



HAL
open science

Les inhibiteurs du goût sucré : perspectives thérapeutiques

Maud Sigoillot, Anni Laffitte, Fabrice Neiers, Loïc Briand

► To cite this version:

Maud Sigoillot, Anni Laffitte, Fabrice Neiers, Loïc Briand. Les inhibiteurs du goût sucré : perspectives thérapeutiques. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 2015, 50 (5), pp.252-261. 10.1016/j.cnd.2015.02.003 . hal-01297018

HAL Id: hal-01297018

<https://hal.science/hal-01297018v1>

Submitted on 13 Nov 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Les inhibiteurs du goût sucré : perspectives thérapeutiques

Maud Sigoillot, Anni Laffitte, Fabrice Neiers, Loïc Briand*

INRA UMR1324, CNRS UMR6265, université de Bourgogne, centre des sciences du goût et de l'alimentation, 17, rue Sully, BP 86510, 21000 Dijon, France

Cette mise au point résume et discute des connaissances actuelles concernant le rôle physiologique du récepteur du goût sucré (T1R2/T1R3) ainsi que les potentielles perspectives thérapeutiques résultant de son inhibition. En dehors de la bouche, l'expression fonctionnelle du récepteur au goût sucré a également été décrite dans de nombreux autres tissus, où il a été proposé qu'il puisse participer à la régulation des processus métaboliques. Parmi ces organes, nous pouvons citer l'intestin, le pancréas, la vessie, le cerveau, mais aussi les tissus osseux et adipeux. Dans l'intestin, il a été montré que le récepteur T1R2/T1R3 est impliqué dans la détection de glucose luminal, la libération de cytokines ainsi que de certaines hormones de satiété, l'expression de transporteurs de glucose et enfin, le maintien de l'homéostasie du glucose. Très récemment, il a été proposé que le récepteur du goût sucré soit impliqué dans la régulation de l'adipogenèse et la régulation des fonctions biologiques des os. Dans cette mise au point, nous allons résumer les connaissances sur différents inhibiteurs du goût sucré, tels que l'acide gymnémique, l'inhibiteur protéique appelé gurmarine ou le lactisole. Leur mécanisme d'action sur le récepteur sera discuté. L'identification de nouveaux rôles du récepteur du goût sucré relance l'intérêt de moduler son activité via des inhibiteurs et ouvrent des perspectives potentielles intéressantes notamment concernant le traitement de l'obésité et certaines maladies métaboliques telles que le diabète et l'hyperlipidémie.

Introduction

L'obésité et le surpoids ont atteint des proportions endémiques dans les pays industrialisés et en voie de développement. Cette surcharge pondérale est très souvent associée à des perturbations majeures du métabolisme pouvant conduire à un diabète de type 2, de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires. Bien que la diminution d'activité physique liée à l'évolution de notre mode de vie soit en grande partie responsable de l'obésité, la consommation accrue d'aliments riches en énergie, à teneur élevée en sucre et en matière grasse saturée y contribue également pour une grande part. La détection des composés sucrés nous permet d'identifier des nutriments riches en énergie et est à l'origine d'une forte valence hédonique positive. Dans les années 2000, une des découvertes majeures en nutrition humaine a été l'identification du récepteur au goût sucré [1–3]. Tous les composés sucrés, incluant les sucres, les édulcorants synthétiques ou naturels non caloriques et les protéines au goût sucré, sont détectés via l'activation de ce récepteur [4,5]. De nombreux travaux réalisés sur le récepteur au goût sucré ont révélé la présence de multiples sites de liaison pour les composés sucrés [6–16]. En revanche, la recherche ou l'identification de composés inhibiteurs spécifiques du goût sucré a jusqu'à ce jour fait l'objet de beaucoup moins d'attention.

