahorse sur la quantité protéique, nous retrouvons le même phénotype métabolique

qui est l'augmentation des capacités glycolytiques des cellules musculaires C2C12 traitées avec un traitement chronique de GAS6 (**Fig.2D**).

Ensemble, ces résultats suggèrent que GAS6, via ses récepteurs TAM, stimule la glycolyse, notamment la glycolyse anaérobie, et que bloquer l'activation des récepteurs TAM empêcherait la dérégulation glycolytique induite par GAS6.

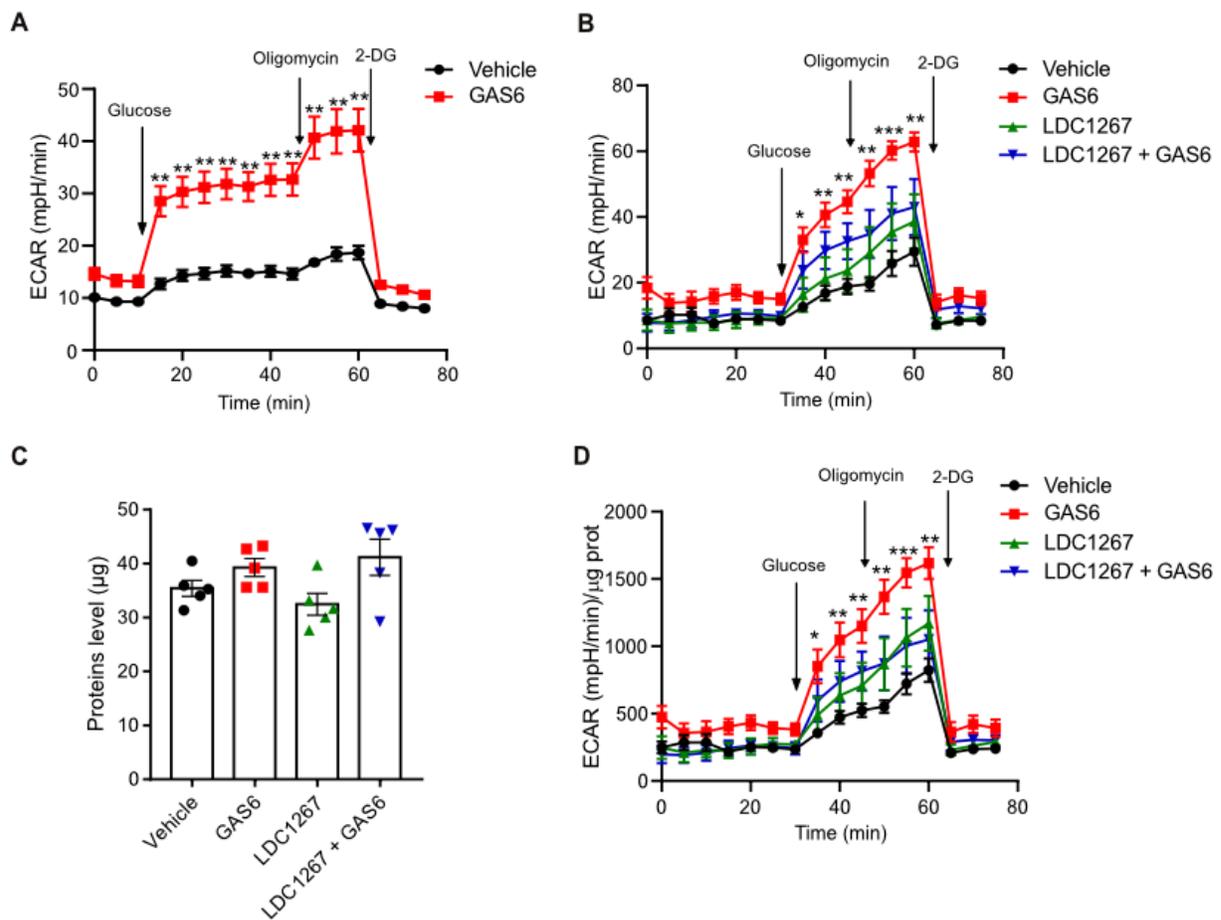


Figure 2. GAS6 augmente la capacité glycolytique des cellules musculaires.

L'analyse par méthode Seahorse de la glycolyse dans les cellules musculaires C2C12 est évaluée par mesure du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) lors d'injections successives de glucose (10 mM), d'oligomycine (1 μ M) et de 2-DG (50 mM). **(A)** Profil des niveaux glycolytiques de cellules musculaires C2C12 traitées 24h avec GAS6 (200ng/ml) (n=3). **(B)** Analyse du taux glycolytique des C2C12 traitées avec GAS6 (200ng/ml) et/ou l'inhibiteur pharmacologique des récepteurs TAM, LDC1267 (5 μ M) pendant 24h. **(C)** Quantification des protéines des C2C12 selon les différents traitements (n=1). **(D)** Analyse du taux glycolytique des C2C12 traitées avec GAS6 et LDC1267 pendant 24h, normalisé sur les quantités de protéines totales de chaque puit (n=1). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 par test ANOVA à 2 facteurs pour des mesures répétées avec test de comparaisons multiples de Bonferroni **(A-B et D)** ou par ANOVA à 1 facteur **(C)**.

GAS6 augmente les niveaux de lactate sécrété par les cellules musculaires

Compte tenu de l'augmentation de l'expression de la lactate déshydrogénase couplée à une élévation de la glycolyse anaérobie induites par GAS6, nous avons investigué l'effet de ce dernier sur la production de lactate. Nous avons reproduit les conditions expérimentales du Seahorse et mesuré les niveaux de lactate sécrété par les cellules C2C12 traitées ou non avec GAS6 pendant 24h suivi d'une stimulation au glucose, qui permet d'initier la glycolyse et ainsi la production de lactate. Nous avons observé, comme attendu, que le glucose induit la production de lactate, mais celle-ci est significativement plus forte lorsqu'il y a eu prétraitement long au GAS6 (**Fig.3A**). Par ailleurs, l'ajout de GAS6 seul augmente légèrement les taux de lactate sécrété par les C2C12 en comparaison à la condition contrôle (*Vehicle*), provenant probablement du glucose emmagasiné par les cellules. Ainsi, GAS6 promeut la production de lactate qui est ensuite sécrété par les cellules musculaires.

Le lactate inhibe l'activation du récepteur à l'insuline en réponse à l'insuline

Notre précédente étude a démontré qu'une exposition longue au GAS6 sur les cellules musculaires inhibe l'activation du récepteur à l'insuline et de sa cible en aval AKT induite par l'insuline. Au vu, de nos récents résultats suggérant aussi que GAS6 augmenterait la glycolyse anaérobie et la production de lactate sécrété, nous avons donc voulu estimer si le lactate pouvait être l'un des mécanismes par lequel GAS6 affecte cette réponse à l'insuline des cellules musculaires. Pour cela, les cellules C2C12 ont été prétraitées pendant 24h avec différentes doses de lactate (0,4-50mM) ou d'un véhicule, suivi d'un traitement de 15 minutes avec de l'insuline. Nous avons pu remarquer que le lactate diminue significativement la phosphorylation du récepteur de l'insuline (RI) induite par le traitement à l'insuline, de façon dose-dépendante (**Fig.3B-C**). À une dose faible de 2 mM, une tendance se dessine déjà avec une réduction presque significative de la phosphorylation du RI d'environ 1,3 fois. Les traitements de 10 à 50 mM de lactate diminuent significativement la phosphorylation du RI d'environ 2 fois (**Fig.3C**). Néanmoins, de façon surprenante, le lactate ne semble pas avoir d'impact sur les niveaux de phosphorylation d'AKT en réponse à l'insuline (**Fig.3C**). Ces résultats suggèrent un tout nouveau rôle du lactate

dans le métabolisme cellulaire et potentiellement dans la résistance à l'insuline musculaire, puisqu'un traitement long inhibe l'activation du RI induite par l'insuline.

GAS6 inhibe la voie de signalisation de l'insuline en partie via l'augmentation des niveaux de lactate des cellules musculaires

Nous avons ensuite testé si l'inhibition de la réponse à l'insuline dépendante de GAS6 pouvait être abolie en bloquant la production de lactate induite par ce dernier dans les cellules musculaires. Les cellules C2C12 ont été prétraitées pendant 24h avec GAS6 (0,4-50mM) et/ou un inhibiteur de la lactate déshydrogénase, l'oxamate, responsable du blocage de la glycolyse anaérobie. Les C2C12 ont ensuite été soumises à une stimulation à l'insuline pendant 15 minutes. Comme attendu, GAS6 inhibe à la fois la phosphorylation du RI et d'AKT. L'oxamate seul ne semble pas avoir d'effet sur la signalisation de l'insuline. Il est intéressant de noter que lorsque les cellules sont prétraitées à la fois avec GAS6 et l'oxamate, l'effet inhibiteur de GAS6 sur la phosphorylation du RI disparaît et l'activation de ce dernier retourne à la normale en comparaison avec la condition contrôle stimulée à l'insuline (**Fig.3D**). Cependant, l'ajout de l'oxamate au GAS6 ne semble pas avoir d'impact sur les niveaux de phosphorylation d'AKT en réponse à l'insuline en comparaison avec la condition de GAS6 seul (**Fig.3D**). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de GAS6 sur l'activation d'AKT induite par l'insuline est indépendante du lactate et serait ainsi exécutée par un autre mécanisme, ce qui concorde avec nos précédentes observations qui ne montrent aucun effet direct du lactate sur AKT (**Fig.3B-C**). L'ensemble de nos résultats suggère qu'un traitement long à GAS6 entraîne une augmentation des niveaux lactiques produits par les cellules musculaires contribuant à la diminution de l'activation du RI en réponse à l'insuline.