De façon surprenante, après leur découverte dans les bourgeons du goût, la présence du récepteur du goût sucré, T1R2/T1R3, a été mis en évidence dans une variété importante d'organes [17]. Bien que le rôle physiologique du récepteur T1R2/T1R3 reste à établir dans de nombreux tissus, il a été démontré que dans le pancréas et dans les tissus du tractus gastro-intestinal, le récepteur du goût sucré est impliqué dans la détection du glucose, dans la régulation de l'expression d'un co-transporteur sodium-glucose et dans le maintien de l'homéostasie glucidique [18–20]. Ce nouveau rôle du récepteur du goût sucré dans la détection du glucose a renouvelé l'intérêt de la modulation de ce récepteur par des composés inhibiteurs [19,21].

Cet article après avoir présenté le récepteur du goût sucré et ses fonctions physiologiques dans divers organes

fera le point sur les inhibiteurs du goût sucré et leurs perspectives thérapeutiques. Ces composés peuvent constituer une nouvelle voie thérapeutique pour réduire le contenu calorique des aliments, traiter l'obésité et certaines maladies métaboliques dont le diabète de type 2.

Structure et fonction du récepteur au goût sucré

Le rôle physiologique du goût est de permettre la détection de nutriments clés avant leur ingestion. Parmi les cinq saveurs primaires (sucré, umami, amer, salé et acide), le goût sucré constitue l'un des principaux déterminants qui guide nos choix alimentaires [22]. Le goût sucré signale la présence de nutriments, riches en énergie (les glucides) et influence fortement notre comportement alimentaire.

Dans la cavité orale, les substances sucrées présentes dans la nourriture ingérée se dissolvent dans la salive et stimulent certaines cellules sensorielles des bourgeons gustatifs via l'activation de détecteurs présents à la surface de leur extrémité apicale. La découverte d'un récepteur unique capable de détecter la très grande variété structurale de molécule au goût sucré a été réalisée au début des années 2000 [2,23,24]. Ce récepteur est composé de l'association de deux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) distincts appelés T1R2 (type 1, membre 2) et T1R3 (type 1, membre 3). De plus, il a été montré que la sous-unité T1R3 possède la capacité de s'assembler pour former l'homodimère T1R3/T1R3 qui est sensible aux monosaccharides et disaccharides (glucose, fructose et saccharose), mais uniquement lorsqu'ils sont présents à forte concentration [25–27]. De façon intéressante, il a été montré que la sous-unité T1R3 est capable de s'assembler avec la sous-unité T1R1 pour former le récepteur du goût umami appelé T1R1/T1R3 [28]. Le goût umami correspond à la sensation générée par certains acides aminés tels que le L-glutamate et le L-aspartate. Cette saveur révèle la présence d'aliments riches en protéine comme la viande, le fromage ou le poisson. Les sous-unités T1R1, T1R2, et T1R3 appartiennent à la petite famille des RCPG de classe C. Cette famille de

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : loic.briand@dijon.inra.fr (L. Briand).

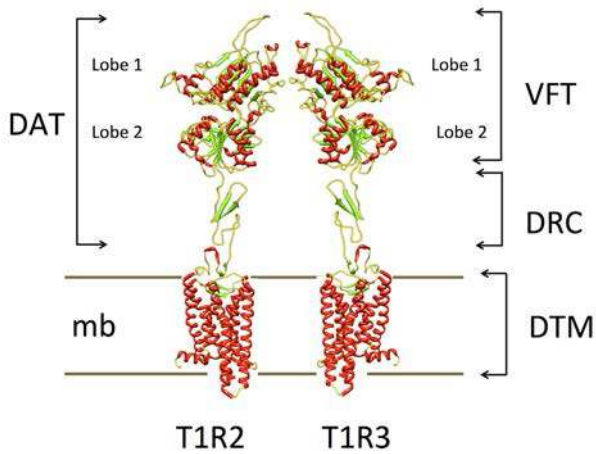


Figure 1. Modèle schématique du récepteur au goût sucré. Le récepteur au goût sucré est composé de deux sous-unités appelées T1R2 et T1R3. Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G de classe C. Les récepteurs de cette classe partagent une architecture commune comprenant un domaine amino-terminal (DAT) de grande taille (environ 550 résidus d'acides aminés). Ce DAT contient un domaine *Venus flytrap* (VFT) et un domaine riche en cystéines (DRC) de petite taille, qui permet de relier le VFT au domaine à sept hélices transmembranaires. Le VFT de T1R2 est composé de deux lobes (lobe 1 et lobe 2) séparés par une large fente qui constitue le site primaire de liaison des molécules sucrées. Les structures secondaires en hélices sont représentées en rouge alors que les structures secondaires en feuillets sont indiquées en vert. La membrane (mb) plasmique est schématisée par deux traits.

récepteurs partage une architecture commune, comprenant un domaine amino-terminal (DAT) de grande taille (environ 550 résidus d'acides aminés). Ce DAT contient un domaine *Venus flytrap* (VFT) et un petit domaine riche en cystéines (DRC), qui relie le VFT au domaine à sept hélices transmembranaires, caractéristique des RCPG (Fig. 1).

Bien que les récepteurs T1R soient hautement conservés, des études de comportement ont révélé des différences de perception du sucré selon les espèces animales. Par exemple, les édulcorants artificiels tels que l'aspartame, le cyclamate ou la néohesperidine dihydrochalcone, ou bien certaines protéines au goût sucré telles que la brazzéine, la monelline et la thaumatine, ne sont pas perçues comme sucrées par les rongeurs [2]. En utilisant des récepteurs chimères homme/rongeur T1R2/T1R3 [16,25], il a été montré que le récepteur au goût sucré contient au moins 3 sites de liaison pour les composés sucrés (Fig. 2).

Si les tests cellulaires et des études conduites sur des souris *knockout* (KO) ont montré que T1R2/T1R3 constitue le récepteur unique du goût sucré, des travaux réalisés sur souris KO, dans lesquelles le gène codant T1R3 est invalidé, ont suggéré l'existence d'un détecteur supplémentaire des sucres naturels à haute concentration [25]. Les principaux acteurs de la cascade de transduction du goût sucré (Fig. 3) ont été identifiés depuis plusieurs années [17,25].

La liaison de composés sucrés sur le récepteur T1R2/T1R3 entraîne la dissociation de la protéine G hétérotrimérique (α -gustducine, G β 3 et G γ 13), conduisant à une augmentation de l'activité de la phospholipase C- β 2 (PLC- β 2) qui résulte en l'activation du récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$) de type 3 qui entraîne un relargage de Ca $^{2+}$ présent dans des stocks intracellulaires et à l'ouverture de canaux ioniques voltage-dépendants, appelés TRPM5 [29]. Ce mécanisme de transduction, qui est commun à la détection des molécules sucrées, umami et amères, conduit à la dépolarisation membranaire générant ainsi, un potentiel d'action conduisant à la libération d'ATP comme neuromédiateur pour activer les nerfs gustatifs afférents. Des études comportementales et électrophysiologiques ont montré que des souris KO, dans lesquelles l' α -gustducine (un membre de la famille des protéines G α_i) est invalidée, présentent un déficit de détection des composés au goût sucré, umami et amer [30].