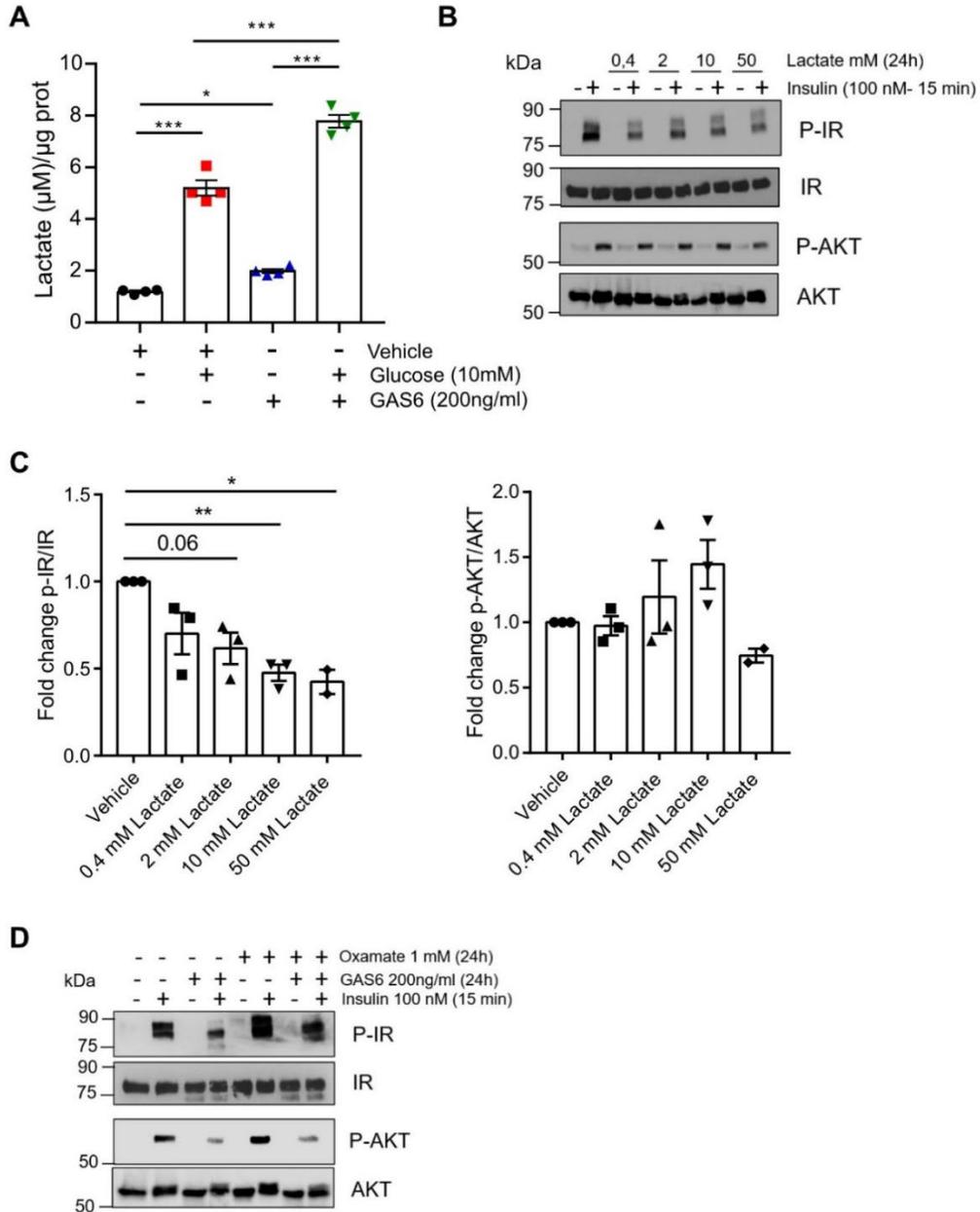


Figure 3. GAS6 impacte la voie de signalisation de l'insuline en augmentant les niveaux de lactate.

(A) Niveaux de lactate sécrété par les cellules C2C12 traitées avec GAS6 (200 ng/ml) pendant 24h suivi d'une stimulation au glucose (10 mM) pendant 30 minutes. Les taux de lactate sont normalisés par rapport à la teneur totale en protéines (n=2). **(B)** Activation de la voie de signalisation de l'insuline dans les cellules C2C12 traitées avec différentes doses de lactate (0,4-50 mM) pendant 24h suivie d'une stimulation à l'insuline (100 nM) de 15 minutes (n=2-3). Phosphorylation du récepteur de l'insuline (IR-Y1150/1151) et d'AKT (S473) évaluée par analyse Western blot. RI et AKT total ont été utilisés comme témoins de charge. **(C)** Quantification des niveaux de phosphorylation de RI et AKT sur leur quantité protéique totale. **(D)** Phosphorylation du RI et d'AKT (S473) mesurées par Western blot de cellules C2C12 traitées avec GAS6 (200 ng/ml) et/ou l'inhibiteur de la lactate déshydrogénase, l'oxamate (1mM) pendant 24h suivi d'un traitement de 15 minutes à l'insuline (100 nM). RI et AKT totaux sont les témoins de charge (n=1). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, par test ANOVA à 1 facteurs pour des mesures répétées avec test de comparaisons multiples de Bonferroni **(A et C)**

DISCUSSION

Notre présente étude a démontré que GAS6 régula le protéome total des cellules musculaires C2C12 en augmentant spécifiquement l'expression des enzymes impliquées dans la glycolyse anaérobie. Cet effet a pour conséquence une très forte élévation des capacités glycolytiques basales et maximales. Les C2C12 exposées à un traitement prolongé de GAS6 produisent des quantités élevées de lactate qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. Or, nous avons également établi que le lactate induisait des altérations dans la réponse à l'insuline des cellules du muscle en inhibant spécifiquement l'activation du RI. Notre étude propose ainsi un tout nouveau mécanisme d'action par lequel la résistance à l'insuline des cellules musculaires induite par GAS6 serait causée par une modulation de l'utilisation du glucose pour favoriser le métabolisme anaérobie lactique.

Régulation du protéome par GAS6

Notre étude met en évidence pour la première fois l'effet de GAS6 sur le protéome de cellules musculaires. Nos analyses protéomiques montrent à la fois des voies biologiques régulées par GAS6 déjà connues, comme la régulation du cytosquelette d'actine le cycle cellulaire (195), mais surtout de nouvelles voies impliquées cette fois-ci dans le métabolisme, suggérant un rôle de GAS6 dans la reprogrammation métabolique. Cependant, nous n'avons pas pu identifier les protéines, et par conséquent les voies biologiques, négativement régulées par GAS6, notifiant ainsi que nos analyses bio-informatiques doivent être approfondies. Malgré cela, il est important de souligner qu'aucune différence significative, ni tendance, en termes de quantité protéique n'est présente entre les deux conditions mesurées dans les triplicats utilisés lors de notre expérience protéomique. Il est intéressant de noter que dans les voies analytiques KEGG des protéines augmentées par GAS6, nous retrouvons les voies du protéasome (ex : plusieurs sous-unités du protéasome 20S et 26S - PSM) et de la protéolyse médiée par l'ubiquitine (ex : UBA1, UBA2, HERC4 etc.). Ces voies augmentées pourraient expliquer une régulation et un maintien de l'homéostasie protéique globale afin de contrebalancer l'effet positif de GAS6 sur la synthèse protéique. Pour cela, il aurait été intéressant de tester si l'ubiquitinylation est augmentée dans les conditions traitées avec GAS6 par Western blot avec un anticorps anti-ubiquitine (Ub). De

plus, l'une des étapes suivantes nécessaires de ce projet est de déterminer par quels mécanismes GAS6 augmente l'expression des enzymes glycolytiques. Pour cela, il serait pertinent d'exécuter certaines expériences comparant les conditions véhicule et GAS6. Par exemple, nous pourrions déterminer s'il s'agit d'une augmentation de la régulation transcriptionnelle par RT-qPCR. Le changement de la synthèse protéique de ces enzymes pourrait être identifiée par technique de *cycloheximide chase*. De plus, la co-immunoprécipitation de chacune des protéines, suivie d'un immunoblot contre l'Ub permettrait de définir si ces protéines sont moins ciblées par la dégradation médiée par le protéasome.

GAS6 augmente la glycolyse anaérobie et la production de lactate

L'un des points centraux de notre étude est d'avoir pu démontrer qu'une exposition longue de GAS6 sur les C2C12 conduit à une reprogrammation du métabolisme cellulaire afin de favoriser la glycolyse anaérobie. Nos expériences par méthode Seahorse montrent l'augmentation de la glycolyse anaérobie induite par GAS6 dans les cellules musculaires. Néanmoins, notre expérience de *rescue* utilisant le LDC1267 n'a été réalisée qu'une seule fois et nécessite d'être répétée. Par ailleurs, cet inhibiteur cible les 3 récepteurs de la famille des TAM. Sur la base de notre précédent projet et de la différence d'affinité connue de GAS6 pour les TAM (182), nous nous orientons vers l'hypothèse d'un mécanisme d'action médié via le récepteur AXL. Nous pourrions ainsi reproduire nos expériences en utilisant l'inhibiteur pharmacologique spécifique d'AXL, le R428 pour tester cette possibilité. Nous avons aussi pu démontrer que les conséquences de cette hausse de la capacité glycolytique conduit à l'augmentation de lactate. Nous avons mesuré les niveaux sécrétés de lactate, les taux intracellulaires devraient aussi être mesurés pour la suite de ce projet.

GAS6 et le lactate semblent être impliqués dans la résistance à l'insuline

Nous pouvons supposer, selon nos résultats avec l'oxamate, que l'augmentation de la production de lactate par GAS6 est un mécanisme direct de ce dernier sur le développement de la résistance à l'insuline dans les cellules de type musculaire. Néanmoins, cette expérience demande d'être reproduite et des ajustements sont nécessaires en termes de durée et de dose optimales de traitement avec l'oxamate. Notre projet souligne également l'impact du lactate sur la

signalisation de l'insuline puisque nous avons démontré qu'un traitement long inhibe la phosphorylation du RI par l'insuline. Ces résultats vont dans le sens de plusieurs études qui constatent que des niveaux élevés de lactate plasmatique ou intramusculaire sont associés au DT2 ou que des capacités glycolytiques altérées du muscle squelettique contribuent à la résistance à l'insuline (63, 64, 225, 226). Néanmoins, le mécanisme moléculaire par lequel le lactate contribue à cette désensibilisation du muscle à l'insuline reste encore imprécis.

Bien que nos résultats soient préliminaires et nécessitent d'être reproduits, ils suggèrent néanmoins un mécanisme inédit de GAS6 dans la reprogrammation métabolique à l'origine de l'insulino-résistance des cellules musculaires.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

DISCUSSION

L'ensemble des travaux de cette thèse a pu démontrer un rôle essentiel de la voie de signalisation de GAS6/AXL dans la régulation de l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline en mettant également en lumière les mécanismes moléculaires sous-jacents. Nous avons en effet caractérisé de façon extensive l'impact négatif de GAS6 *in vivo* sur le métabolisme du glucose à l'aide de souris *knock-out* ou transgéniques pour GAS6. Nos résultats ont mis en évidence un mécanisme moléculaire précédemment inconnu via lequel GAS6 et son récepteur AXL étaient responsables d'une reprogrammation de la voie de signalisation de l'insuline dans les cellules musculaires. Cet effet s'accompagnant également d'un changement métabolique au niveau de la glycolyse dans ces cellules. Nous avons également montré que les niveaux élevés de GAS6 corrèlent avec une mauvaise gestion de la clairance glucidique

Néanmoins, nos recherches soulèvent également des questions supplémentaires qui devront être étudiées dans le futur afin d'approfondir notre compréhension de la voie GAS6/AXL pour permettre d'envisager son ciblage potentiel dans le cadre de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce chapitre, différents résultats de la thèse seront discutés, nous permettant aussi de soulever de nouvelles interrogations, hypothèses et perspectives de recherche.

GAS6 chez l'humain : un biomarqueur envisageable comme prédicteur de risque de DT2?