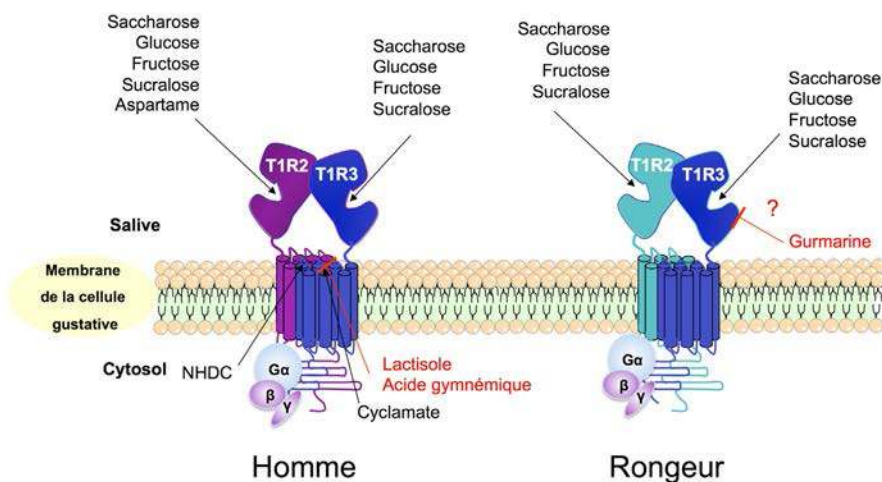


Figure 2. Présence sur le récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 de multiples sites de liaison pour les molécules sucrées et les inhibiteurs. Le domaine amino-terminal de T1R2 est le principal site de liaison des sucres naturels (saccharose, glucose, fructose) et de certains édulcorants tels que le sucralose ou l'aspartame. Il a aussi été montré que le domaine amino-terminal de T1R3 est capable de lier les sucres naturels et le sucralose avec une plus faible affinité que T1R2. Le domaine transmembranaire de T1R3 est capable de lier certains édulcorants comme le cyclamate et la néohesperidine dihydrochalcone (NHDC). Le site de liaison des inhibiteurs, tels que lactisole et de l'acide gymnémique (en rouge) a été localisé au niveau du domaine transmembranaire de T1R3 alors le site de liaison de la gurmarine sur le récepteur de rongeur T1R2/T1R3 est jusqu'à ce jour inconnu.

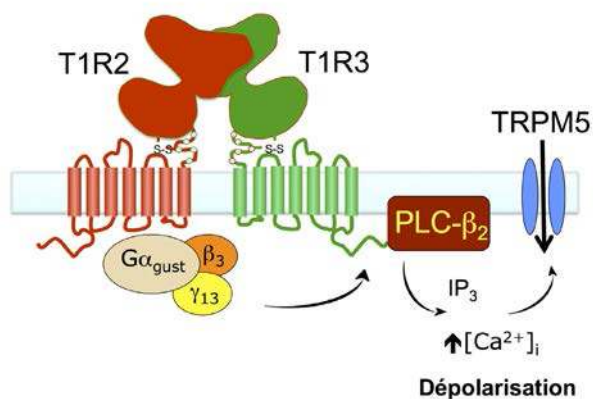


Figure 3. Principaux acteurs de la cascade de transduction impliqués dans la perception des molécules sucrées. L'activation du récepteur T1R2/T1R3 suite à la liaison d'un composé sucré entraîne la dissociation de la protéine G hétérotrimérique (α -gustducine, β_3 et γ_{13}), conduisant à une augmentation de l'activité de la phospholipase C- β_2 (PLC- β_2) qui génère une augmentation d'inositol triphosphate (IP $_3$) à l'origine d'un relargage de Ca $^{2+}$ intracellulaire [Ca $^{2+}$] $_i$. Cette augmentation de Ca $^{2+}$ intracellulaire est à l'origine de l'ouverture de canaux ioniques voltage-dépendants, appelés TRPM5.

Inhibiteurs du récepteur au goût sucré

Contrairement aux molécules sucrées dont le nombre répertorié est très important, le nombre d'inhibiteurs du goût sucré connus à ce jour reste très restreint [31]. L'inhibiteur du goût sucré le plus étudié est le lactisole (Fig. 4a). Cette molécule isolée à partir de grains de café torréfiés, inhibe le goût sucré chez l'être humain mais n'a pas d'effet chez les rongeurs [32,33]. Le lactisole est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire afin de diminuer la sensation sucrée dans des produits très riches en sucre comme les pâtes à tartiner. Le lactisole inhibe la plupart des composés sucrés mais n'a pas ou peu d'effet sur la thaumatine, la néohesperidine dihydrochalcone (NHDC) et l'acide glycyrrhizique [34]. L'utilisation de récepteurs chimères rat/humain combinée à la mutagenèse dirigée [35] a permis l'identification du site de liaison du lactisole au niveau du domaine transmembranaire de T1R3 (Fig. 2). D'autres inhibiteurs du goût sucré sont connus mais leur mécanisme d'action reste inconnu à ce jour. Le sulfate de zinc (ZnSO $_4$) a été décrit comme étant un inhibiteur spécifique des goûts sucré et amer [36]. Des tests psychophysiques rapportent qu'une forte concentration (500mM) en sulfate de magnésium (MgSO $_4$) inhibe le goût sucré du saccharose, de la saccharine, de l'aspartame et du cyclamate [37].