Lors de ce projet de thèse, nous avons eu l'immense chance de pouvoir investiguer le lien entre GAS6 et certains désordres métaboliques chez l'humain. Pour cela, nous avons pu avoir accès aux échantillons et données métaboliques de la cohorte MONET, une population de femmes dites à risque pour développer le DT2 au vu de leur poids et de leur sédentarité. Nos résultats ont ainsi permis de mettre en évidence des corrélations significatives entre les niveaux de GAS6 sériques et des facteurs d'adiposité, d'inflammation et encore d'intolérance au glucose chez ces femmes ménopausées, non-diabétiques, en surpoids ou obèses. Néanmoins, certaines limitations et discussions dans notre étude sont à souligner. Tout d'abord, cette étude corrélative a été réalisée sur un échantillon de petite taille composée uniquement de 126 femmes, et sans prendre en compte l'ethnicité des patientes comme facteur. Par ailleurs, comme nous l'avons précédemment mentionné dans l'article 1 (chapitre 2) de cette thèse, les données de GAS6 chez l'humain restent encore controversées, associant soit une corrélation positive entre les niveaux de GAS6 sériques et la résistance à l'insuline chez des adolescents obèses, soit négative avec le DT2 chez des adultes (216, 229). Nous avons alors suggéré, selon nos observations et ces études, que les niveaux de GAS6 pourraient varier en fonction de l'avancée du DT2. Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas comparé directement notre cohorte avec d'autres groupes comme, par exemple, des femmes ayant les mêmes caractéristiques mais étant diabétiques ou n'étant pas en surpoids et obèses. Cependant, la force de notre étude repose sur le fait que nous avons pu distinguer, à l'aide des mesures sériques de GAS6, des différences dans la tolérance au glucose au sein d'une population homogène telle que MONET. Les niveaux élevés de GAS6 semblent prédire une mauvaise gestion de la clairance du glucose. Néanmoins, contrairement à l'étude réalisée dans une cohorte d'adolescents en surpoids et obèses avec laquelle nous avons observé le plus de similitudes, nous n'avons pas constaté de relation entre les taux circulants de GAS6 et la sensibilité à l'insuline déterminée par l'indice HOMA-IR (216). En effet, l'HOMA-IR est calculé à partir des valeurs de glycémie et d'insulinémie à jeun, pour lesquelles aucune corrélation n'a été établie avec GAS6 (230). En revanche, il a été observé lors des tests de tolérance au glucose, une association entre les niveaux élevés de GAS6 et une augmentation des taux insulinémiques qui ne semble pourtant pas être suffisante pour compenser l'altération de la clairance du glucose

observée. Il semblerait donc y avoir un lien entre GAS6 et l'insuline que nous n'avons pu démontrer dans la cohorte MONET.

Par ailleurs, il est important de noter que ces études ainsi que la nôtre, ne mesurent que les niveaux totaux de GAS6 dans la circulation et non la forme active, c'est-à-dire γ -carboxylée, qui permet l'activation des récepteurs TAM (185). Actuellement, aucun ELISA spécifique n'est disponible sur le marché pour permettre une telle mesure qualitative. Une seule étude connue à ce jour a effectué cette mesure au sein d'un groupe contrôle et d'un groupe de personnes atteintes de DT2. Les résultats de cette étude suggèrent que les niveaux plasmatiques de GAS6 γ -carboxylé sont plus faibles dans le groupe DT2 comparativement au contrôle et semblent négativement corrélés avec le glucose à jeun (231). Il serait intéressant de confirmer l'efficacité de cette technique pour éventuellement permettre sa reproductibilité et sa reproduction dans le cas de MONET. De plus, il faut ajouter que ces mesures ont été réalisées sur une cohorte très restreinte, ne dénombrant qu'une vingtaine d'individus par groupe. D'autre part, aucune différence dans les niveaux totaux de GAS6 n'a été observée.

Nous avons évoqué le fait que GAS6 pourrait être utilisé comme un biomarqueur de la dérégulation de l'homéostasie glucidique. Bien entendu, actuellement cela serait uniquement valable pour le cas spécifique des femmes ménopausées, non-diabétiques, en surpoids ou obèses. Cependant, dans l'éventualité de poursuivre ces investigations, les patientes de la cohorte MONET ont été par la suite séparées en deux groupes, elles ont suivi un programme de perte de poids de 6 mois basé uniquement sur la restriction calorique ou en combinaison avec un entraînement en résistance (232). Les deux interventions ne démontrent pas de différence entre elles, mais ont induit une réduction significative du poids corporel qui s'accompagne d'une amélioration des taux d'insuline à jeun, de l'homéostasie glucidique et des marqueurs du profil d'inflammation. Dans ce contexte, nous proposons de mesurer à nouveau le GAS6 circulant des patientes pour voir une éventuelle corrélation avec une baisse de GAS6. Ceci permettrait de confirmer notre point de vue sur la relation entre les niveaux circulants de GAS6 et le métabolisme glucidique.

L'ensemble de ces études corrélatives, bien que divergentes, souligne une éventuelle implication de GAS6 dans l'altération du métabolisme du glucose.

Découverte d'un nouveau rôle *in vivo* de GAS6 : son implication dans la résistance à l'insuline

Il est nécessaire de souligner que nos recherches menées chez l'humain restent des études corrélatives qui ne permettent pas d'affirmer que GAS6 est réellement impliqué dans une dérégulation de l'homéostasie glucidique. Cela a pu être cependant démontré par l'utilisation de souris déficientes pour GAS6. Nous avons confirmé que la perte de GAS6 améliorait significativement la tolérance au glucose mais aussi fortement la sensibilité à l'insuline. À l'inverse, les souris transgéniques pour GAS6, présentant des niveaux sériques élevés, ont une sensibilité à l'insuline diminuée. Ces résultats démontrent ainsi une régulation de GAS6 sur la sensibilité à l'insuline, ce que nous n'avions pas pu montrer avec les analyses faites sur la cohorte MONET. À noter que nos analyses phénotypiques chez la souris n'ont été réalisées que chez les mâles. Il est crucial d'étudier les deux sexes tenant compte des différences significatives en termes de régulation métabolique influencées par les hormones sexuelles (233). Par exemple, les œstrogènes sont connus pour améliorer la sensibilité à l'insuline et inhiber la gluconéogenèse (234). Par ailleurs, certaines études semblent également suggérer que l'expression de GAS6 pourrait être modulée par les hormones sexuelles (235,236). Nous proposons comme expériences complémentaires de caractériser le phénotype métabolique (i.e. GTT, ITT, GSIS, PTT) des femelles mais aussi de femelles ovariectomisées.

Toutefois, le point central de notre étude demeure que nous avons montré, pour la toute première fois, un phénotype direct causé par la perte de GAS6 dans des conditions physiologiques. En effet, jusqu'à présent les phénotypes liés à une déficience de GAS6 étaient tous dépendants de stimuli externes ou pathologiques tels qu'un état inflammatoire induit, un état de stase ou des régimes pathogéniques (192,213,237). Dès lors, nos travaux nous permettent de mieux comprendre le rôle intrinsèque de GAS6 dans la régulation de l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline.

GAS6 et AXL : nouveaux régulateurs de la voie de signalisation de l'insuline

Dans leur ensemble, les analyses métaboliques réalisées chez la souris suggèrent que la protéine GAS6 module la sensibilité à l'insuline en affectant la captation du glucose par les tissus insulino-sensibles. L'étude de l'expression génique des récepteurs TAM a révélé que *Axl* était fortement exprimé dans plusieurs muscles squelettiques. Sachant qu'AXL est le récepteur pour lequel GAS6 a la plus forte affinité et que le muscle squelettique est un acteur clé dans l'homéostasie glucidique, nous avons décidé d'orienter notre projet sur la compréhension du mécanisme d'action de GAS6 et AXL dans ce type tissulaire. Néanmoins, il serait aussi important d'étudier la fonction de GAS6 dans les autres tissus insulino-sensibles tels que le foie et le tissu adipeux, et également de déterminer quel TAM pourrait être impliqué.

Nous avons montré qu'AXL est activé par GAS6 γ -carboxylé dans la lignée de cellules musculaires C2C12. L'un de nos résultats déterminants a été de prouver qu'un traitement long de GAS6 sur les C2C12 affectait leur réponse à l'insuline, se traduisant par une diminution de la phosphorylation du RI et d'AKT induite par l'insuline. Le mécanisme d'action par lequel GAS6 et AXL affectent ces niveaux de phosphorylation n'est pas encore totalement élucidé. Or, nous avons montré dans les cellules de mammifères que AXL et RI interagissaient ensemble et que ce phénomène s'intensifiait en réponse à l'insuline, ceci dans un contexte de surexpression du récepteur AXL. Il est donc possible que cette interaction entre les récepteurs, induise un rapprochement de protéines interagissant avec AXL au niveau du RI dont d'éventuelles phosphatases. Il est intéressant de noter que dans nos analyses phospho-protéomiques des C2C12 traitées avec GAS6 suivi d'une stimulation à l'insuline, nous avons pu déterminer que la phosphatase C1-TEN, également appelée TNS2, était l'une des phosphatases dont les niveaux de phosphorylation en réponse à l'insuline étaient affectés par le prétraitement long de GAS6. Cette phosphatase attire notre intérêt puisqu'en effet plusieurs études ont démontré qu'elle interagissait avec AXL et même qu'elle était phosphorylée par ce dernier (238,239). Par ailleurs, C1-TEN est connue pour être impliquée négativement dans la voie de signalisation de l'insuline. En effet, C1-TEN déphosphoryle IRS-1 et entraîne une accélération de sa dégradation (240). De plus, il a été démontré que l'inhibition de C1-TEN améliorait la tolérance au glucose de souris diabétiques *db/db* (241). Dans notre étude, nous n'avons pas évalué l'effet de GAS6 sur la

phosphorylation d'IRS-1, il serait intéressant de déterminer si ce dernier est affecté. Cependant, il ne faut pas écarter l'éventuelle participation d'autres phosphatases qui pourraient affecter directement la phosphorylation du RI. Les phosphatases potentiellement impliquées pourraient être identifiées en comparant l'interactome d'AXL en condition normale avec celui d'AXL à la suite d'une stimulation à l'insuline par technique de Bio-ID couplée à la spectrométrie de masse.

Nos données phospho-protéomiques ont également pu mettre en évidence que le traitement long de GAS6 sur les C2C12 augmente la phosphorylation de protéines impliquées dans le trafic vésiculaire en réponse à l'insuline, en particulier les protéines de la voie des Rab GTPases. D'autre part, notre étude a révélé qu'AXL augmente l'internalisation du RI et sa localisation au niveau des endosomes tardifs exprimant RAB7 après stimulation à l'insuline. Cette régulation de l'endocytose et ainsi le changement de la localisation spatiale du RI peut avoir plusieurs impacts. Cela peut être à l'origine d'une modulation de différentes voies de signalisation et donc d'une éventuelle reprogrammation de la réponse à l'insuline. Par exemple, la voie PI3K/AKT est activée initialement au niveau de la membrane plasmique alors que la voie ERK peut être activée et même initiée lors de l'endocytose (242,243). D'autre part, cette modification du trafic endocytaire du RI, en favorisant sa localisation au niveau des endosomes tardifs, pourrait impacter sa voie traditionnelle de recyclage. Ceci pourrait alors affecter par la suite sa présence à la membrane plasmique. Il serait alors intéressant pour avoir plus d'information à ce sujet de réaliser une expérience de suivi en direct par microscopie, notamment en observant le destin du RI couplé à de la GFP.

Nos études mécanistiques de l'impact de GAS6 et AXL sur la signalisation de l'insuline ont été réalisées principalement sur des modèles cellulaires. Pour plus d'approfondissement, des études *in vivo* seraient nécessaires. Nous pourrions, entre autres, comparer les niveaux de phosphorylation du RI et d'AKT en réponse à l'insuline dans les muscles de souris *Gas6^{+/+}* et *Gas6^{-/-}* et quantifier les niveaux de RI à leur surface.

GAS6-AXL et l'effet Warburg?

Après avoir pu montrer qu'un traitement long de GAS6 affecte la réponse à l'insuline pour les cellules musculaires, en approfondissant nos recherches, nous avons pu obtenir des résultats préliminaires qui suggèrent aussi une reprogrammation métabolique des cellules musculaires qui augmente leur niveau glycolytique et la production de lactate. Ce phénomène ressemble fortement à ce qui est nommé l'effet Warburg observé dans les cellules cancéreuses. En effet, ce dernier désigne l'observation selon laquelle les cellules cancéreuses absorbent des niveaux élevés de glucose comparativement à des cellules normales et que même en présence d'oxygène ces dernières vont privilégier la glycolyse conduisant à la production de lactate, habituellement observée en condition anaérobie, à celle couplée à la phosphorylation oxydative (244). Cette reprogrammation confère différents avantages aux cellules cancéreuses qui ont de forts besoins énergétiques puisque l'augmentation de la glycolyse s'accompagne d'une production soutenue d'intermédiaires métaboliques indispensables à la synthèse protéique, lipidique et d'acides nucléiques. Par ailleurs, ceci permet également aux cellules de s'adapter aux changements de taux d'oxygène de leur microenvironnement tumoral.

L'effet Warburg a été proposé comme un événement précoce dans les étapes de tumorigenèse, il serait intéressant de noter que nos observations dans le muscle pourraient ainsi servir à la découverte de nouveaux mécanismes d'action de GAS6 et AXL dans le domaine de l'oncologie. En effet, très peu de choses sont connues dans ce domaine mais des études récentes semblent confirmer notre point et le lien étroit entre AXL et la glycolyse. En effet, il a pu être observé que l'inhibition d'AXL par shRNA, diminue la glycolyse basale de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses de l'endomètre (245). Les résultats de cette étude montrent que le traitement couplant le paclitaxel avec le AVB-500, une protéine de fusion Fc-sAXL qui lie GAS6 pour empêcher sa liaison à AXL endogène et donc l'activation de la voie, entraîne une réduction de la glycolyse basale et de la production de lactate ainsi qu'une diminution de l'expression transcriptionnelle de l'hexokinase et de la phosphofructokinase. Néanmoins, dans cette étude le mécanisme moléculaire reste à être élucidé puisque le traitement seul au AVB-500 n'induit pas d'effet direct sur la glycolyse et la transcription de ces gènes. Ceci est probablement dû au fait

que AXL endogène est surexprimé dans ces cellules cancéreuses et peut être activé indépendamment de GAS6. Dans ce contexte, un inhibiteur direct d'AXL (c-à-d R428) pourrait être préférable. Une seconde étude, cette fois-ci dans des cellules du cancer de l'ovaire (OvCa) surexprimant AXL, a démontré que la diminution de l'expression d'AXL induite par siRNA s'accompagne d'une diminution de la consommation de glucose, de production de lactate et d'ATP (246). Au niveau mécanistique, il est proposé que AXL promeut la phosphorylation Y105 de la pyruvate kinase 2. Ainsi, nos résultats et ces études soulignent un tout nouveau rôle métabolique d'AXL, à la différence que nous démontrons directement l'implication de GAS6 sur cette reprogrammation métabolique sans qu'il n'y ait une dérégulation déjà existante de l'expression d'AXL.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que la reprogrammation métabolique induite par GAS6, pourrait être un mécanisme de rétrocontrôle positif de sa voie de signalisation. En effet, en augmentant la glycolyse et les taux de lactate, GAS6 pourrait induire une régulation de ses propres récepteurs. Cette idée vient de l'observation faite que le traitement de cellules endothéliales avec du lactate seul (pendant 2h) pouvait induire une activation de la voie PI3K-AKT dépendante du récepteur AXL (247). De plus, le traitement des cellules endothéliales par le lactate semble promouvoir l'expression protéique de GAS6. Il serait alors possible que le GAS6 produit soit ensuite sécrété et agisse de manière autocrine pour induire l'activation d'AXL afin de promouvoir l'angiogenèse (247). Par ailleurs, une autre étude réalisée dans des macrophages démontre que l'efferocytose, fonction dans laquelle GAS6 est impliqué, favorise l'augmentation de la glycolyse et ainsi l'élévation des niveaux de lactate (248). Les résultats démontrent que le lactate entraînerait une augmentation des niveaux du récepteur MERTK à la surface cellulaire qui à son tour stimulerait la phagocytose continue des cellules apoptotiques. Dans notre cas, nous n'avons effectué que des traitements longs de lactate et il aurait été intéressant d'étudier plus en détails les effets sur différents temps (*time-course*) afin d'observer si une différence dans la production ou sécrétion de GAS6 endogène et l'activation des récepteurs TAM, notamment AXL, dans les C2C12 avait lieu.

Notre étude tente également de faire le lien entre GAS6 et la résistance à l'insuline via l'implication du lactate. Plusieurs études cliniques ont pu démontrer des associations entre la lactatémie, le lactate intramusculaire et les niveaux glycolytiques des muscles squelettiques avec une diminution de la sensibilité à l'insuline (63,64,227,228). Malheureusement, dans notre étude menée chez l'humain, le lactate n'a pas été mesuré et donc aucune corrélation entre ce dernier et GAS6 ne peut être déterminée. Il est envisageable de penser qu'une association entre ces deux paramètres aurait pu exister puisque dans certaines pathologies, comme dans le cas de la septicémie où les niveaux de GAS6 sont augmentés, une corrélation positive et significative avec les niveaux de lactate circulants est constatée (249).

Dans notre cas, nous avons pu mettre en évidence que le traitement long de GAS6 induit une augmentation des niveaux de lactate sécrétés et qu'une exposition prolongée au lactate altère la réponse à l'insuline des cellules musculaires en affectant les niveaux de phosphorylation du RI. Une étude a démontré le développement d'une résistance à l'insuline musculaire induite par l'infusion prolongée de lactate chez le rat (250). Cependant, ce qui diffère avec nos résultats est que le lactate n'affecte pas la capacité de l'insuline à phosphoryler le RI ou les IRS, mais diminuerait l'activation de PI3K et AKT et entraînerait une diminution de la glycolyse. Cette différence peut s'expliquer par divers facteurs expérimentaux, comme le temps de traitement du lactate qui est différent puisqu'il s'agit d'une exposition de 3,5h contre 24h. Par ailleurs, dans cette expérience *in vivo*, le rôle du foie, qui est le principal organe capteur de lactate et qui est capable de le métaboliser, n'est pas à sous-estimer. En contradiction, une autre étude démontre que le traitement de 24h avec du lactate de cellules primaires du muscle squelettique humain, induit un changement de phosphorylation de IRS-1, plus précisément une hyperphosphorylation en S636 qui est un marqueur de résistance à l'insuline (251). Par ailleurs, il est possible aussi que nos expériences sur cellules puissent reproduire l'effet du lactate sur le microenvironnement. Ce dernier pourrait jouer aussi un rôle essentiel dans l'acidification du milieu cellulaire qui affecterait la signalisation de l'insuline. En effet, dans des cellules musculaires, un pH faible entraîne une diminution de la phosphorylation du RI à la suite d'une stimulation à l'insuline (252). Ensemble, ceci démontre que le mécanisme d'action du lactate sur la signalisation de l'insuline n'est pas encore élucidé mais son rôle est incontestable.

Bien entendu, nos résultats sont préliminaires et nécessitent d'être approfondis. Dans le futur, un lien entre les chapitres 3 et 4 de cette thèse serait à envisager. Entre autres, il serait nécessaire de déterminer si les niveaux de lactate entre des souris *Gas6^{+/+}* et *Gas6^{-/-}* sont différents, et si une différence dans les niveaux protéiques des enzymes de la glycolyse existe dans les muscles de ces souris. Enfin, il serait important d'investiguer comment le lactate participe moléculairement à l'établissement de la résistance à l'insuline comme par exemple, par la promotion ou non de l'endocytose du récepteur à l'insuline dans les cellules musculaires.

Une véritable énigme : la source de GAS6?

GAS6 est une protéine circulante qui assure une grande diversité de fonctions via les récepteurs TAM. Comme nous l'avons vu, sa présence sérique est souvent mesurée comme biomarqueur dans le développement de certaines pathologies. Cependant, une question subsiste concernant la source principale de sécrétion de GAS6 dans le sang. En effet, plusieurs études ont permis de déterminer que GAS6 était exprimé dans une grande variété de cellules comme les macrophages, les cellules étoilées hépatiques, les cellules du système neuronal, les cellules musculaires lisses vasculaires, ect (253-256). Néanmoins, ces études restent dans un contexte *in vitro* et ne permettent pas de déterminer réellement si ces cellules sont la principale provenance de GAS6 sécrété dans la circulation et sont à l'origine des fluctuations des taux sanguins.

Il s'agit d'un défi important à relever et l'une des perspectives intéressantes à investiguer. En parallèle des résultats présentés dans cette thèse, nous avons tenté d'aborder ce point. Des recherches préalables faites dans le laboratoire et d'autres études publiées, démontrant une forte expression transcriptionnelle de *Gas6* et des niveaux élevés de GAS6 dans le surnageant d'ostéoblastes primaires, suggèrent que les ostéoblastes pourraient être une source importante de GAS6 (257,258). Nous avons eu, par la suite, l'opportunité de collaborer avec l'équipe du Dre Reagan sur l'un de ses projets utilisant un modèle de souris (OCN-Cre; iDTR) qui exprime le récepteur de la toxine diphtérique exclusivement dans les cellules exprimant l'ostéocalcine (259). L'ostéocalcine étant majoritairement exprimée dans les ostéoblastes, l'injection de la toxine diphtérique entraîne ainsi une déplétion sélective de ces cellules. Après avoir validé le modèle, nous avons pu mesurer les niveaux de GAS6 dans les sérums de ces souris. Malheureusement, la

déplétion des ostéoblastes n'a entraîné aucun changement des niveaux sériques de GAS6 comparativement aux souris contrôles (données non présentées), suggérant que les ostéoblastes ne sont pas à l'origine du GAS6 circulant. Des expériences de délétions spécifiques de GAS6 dans différents tissus (*Gas6* f/f; Cre) pourraient être à considérer.

Cependant, de cette question en suspens en découle plusieurs interrogations biologiques : il y a-t-il une ou plusieurs sources? Comment est régulée la sécrétion de GAS6? L'action de GAS6 est-elle alors plutôt autocrine ou paracrine dépendamment des tissus qui le sécrètent? Résoudre ces questionnements est un enjeu pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au développement de pathologies comme l'insulino-résistance Dans laquelle nous avons démontré l'implication de GAS6. Ceci pourrait permettre de mieux appréhender les facteurs impliqués dans sa sécrétion mais aussi d'améliorer les traitements déjà en place ou mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La voie de GAS6 et AXL : une potentielle cible thérapeutique contre l'insulino-résistance?

Nous avons pu ainsi déterminer que la voie de signalisation de GAS6 et AXL perturbe la réponse à l'insuline des cellules musculaires ce qui nous permet d'envisager l'inhibition de cette voie comme une nouvelle approche thérapeutique contre l'insulino-résistance musculaire. Par leur rôle dans les processus de prolifération et migration cellulaire, et notamment leur implication dans la promotion et la progression de plusieurs cancers, GAS6 et AXL ont fait l'objet de nombreuses études qui ont permis l'élaboration et la mise au point de plusieurs inhibiteurs spécifiques qui sont analysés actuellement au sein d'études précliniques et cliniques. Plusieurs stratégies sont ainsi possibles, consistant soit à cibler directement GAS6 ou spécifiquement les récepteurs TAM dont AXL.

Par exemple, pour cibler les effets de GAS6 l'utilisation de la warfarine, antagoniste de la vitamine K, pourrait être envisagée pour inhiber la γ -carboxylation de GAS6 nécessaire dans l'activation des TAM (185). En effet, il a été démontré que l'emploi de warfarine permettait d'inhiber les effets de GAS6 sur la prolifération et migration cellulaire de cellules cancéreuses exprimant AXL (260). Néanmoins, l'étendue importante de la famille des protéines dépendantes de la vitamine

K et les différentes fonctions dans lesquelles elles sont impliquées comme le système de coagulation (i.e. prothrombine, facteurs IX, X, etc.) ou encore le métabolisme osseux (i.e. ostéocalcine), n'en fait pas une possibilité de premier choix (261-263). Une autre possibilité pour viser plus spécifiquement GAS6 reste les récepteurs AXL solubles qui sont utilisés comme leurre (*decoy*). Grâce à leur forte affinité, ces derniers se lient au GAS6 circulant, lui empêchant ainsi de se fixer et d'activer les récepteurs présents sur les cellules cibles. Parmi eux, nous retrouvons le AVB-500 (affinité de 150 fM pour GAS6) qui est actuellement en essais cliniques de phase I/II pour le traitement de cancers (264).

Cependant, la majorité des inhibiteurs sont dirigés directement contre AXL, il s'agit notamment d'anticorps monoclonaux ou de petites molécules spécifiques inhibitrices de l'activité kinase. À ce jour, le R428, également nommé bemcentinib, reste l'inhibiteur pharmacologique d'AXL le plus prometteur. Il se trouve dans de nombreux essais cliniques de phase II pour de multiples cancers, comme le cancer du poumon non à petites cellules ou le glioblastome (264). Par ailleurs, dans notre contexte, comme précédemment cité, il a été démontré que son emploi est bénéfique contre la prise de poids des souris nourries sous régime riche en graisses (211).

Il est intéressant d'envisager également la mise en place de nouvelles technologies plus performantes permettant de cibler spécifiquement les cellules d'intérêt exprimant AXL.

Dans cette perspective, l'étude des mécanismes d'action de GAS6 est indispensable. Ainsi, via nos données préliminaires (chapitre 4), nous avons pu mettre en relief un tout nouveau mécanisme moléculaire de GAS6 et des TAM, potentiellement via le récepteur AXL, qui favoriserait la production et la sécrétion de lactate dans les cellules musculaires. Il pourrait être important de prendre en considération ces résultats dans l'élaboration ou le choix des inhibiteurs puisque cela indiquerait une acidification du milieu extracellulaire. Récemment, ce point a été mis en avant dans l'étude du métabolisme des cellules cancéreuses et la conception d'anticorps monoclonaux dits pH-dépendants. En d'autres termes, ces anticorps monoclonaux se lieraient uniquement à leur cible lorsque le pH environnant est acide (pH 6,0-6,8) et n'auraient pas d'effet dans un contexte physiologique (pH 7,2-7,4) (265). Actuellement, un anticorps anti-AXL pH-dépendant est en étude, ce dernier est néanmoins couplé à des agents cytotoxiques comme

l'auristatin E, afin d'induire la mort des cellules cancéreuses (265-266). Il pourrait être envisagé de mettre en place ce même type d'anticorps sans effet cytotoxique.

Cependant, avant de débiter toutes initiatives chez l'humain, dans le cadre de l'insulino-résistance et le développement du DT2, des études préliminaires menées chez l'animal sont bien entendues indispensables. Pour cela, des souris dont l'obésité et l'insulino-résistance auraient été induites par diète riche en graisses pourraient être traitées avec des inhibiteurs spécifiques d'AXL (i.e R428 à doses plus faibles que (211) et la caractérisation phénotypique par tests métaboliques (GTT, ITT, GSIS) permettraient d'évaluer les effets bénéfiques possibles et le potentiel thérapeutique.

CONCLUSION

Pour conclure, les travaux obtenus au cours de mon doctorat, conjuguant données humaines, études *in vivo* chez l'animal, et découvertes de mécanismes moléculaires ont permis de mettre en lumière un tout nouveau rôle de GAS6 et AXL dans la régulation de l'homéostasie glucidique.

Ma thèse a permis d'explorer, pour la toute première fois dans une cohorte canadienne, l'association entre les niveaux circulants de GAS6 et les facteurs de risque du DT2. Il a pu être ainsi démontré que GAS6 corrélait avec une altération de la clairance glucidique. Cette étude ouvre potentiellement la voie vers l'utilisation du dosage du GAS6 sanguin comme biomarqueur de l'intolérance au glucose chez des patientes post-ménopausées en surpoids et obèses. Ceci pourrait permettre leur prise en charge avant toute aggravation pouvant conduire au développement du DT2.

Par la suite, il était indispensable de déterminer si GAS6 était impliqué directement dans l'établissement de désordres métaboliques. La caractérisation phénotypique de souris déficientes ou à l'inverse transgéniques pour GAS6 a ainsi pu affirmer le rôle central de ce dernier dans l'altération de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie glucidique. Ces travaux de recherche ont permis d'élucider des mécanismes moléculaires par lesquels GAS6 agit. Ainsi, nous avons révélé que GAS6, via son récepteur AXL, affecte la réponse à l'insuline dans les cellules musculaires en inhibant les niveaux de phosphorylation et donc d'activation du récepteur à l'insuline (RI) et d'AKT. Nous avons constaté que AXL interagit avec le RI et induit son internalisation en présence d'insuline. De plus, ces travaux révèlent que GAS6 altère le métabolisme des cellules musculaires en augmentant leur capacité glycolytique et l'expression des enzymes de la glycolyse. Ces changements entraînent une élévation des niveaux de lactate, pouvant également induire un dysfonctionnement de la réponse à l'insuline.

Ces travaux de recherche permettent ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de GAS6 et AXL dans le métabolisme et de considérer l'inhibition de cette voie comme potentielle stratégie thérapeutique pour améliorer la sensibilité à l'insuline dans le cas de prédiabète et lutter contre le développement du DT2.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Punthakee Z GR, Katz P. Définition, classification et diagnostic du diabète, du prédiabète et du syndrome métabolique. *Canadian Journal of Diabetes*. 2018.
2. Li JX, and Cummins CL. Fresh insights into glucocorticoid-induced diabetes mellitus and new therapeutic directions. *Nat Rev Endocrinol*. 2022;18(9):540-57.
3. Galicia-Garcia U, Jebari S, Larrea-Sebal A, Uribe KB, Siddiqi H, Ostolaza H, et al. Statin Treatment-Induced Development of Type 2 Diabetes: From Clinical Evidence to Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13).
4. Johns EC, Denison FC, Norman JE, and Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(11):743-54.
5. Broome DT, Pantalone KM, Kashyap SR, and Philipson LH. Approach to the Patient with MODY-Monogenic Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(1):237-50.
6. DiMeglio LA, Evans-Molina C, and Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-62.
7. Taplin CE, and Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41(1):11-8.
8. Pociot F, and Lernmark A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387(10035):2331-9.
9. Lempainen J, Laine AP, Hammias A, Toppari J, Simell O, Veijola R, et al. Non-HLA gene effects on the disease process of type 1 diabetes: From HLA susceptibility to overt disease. *J Autoimmun*. 2015;61:45-53.
10. Rewers M, and Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387(10035):2340-8.
11. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, and Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci*. 2014;11(11):1185-200.
12. Mahajan A, Taliun D, Thurner M, Robertson NR, Torres JM, Rayner NW, et al. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nat Genet*. 2018;50(11):1505-13.
13. Suzuki K, Akiyama M, Ishigaki K, Kanai M, Hosoe J, Shojima N, et al. Identification of 28 new susceptibility loci for type 2 diabetes in the Japanese population. *Nat Genet*. 2019;51(3):379-86.
14. Spracklen CN, Horikoshi M, Kim YJ, Lin K, Bragg F, Moon S, et al. Identification of type 2 diabetes loci in 433,540 East Asian individuals. *Nature*. 2020;582(7811):240-5.
15. Vujkovic M, Keaton JM, Lynch JA, Miller DR, Zhou J, Tcheandjieu C, et al. Discovery of 318 new risk loci for type 2 diabetes and related vascular outcomes among 1.4 million participants in a multi-ancestry meta-analysis. *Nat Genet*. 2020;52(7):680-91.
16. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17).
17. Damm P. Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104 Suppl 1:S25-6.

18. Chatterjee S, Khunti K, and Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2017;389(10085):2239-51.
19. Ahmad E, Lim S, Lamptey R, Webb DR, and Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet*. 2022;400(10365):1803-20.
20. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *JAMA*. 2012;308(11):1150-9.
21. Knott C, Bell S, and Britton A. Alcohol Consumption and the Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of More Than 1.9 Million Individuals From 38 Observational Studies. *Diabetes Care*. 2015;38(9):1804-12.
22. Zhang L, Curhan GC, Hu FB, Rimm EB, and Forman JP. Association between passive and active smoking and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*. 2011;34(4):892-7.
23. Weinmayr G, Hennig F, Fuks K, Nonnemacher M, Jakobs H, Mohlenkamp S, et al. Long-term exposure to fine particulate matter and incidence of type 2 diabetes mellitus in a cohort study: effects of total and traffic-specific air pollution. *Environ Health*. 2015;14:53.
24. Kuo CC, Moon K, Thayer KA, and Navas-Acien A. Environmental chemicals and type 2 diabetes: an updated systematic review of the epidemiologic evidence. *Curr Diab Rep*. 2013;13(6):831-49.
25. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60.
26. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergstrom G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99-103.
27. Honkola A, Forsen T, and Eriksson J. Resistance training improves the metabolic profile in individuals with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 1997;34(4):245-8.
28. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, and Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*. 2020;25(8).
29. Valaiyapathi B, Gower B, and Ashraf AP. Pathophysiology of Type 2 Diabetes in Children and Adolescents. *Curr Diabetes Rev*. 2020;16(3):220-9.
30. Zheng Y, Ley SH, and Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):88-98.
31. Rix I, Nexoe-Larsen C, Bergmann NC, Lund A, and Knop FK. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al. eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA); 2000.
32. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, Carroll RJ, Keim PS, Henrikson RL, et al. Detection and kinetic behavior of proinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(3):1260-4.
33. Furuta M, Carroll R, Martin S, Swift HH, Ravazzola M, Orci L, et al. Incomplete processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of Des-31,32 proinsulin intermediates in islets of mice lacking active PC2. *J Biol Chem*. 1998;273(6):3431-7.

34. Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Madsen O, Perrelet A, Vassalli JD, et al. Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles. *J Cell Biol.* 1986;103(6 Pt 1):2273-81.
35. Giddings SJ, Chirgwin J, and Permutt MA. Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes.* 1982;31(7):624-9.
36. Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ, and Steiner DF. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *J Biol Chem.* 1985;260(25):13590-4.
37. Fu Z, Gilbert ER, and Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9(1):25-53.
38. Wang Z, and Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 7):893-903.
39. Roder PV, Wu B, Liu Y, and Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e219.
40. Gorovits N CM. Modern Metabolic Concepts What We Know about Facilitative Glucose Transporters *Biochemistry and molecular biology education* 2003.
41. Mueckler M, and Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):121-38.
42. Suzuki K, and Kono T. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(5):2542-5.
43. Cushman SW, and Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 1980;255(10):4758-62.
44. Bryant NJ, Govers R, and James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(4):267-77.
45. DeFronzo RA, and Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2(Suppl 2):S157-63.
46. Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, et al. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *J Clin Invest.* 2001;108(1):153-60.
47. Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, and Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem.* 1993;268(30):22243-6.
48. Tsao TS, Burcelin R, Katz EB, Huang L, and Charron MJ. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes.* 1996;45(1):28-36.
49. Shepherd PR, and Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1999;341(4):248-57.
50. Postic C, Leturque A, Rencurel F, Printz RL, Forest C, Granner DK, et al. The effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on GLUT4 and hexokinase II mRNA and protein in rat skeletal muscle and adipose tissue. *Diabetes.* 1993;42(6):922-9.
51. Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesinga JJ, Moritz S, et al. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J Biol Chem.* 1993;268(7):5209-19.

52. Mandarino LJ, Printz RL, Cusi KA, Kinchington P, O'Doherty RM, Osawa H, et al. Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. *Am J Physiol.* 1995;269(4 Pt 1):E701-8.
53. Kruszynska YT, Mulford MI, Baloga J, Yu JG, and Olefsky JM. Regulation of skeletal muscle hexokinase II by insulin in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes.* 1998;47(7):1107-13.
54. Braithwaite SS, Palazuk B, Colca JR, Edwards CW, 3rd, and Hofmann C. Reduced expression of hexokinase II in insulin-resistant diabetes. *Diabetes.* 1995;44(1):43-8.
55. Iynedjian PB, Jotterand D, Nouspikel T, Asfari M, and Pilot PR. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem.* 1989;264(36):21824-9.
56. Parsa R, Decaux JF, Bossard P, Robey BR, Magnuson MA, Granner DK, et al. Induction of the glucokinase gene by insulin in cultured neonatal rat hepatocytes. Relationship with DNase-I hypersensitive sites and functional analysis of a putative insulin-response element. *Eur J Biochem.* 1996;236(1):214-21.
57. Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, et al. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30823-9.
58. Xin Guo HL, Hang Xu, Shihlung Woo, Hui Dong, Fuer Lu, Alex J.Lange, Chaodong Wu. Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2012.
59. Raymondjean M, Vaulont S, Cognet M, Decaux JF, Puzenat N, Bergot MO, et al. Positive and negative regulation of gene expression by insulin and glucagon: the model of L-type pyruvate kinase gene. *Biochimie.* 1991;73(1):41-5.
60. Minakami S, and Yoshikawa H. Studies on erythrocyte glycolysis. II. Free energy changes and rate limiting steps in erythrocyte glycolysis. *J Biochem.* 1966;59(2):139-44.
61. Chhabra M, Prausnitz JM, and Radke CJ. Modeling corneal metabolism and oxygen transport during contact lens wear. *Optom Vis Sci.* 2009;86(5):454-66.
62. Peek CB, Levine DC, Cedernaes J, Taguchi A, Kobayashi Y, Tsai SJ, et al. Circadian Clock Interaction with HIF1alpha Mediates Oxygenic Metabolism and Anaerobic Glycolysis in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 2017;25(1):86-92.
63. Chen YD, Varasteh BB, and Reaven GM. Plasma lactate concentration in obesity and type 2 diabetes. *Diabete Metab.* 1993;19(4):348-54.
64. Avogaro A, Toffolo G, Miola M, Valerio A, Tiengo A, Cobelli C, et al. Intracellular lactate- and pyruvate-interconversion rates are increased in muscle tissue of non-insulin-dependent diabetic individuals. *J Clin Invest.* 1996;98(1):108-15.
65. Del Prato S, Bonadonna RC, Bonora E, Gulli G, Solini A, Shank M, et al. Characterization of cellular defects of insulin action in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1993;91(2):484-94.
66. Adeva-Andany M, Lopez-Ojen M, Funcasta-Calderon R, Ameneiros-Rodriguez E, Donapetry-Garcia C, Vila-Altesor M, et al. Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion.* 2014;17:76-100.

67. MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, et al. Glycogen synthase kinase 3 α -specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab.* 2007;6(4):329-37.
68. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, and Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995;378(6559):785-9.
69. Lee J, and Kim MS. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77 Suppl 1:S49-57.
70. Li Q, Zhao Q, Zhang J, Zhou L, Zhang W, Chua B, et al. The Protein Phosphatase 1 Complex Is a Direct Target of AKT that Links Insulin Signaling to Hepatic Glycogen Deposition. *Cell Rep.* 2019;28(13):3406-22 e7.
71. Azzout-Marniche D, Becard D, Guichard C, Foretz M, Ferre P, and Foufelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J.* 2000;350 Pt 2(Pt 2):389-93.
72. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* 2011;14(1):21-32.
73. Foretz M, Guichard C, Ferre P, and Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12737-42.
74. Claus TH, and Pilkis SJ. Fructose 2,6-bisphosphate levels are elevated in livers of genetically obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;109(3):664-8.
75. Jiang G, and Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E671-8.
76. Reaven GM. Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistant individuals. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005;34(1):49-62.
77. Araujo TG, Oliveira AG, and Saad MJ. Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic Beta cells: a current opinion. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:146.
78. Cavaghan MK, Ehrmann DA, and Polonsky KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J Clin Invest.* 2000;106(3):329-33.
79. Kahn BB. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell.* 1998;92(5):593-6.
80. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet.* 1996;12(1):106-9.
81. Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, and Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell.* 1997;88(4):561-72.

82. Cieniewicz AM, Kirchner T, Hinke SA, Nanjunda R, D'Aquino K, Boayke K, et al. Novel Monoclonal Antibody Is an Allosteric Insulin Receptor Antagonist That Induces Insulin Resistance. *Diabetes*. 2017;66(1):206-17.
83. Vikram A, and Jena G. S961, an insulin receptor antagonist causes hyperinsulinemia, insulin-resistance and depletion of energy stores in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(2):260-5.
84. Corkey BE. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? *Diabetes*. 2012;61(1):4-13.
85. Zhang AMY, Wellberg EA, Kopp JL, and Johnson JD. Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer. *Diabetes Metab J*. 2021;45(3):285-311.
86. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, and Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S262-8.
87. Nolan CJ, and Prentki M. Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(2):118-27.
88. Fryk E, Olausson J, Mossberg K, Strindberg L, Schmelz M, Brogren H, et al. Hyperinsulinemia and insulin resistance in the obese may develop as part of a homeostatic response to elevated free fatty acids: A mechanistic case-control and a population-based cohort study. *EBioMedicine*. 2021;65:103264.
89. Janssen J. Hyperinsulinemia and Its Pivotal Role in Aging, Obesity, Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15).
90. Del Prato S, Leonetti F, Simonson DC, Sheehan P, Matsuda M, and DeFronzo RA. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetologia*. 1994;37(10):1025-35.
91. Marban SL, DeLoia JA, and Gearhart JD. Hyperinsulinemia in transgenic mice carrying multiple copies of the human insulin gene. *Dev Genet*. 1989;10(5):356-64.
92. Templeman NM, Flibotte S, Chik JHL, Sinha S, Lim GE, Foster LJ, et al. Reduced Circulating Insulin Enhances Insulin Sensitivity in Old Mice and Extends Lifespan. *Cell Rep*. 2017;20(2):451-63.
93. Alemzadeh R, Jacobs W, and Pitukcheewanont P. Antiobesity effect of diazoxide in obese Zucker rats. *Metabolism*. 1996;45(3):334-41.
94. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, and Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med*. 1990;322(4):223-8.
95. Koutsari C, and Jensen MD. Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. *J Lipid Res*. 2006;47(8):1643-50.
96. Staehr P, Hother-Nielsen O, Levin K, Holst JJ, and Beck-Nielsen H. Assessment of hepatic insulin action in obese type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001;50(6):1363-70.
97. Boucher J, Kleinridders A, and Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
98. Despres JP, and Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):881-7.

99. Bluher M. Metabolically Healthy Obesity. *Endocr Rev.* 2020;41(3).
100. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, et al. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev.* 2017;38(5):379-431.
101. De Meyts P. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al. eds. *Endotext.* South Dartmouth (MA); 2000.
102. Kim J, Yunn NO, Park M, Kim J, Park S, Kim Y, et al. Functional selectivity of insulin receptor revealed by aptamer-trapped receptor structures. *Nat Commun.* 2022;13(1):6500.
103. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, and Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem.* 1997;272(34):21403-7.
104. Bjornholm M, He AR, Attersand A, Lake S, Liu SC, Lienhard GE, et al. Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia.* 2002;45(12):1697-702.
105. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, and Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem.* 2003;278(28):25323-30.
106. Versteyhe S, Blanquart C, Hampe C, Mahmood S, Christeff N, De Meyts P, et al. Insulin receptor substrates-5 and -6 are poor substrates for the insulin receptor. *Mol Med Rep.* 2010;3(1):189-93.
107. Esposito DL, Li Y, Cama A, and Quon MJ. Tyr(612) and Tyr(632) in human insulin receptor substrate-1 are important for full activation of insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and translocation of GLUT4 in adipose cells. *Endocrinology.* 2001;142(7):2833-40.
108. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature.* 1994;372(6502):182-6.
109. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci.* 2003;23(18):7084-92.
110. Thirone AC, Huang C, and Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(2):72-8.
111. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature.* 1994;372(6502):186-90.
112. Kaburagi Y, Satoh S, Tamemoto H, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Veki K, et al. Role of insulin receptor substrate-1 and pp60 in the regulation of insulin-induced glucose transport and GLUT4 translocation in primary adipocytes. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25839-44.
113. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, et al. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 1996;16(6):3074-84.

114. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998;391(6670):900-4.
115. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*. 2000;49(11):1880-9.
116. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, and Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017;170(4):605-35.
117. Sopasakis VR, Liu P, Suzuki R, Kondo T, Winnay J, Tran TT, et al. Specific roles of the p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab*. 2010;11(3):220-30.
118. Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, et al. Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*. 2008;454(7205):776-9.
119. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 1997;7(4):261-9.
120. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, and Hawkins PT. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol*. 1998;8(12):684-91.
121. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, and Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101.
122. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, and Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*. 2001;276(42):38349-52.
123. Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczyk M, Watanabe T, et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*. 2005;132(13):2943-54.
124. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. 2001;292(5522):1728-31.
125. Sano H, Eguez L, Teruel MN, Fukuda M, Chuang TD, Chavez JA, et al. Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab*. 2007;5(4):293-303.
126. Sun Y, Bilan PJ, Liu Z, and Klip A. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):19909-14.
127. Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, and Klip A. Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(8):597-611.
128. Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, and Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):316-23.
129. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*. 2007;25(6):903-15.
130. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, and Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*. 2002;10(1):151-62.

131. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, and Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(9):648-57.
132. Magnuson B, Ekim B, and Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012;441(1):1-21.
133. Owen JL, Zhang Y, Bae SH, Farooqi MS, Liang G, Hammer RE, et al. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):16184-9.
134. Green CJ, Goransson O, Kular GS, Leslie NR, Gray A, Alessi DR, et al. Use of Akt inhibitor and a drug-resistant mutant validates a critical role for protein kinase B/Akt in the insulin-dependent regulation of glucose and system A amino acid uptake. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27653-67.
135. Lochhead PA, Coghlan M, Rice SQ, and Sutherland C. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes.* 2001;50(5):937-46.
136. Manning BD, and Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
137. Saltiel AR. Insulin signaling in health and disease. *J Clin Invest.* 2021;131(1).
138. Li X, Monks B, Ge Q, and Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1alpha transcription coactivator. *Nature.* 2007;447(7147):1012-6.
139. Chakrabarti P, and Kandror KV. FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13296-300.
140. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, et al. Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6286-96.
141. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, and Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med.* 2020;19(3):1997-2007.
142. Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20801-7.
143. Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, et al. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes.* 2005;54(2):402-11.
144. Carpentier JL, Paccaud JP, Backer J, Gilbert A, Orci L, Kahn CR, et al. Two steps of insulin receptor internalization depend on different domains of the beta-subunit. *J Cell Biol.* 1993;122(6):1243-52.
145. Fagerholm S, Ortegren U, Karlsson M, Ruishalme I, and Stralfors P. Rapid insulin-dependent endocytosis of the insulin receptor by caveolae in primary adipocytes. *PLoS One.* 2009;4(6):e5985.
146. Hall C, Yu H, and Choi E. Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Exp Mol Med.* 2020;52(6):911-20.

147. Choi E, Kikuchi S, Gao H, Brodzik K, Nassour I, Yopp A, et al. Mitotic regulators and the SHP2-MAPK pathway promote IR endocytosis and feedback regulation of insulin signaling. *Nat Commun.* 2019;10(1):1473.
148. Najjar SM, and Perdomo G. Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. *Physiology (Bethesda).* 2019;34(3):198-215.
149. Kimura A, Mora S, Shigematsu S, Pessin JE, and Saltiel AR. The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30153-8.
150. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(8):513-25.
151. DeAngelis AM, Heinrich G, Dai T, Bowman TA, Patel PR, Lee SJ, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1: a link between insulin and lipid metabolism. *Diabetes.* 2008;57(9):2296-303.
152. Ghadieh HE, Russo L, Muturi HT, Ghanem SS, Manaserh IH, Noh HL, et al. Hyperinsulinemia drives hepatic insulin resistance in male mice with liver-specific Ceacam1 deletion independently of lipolysis. *Metabolism.* 2019;93:33-43.
153. Jochen AL, Berhanu P, and Olefsky JM. Insulin internalization and degradation in adipocytes from normal and type II diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;62(2):268-74.
154. Trischitta V, Brunetti A, Chiavetta A, Benzi L, Papa V, and Vigneri R. Defects in insulin-receptor internalization and processing in monocytes of obese subjects and obese NIDDM patients. *Diabetes.* 1989;38(12):1579-84.
155. Choi E, Zhang X, Xing C, and Yu H. Mitotic Checkpoint Regulators Control Insulin Signaling and Metabolic Homeostasis. *Cell.* 2016;166(3):567-81.
156. Soll AH, Kahn CR, and Neville DM, Jr. Insulin binding to liver plasma membranes in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse. Demonstration of a decreased number of functionally normal receptors. *J Biol Chem.* 1975;250(12):4702-7.
157. Kadowaki H, Kadowaki T, Cama A, Marcus-Samuels B, Rovira A, Bevins CL, et al. Mutagenesis of lysine 460 in the human insulin receptor. Effects upon receptor recycling and cooperative interactions among binding sites. *J Biol Chem.* 1990;265(34):21285-96.
158. Xu E, Schwab M, and Marette A. Role of protein tyrosine phosphatases in the modulation of insulin signaling and their implication in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(1):79-97.
159. Egawa K, Maegawa H, Shimizu S, Morino K, Nishio Y, Bryer-Ash M, et al. Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in I6 myocytes and Fao hepatoma cells. *J Biol Chem.* 2001;276(13):10207-11.
160. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science.* 1999;283(5407):1544-8.
161. Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, et al. The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature.* 2001;409(6816):92-7.
162. Wong JT, Kim PT, Peacock JW, Yau TY, Mui AL, Chung SW, et al. Pten (phosphatase and tensin homologue gene) haploinsufficiency promotes insulin hypersensitivity. *Diabetologia.* 2007;50(2):395-403.

163. Kagawa S, Soeda Y, Ishihara H, Oya T, Sasahara M, Yaguchi S, et al. Impact of transgenic overexpression of SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2 on glucose metabolism and insulin signaling in mice. *Endocrinology*. 2008;149(2):642-50.
164. Andreozzi F, Procopio C, Greco A, Mannino GC, Miele C, Raciti GA, et al. Increased levels of the Akt-specific phosphatase PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP)-1 in obese participants are associated with insulin resistance. *Diabetologia*. 2011;54(7):1879-87.
165. Galbo T, Olsen GS, Quistorff B, and Nishimura E. Free fatty acid-induced PP2A hyperactivity selectively impairs hepatic insulin action on glucose metabolism. *PLoS One*. 2011;6(11):e27424.
166. Kowluru A, and Matti A. Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipototoxicity and diabetes: potential mechanisms and functional consequences. *Biochem Pharmacol*. 2012;84(5):591-7.
167. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 2000;287(5453):664-6.
168. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140(6):900-17.
169. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-6.
170. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001;293(5535):1673-7.
171. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
172. Petersen MC, Madiraju AK, Gassaway BM, Marcel M, Nasiri AR, Butrico G, et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4361-71.
173. Copps KD, and White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2012;55(10):2565-82.
174. Powell DJ, Hajduch E, Kular G, and Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*. 2003;23(21):7794-808.
175. Tremblay F, Brule S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, et al. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(35):14056-61.
176. Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, and White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*. 2002;277(44):42394-8.
177. Holt LJ, and Siddle K. Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action--and more? *Biochem J*. 2005;388(Pt 2):393-406.
178. Schneider C, King RM, and Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*. 1988;54(6):787-93.

179. Thorp E, Vaisar T, Subramanian M, Mautner L, Blobel C, and Tabas I. Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase Cdelta, and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *J Biol Chem*. 2011;286(38):33335-44.
180. Miller MA, Oudin MJ, Sullivan RJ, Wang SJ, Meyer AS, Im H, et al. Reduced Proteolytic Shedding of Receptor Tyrosine Kinases Is a Post-Translational Mechanism of Kinase Inhibitor Resistance. *Cancer Discov*. 2016;6(4):382-99.
181. Lemke G, and Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):327-36.
182. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(47):30022-7.
183. Di Stasi R, De Rosa L, and D'Andrea LD. Therapeutic aspects of the Axl/Gas6 molecular system. *Drug Discov Today*. 2020;25(12):2130-48.
184. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, and Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol*. 2007;178(9):5635-42.
185. Geng K, Kumar S, Kimani SG, Kholodovych V, Kasikara C, Mizuno K, et al. Requirement of Gamma-Carboxyglutamic Acid Modification and Phosphatidylserine Binding for the Activation of Tyro3, Axl, and Mertk Receptors by Growth Arrest-Specific 6. *Front Immunol*. 2017;8:1521.
186. Tsou WI, Nguyen KQ, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25750-63.
187. Kasikara C, Kumar S, Kimani S, Tsou WI, Geng K, Davra V, et al. Phosphatidylserine Sensing by TAM Receptors Regulates AKT-Dependent Chemoresistance and PD-L1 Expression. *Mol Cancer Res*. 2017;15(6):753-64.
188. Zagorska A, Traves PG, Lew ED, Dransfield I, and Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol*. 2014;15(10):920-8.
189. Bellosta P, Costa M, Lin DA, and Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol*. 1995;15(2):614-25.
190. Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov VA, and Berk BC. Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2004;279(27):28766-70.
191. Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, and Lauffenburger DA. The receptor AXL diversifies EGFR signaling and limits the response to EGFR-targeted inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *Sci Signal*. 2013;6(287):ra66.
192. Axelrod H, and Pienta KJ. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget*. 2014;5(19):8818-52.
193. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 2001;7(2):215-21.

194. Goruppi S, Ruaro E, and Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1996;12(3):471-80.
195. Bellido-Martin L, and de Frutos PG. Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitam Horm*. 2008;78:185-209.
196. Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, and Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(3):H1207-13.
197. Yanagita M, Arai H, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Fukatsu A, et al. Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42364-9.
198. Allen MP, Linseman DA, Udo H, Xu M, Schaack JB, Varnum B, et al. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 2002;22(2):599-613.
199. Wu G, Ma Z, Hu W, Wang D, Gong B, Fan C, et al. Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy. *Cell Death Dis*. 2017;8(3):e2700.
200. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, and Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 2005;204(1):36-44.
201. Ammoun S, Provenzano L, Zhou L, Barczyk M, Evans K, Hilton DA, et al. Axl/Gas6/NFkappaB signalling in schwannoma pathological proliferation, adhesion and survival. *Oncogene*. 2014;33(3):336-46.
202. Lee Y, Lee M, and Kim S. Gas6 induces cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of MAPK and Slug. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;434(1):8-14.
203. Abu-Thuraia A, Gauthier R, Chidiac R, Fukui Y, Screatton RA, Gratton JP, et al. Axl phosphorylates Elmo scaffold proteins to promote Rac activation and cell invasion. *Mol Cell Biol*. 2015;35(1):76-87.
204. Goyette MA, and Cote JF. AXL Receptor Tyrosine Kinase as a Promising Therapeutic Target Directing Multiple Aspects of Cancer Progression and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3).
205. Loges S, Schmidt T, Tjwa M, van Geyte K, Lievens D, Lutgens E, et al. Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood*. 2010;115(11):2264-73.
206. Lemke G, and Burstyn-Cohen T. TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1209:23-9.
207. Myers KV, Amend SR, and Pienta KJ. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2019;18(1):94.
208. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Traves PG, Burrola PG, Hash JC, and Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron*. 2012;76(6):1123-32.
209. O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell*. 2007;131(6):1039-41.

210. Augustine KA, Rossi RM, Van G, Housman J, Stark K, Danilenko D, et al. Noninsulin-dependent diabetes mellitus occurs in mice ectopically expressing the human Axl tyrosine kinase receptor. *J Cell Physiol.* 1999;181(3):433-47.
211. Lijnen HR, Christiaens V, and Scroyen L. Growth arrest-specific protein 6 receptor antagonism impairs adipocyte differentiation and adipose tissue development in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337(2):457-64.
212. Maquoi E, Voros G, Carmeliet P, Collen D, and Lijnen HR. Role of Gas-6 in adipogenesis and nutritionally induced adipose tissue development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):1002-7.
213. Fourcot A, Couchie D, Chobert MN, Zafrani ES, Mavier P, Laperche Y, et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(6):G1043-53.
214. Lafdil F, Chobert MN, Deveaux V, Zafrani ES, Mavier P, Nakano T, et al. Growth arrest-specific protein 6 deficiency impairs liver tissue repair after acute toxic hepatitis in mice. *J Hepatol.* 2009;51(1):55-66.
215. Tutusaus A, de Gregorio E, Cucarull B, Cristobal H, Areste C, Graupera I, et al. A Functional Role of GAS6/TAM in Nonalcoholic Steatohepatitis Progression Implicates AXL as Therapeutic Target. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9(3):349-68.
216. Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Shieh YS, Hsieh CH, et al. Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E267-74.
217. Wheeler E, Leong A, Liu CT, Hivert MF, Strawbridge RJ, Podmore C, et al. Impact of common genetic determinants of Hemoglobin A1c on type 2 diabetes risk and diagnosis in ancestrally diverse populations: A transethnic genome-wide meta-analysis. *PLoS Med.* 2017;14(9):e1002383.
218. Nag A, Dhindsa RS, Mitchell J, Vasavda C, Harper AR, Vitsios D, et al. Human genetics uncovers MAP3K15 as an obesity-independent therapeutic target for diabetes. *Sci Adv.* 2022;8(46):eadd5430.
219. Lee CH, Chu NF, Shieh YS, and Hung YJ. The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;95(2):201-6.
220. Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Chen YD, Shieh YS, et al. Effect of GAS6 and AXL Gene Polymorphisms on Adiposity, Systemic Inflammation, and Insulin Resistance in Adolescents. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:674069.
221. Abdul-Ghani MA, and DeFronzo RA. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:476279.
222. Sylow L, Tokarz VL, Richter EA, and Klip A. The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metab.* 2021;33(4):758-80.
223. Schott C, Germain A, Lacombe J, Faubert D, Boulais J, Côté JF and Ferron M. GAS6 regulates glucose metabolism by inhibiting insulin receptor signaling *In preparation.*
224. Lacombe J, Rishavy MA, Berkner KL, and Ferron M. VKOR paralog VKORC1L1 supports vitamin K-dependent protein carboxylation in vivo. *JCI Insight.* 2018;3(1).

227. Crawford SO, Hoogeveen RC, Brancati FL, Astor BC, Ballantyne CM, Schmidt MI, et al. Association of blood lactate with type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Int J Epidemiol*. 2010;39(6):1647-55.
228. Simoneau JA, and Kelley DE. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol (1985)*. 1997;83(1):166-71.
229. Hung YJ, Lee CH, Chu NF, and Shieh YS. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1840-4.
230. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, and Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
231. Dihingia A, Ozah D, Borah T, Kalita J, and Manna P. Gamma-glutamyl-carboxylated Gas6 mediates positive role of vitamin K on lowering hyperglycemia in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1462(1):104-17.
232. Brochu M, Malita MF, Messier V, Doucet E, Strychar I, Lavoie JM, et al. Resistance training does not contribute to improving the metabolic profile after a 6-month weight loss program in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(9):3226-33.
233. Varlamov O, Bethea CL, and Roberts CT, Jr. Sex-specific differences in lipid and glucose metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:241.
234. Yan H, Yang W, Zhou F, Li X, Pan Q, Shen Z, et al. Estrogen Improves Insulin Sensitivity and Suppresses Gluconeogenesis via the Transcription Factor Foxo1. *Diabetes*. 2019;68(2):291-304.
235. Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, Ogasawara T, Takato T, Kumegawa M, et al. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7376-82.
236. Mo R, Tony Zhu Y, Zhang Z, Rao SM, and Zhu YJ. GAS6 is an estrogen-inducible gene in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;353(1):189-94.
192. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 2001;7(2):215-21.
213. Fourcot A, Couchie D, Chobert MN, Zafrani ES, Mavier P, Laperche Y, et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(6):G1043-53.
237. Tjwa M, Bellido-Martin L, Lin Y, Lutgens E, Plaisance S, Bono F, et al. Gas6 promotes inflammation by enhancing interactions between endothelial cells, platelets, and leukocytes. *Blood*. 2008;111(8):4096-105.
238. Cheng LC, Chen YL, Cheng AN, Lee AY, Cho CY, Huang JS, et al. AXL phosphorylates and up-regulates TNS2 and its implications in IRS-1-associated metabolism in cancer cells. *J Biomed Sci*. 2018;25(1):80.
239. Hafizi S, Alindri F, Karlsson R, and Dahlback B. Interaction of Axl receptor tyrosine kinase with C1-TEN, a novel C1 domain-containing protein with homology to tensin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;299(5):793-800.

240. Koh A, Lee MN, Yang YR, Jeong H, Ghim J, Noh J, et al. C1-Ten is a protein tyrosine phosphatase of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), regulating IRS-1 stability and muscle atrophy. *Mol Cell Biol.* 2013;33(8):1608-20.
241. Jeong H, Koh A, Lee J, Park D, Lee JO, Lee MN, et al. Inhibition of C1-Ten PTPase activity reduces insulin resistance through IRS-1 and AMPK pathways. *Sci Rep.* 2017;7(1):17777.
242. Chen Y, Huang L, Qi X, and Chen C. Insulin Receptor Trafficking: Consequences for Insulin Sensitivity and Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20).
243. Ceresa BP, Kao AW, Santeler SR, and Pessin JE. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):3862-70.
244. Liberti MV, and Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):211-8.
245. Bruce SF, Cho K, Noia H, Lomonosova E, Stock EC, Opl A, et al. GAS6-AXL Inhibition by AVB-500 Overcomes Resistance to Paclitaxel in Endometrial Cancer by Decreasing Tumor Cell Glycolysis. *Mol Cancer Ther.* 2022;21(8):1348-59.
246. Tian M, Chen XS, Li LY, Wu HZ, Zeng D, Wang XL, et al. Inhibition of AXL enhances chemosensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin via decreasing glycolysis. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(7):1180-9.
247. Ruan GX, and Kazlauskas A. Lactate engages receptor tyrosine kinases Axl, Tie2, and vascular endothelial growth factor receptor 2 to activate phosphoinositide 3-kinase/Akt and promote angiogenesis. *J Biol Chem.* 2013;288(29):21161-72.
248. Schilperoort M, Ngai D, Katerelos M, Power DA, and Tabas I. PFKFB2-mediated glycolysis promotes lactate-driven continual efferocytosis by macrophages. *Nat Metab.* 2023.
249. Ekman C, Linder A, Akesson P, and Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care.* 2010;14(4):R158.
250. Choi CS, Kim YB, Lee FN, Zabolotny JM, Kahn BB, and Youn JH. Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impairing insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(2):E233-40.
251. Maschari D, Saxena G, Law TD, Walsh E, Campbell MC, and Consitt LA. Lactate-induced lactylation in skeletal muscle is associated with insulin resistance in humans. *Front Physiol.* 2022;13:951390.
252. Hayata H, Miyazaki H, Niisato N, Yokoyama N, and Marunaka Y. Lowered extracellular pH is involved in the pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(1):170-4.
253. Nepal S, Tirupathi C, Tsukasaki Y, Farahany J, Mittal M, Rehman J, et al. STAT6 induces expression of Gas6 in macrophages to clear apoptotic neutrophils and resolve inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(33):16513-8.
254. Clauser S, Meilhac O, Bieche I, Raynal P, Bruneval P, Michel JB, et al. Increased secretion of Gas6 by smooth muscle cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost.* 2012;107(1):140-9.

255. Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, Joannas L, Menendez A, Garcia-Ruiz C, et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J Hepatol*. 2015;63(3):670-8.
256. Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, et al. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci*. 1996;16(6):2012-9.
257. Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, Ziegler AM, Havens AM, Jung Y, et al. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia*. 2010;12(2):116-27.
258. Shiozawa Y, Pedersen EA, and Taichman RS. GAS6/Mer axis regulates the homing and survival of the E2A/PBX1-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in the bone marrow niche. *Exp Hematol*. 2010;38(2):132-40.
259. Fairfield H, Costa S, DeMambro V, Schott C, Martins JDS, Ferron M, et al. Targeting Bone Cells During Sexual Maturation Reveals Sexually Dimorphic Regulation of Endochondral Ossification. *JBMR Plus*. 2020;4(11):e10413.
260. Kirane A, Ludwig KF, Sorrelle N, Haaland G, Sandal T, Ranaweera R, et al. Warfarin Blocks Gas6-Mediated Axl Activation Required for Pancreatic Cancer Epithelial Plasticity and Metastasis. *Cancer Res*. 2015;75(18):3699-705.
261. Lacombe J, and Ferron M. Gamma-carboxylation regulates osteocalcin function. *Oncotarget*. 2015;6(24):19924-5.
262. Furie B, and Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*. 1988;53(4):505-18.
263. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, and Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(7):2730-3.
264. Tanaka M, and Siemann DW. Therapeutic Targeting of the Gas6/Axl Signaling Pathway in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18).
265. Mangeata T GM, Martineaud P, Robertc B. Strategies of tumor-specific targeting based on the antigenic tumor specificities and the tumor microenvironment characteristics. 2020.
266. Short JM CH, Frey G. Anti-Axl antibodies, antibody fragments and their immunoconjugates and uses thereof field of the disclosure. 2017.

ANNEXES

Les figures de l'introduction de cette thèse ont été réalisées par l'étudiante.