Quelques inhibiteurs du goût sucré provenant de plantes ont également été identifiés, comme par exemple l'hodulcine (Fig. 4a) issue de *Hovenia dulcis* [38], l'acide gymnémique isolé de la liane appelée *Gymnema sylvestris* R. Br. (*G. sylvestris*) [39] et la ziziphine extraite des feuilles du jujubier (*Ziziphus jujube*) [40] qui présente une homologie de structure avec l'édulcorant néohesperidine dihydrochalcone. L'acide gymnémique (Fig. 4a) est la molécule inhibitrice la plus étudiée parmi ces molécules naturellement produites par les plantes. L'acide gymnémique est constitué d'un mélange de composés acides extrait des feuilles du *G. sylvestris*. L'inhibition du goût sucré par cet ensemble de molécules a été montrée pour l'homme et le chimpanzé [41–43]. Par contre, l'acide gymnémique n'a

pas d'effet chez le rat, le porc ou le lapin. Récemment, le site de liaison de l'acide gymnémique a été localisé au niveau du domaine transmembranaire du récepteur humain T1R3 [44]. La liaison de l'acide gymnémique implique les mêmes résidus d'acides aminés que ceux engagés dans la liaison du lactisole suggérant que la détection de la plupart des molécules au goût sucré peut être bloquée par un effet allostérique.

Par ailleurs, il existe des similitudes structurales entre certains médicaments appelés fibrates et le lactisole [31]. Les fibrates sont des molécules utilisées dans le traitement de nombreuses formes d'hyperlipidémie. Certains de ces composés ont également un effet sur la glycémie et la résistance à l'insuline [45]. Il est intéressant de souligner que quelques herbicides de type phénoxyherbicides présentent des similitudes de structure avec le lactisole et les fibrates. De plus, il a été observé que l'exposition à certains herbicides entraîne une diminution du taux de lipides dans le sang semblable à l'effet de fibrates [46]. C'est pourquoi, l'équipe de Robert Margolske a testé l'effet de ces molécules sur le récepteur humain T1R2/T1R3 [47]. Ils ont ainsi montré que certains phénoxyherbicides et les fibrates sont capables de se fixer au récepteur T1R2/T1R3 humain et d'inhiber son activité de manière au moins aussi efficace que le lactisole. Comme le lactisole, ces inhibiteurs sont actifs uniquement sur le récepteur humain T1R2/T1R3 et n'ont aucun effet sur le récepteur de souris. Les auteurs ont ainsi mis en évidence le rôle d'une région transmembranaire de T1R3 dans la liaison de ces molécules. Le récepteur T1R3 pourrait donc être une cible biologique de certains fibrates chez l'homme et contribuer par conséquent à certains de leurs effets sur le métabolisme des nutriments et de l'homéostasie du glucose.

Il est important de souligner qu'une petite protéine inhibitrice du goût sucré appelée gurmarine (Fig. 4b) a également été isolée de la plante *G. sylvestris* [48]. Mais contrairement à l'acide gymnémique, la gurmarine inhibe le récepteur au goût sucré chez le rat mais ne modifie pas la perception de la saveur sucrée chez l'être humain. Le modèle animal le plus utilisé pour la compréhension des mécanismes de transduction du goût sucré étant le rongeur, la gurmarine s'est révélé être un inhibiteur de choix puisque le lactisole n'a pas effet sur le récepteur T1R2/T1R3 de rongeur. La gurmarine est un polypeptide constitué de 35 acides aminés dont la structure tridimensionnelle a été résolue par RMN (Fig. 4b) [49,50]. La gurmarine appartient à une famille de protéines appelée knottines, qui constituent une classe structurale de petites protéines riches en ponts disulfures [51]. Ces protéines possèdent comme caractéristique la présence d'au moins trois ponts disulfures formant un pseudo-nœud. Cette particularité structurale leur confère à la fois une grande stabilité et rigidité mais aussi une remarquable résistance à la protéolyse [52]. Jusqu'à présent, une seule fonction biologique a été décrite concernant la gurmarine, à savoir, l'inhibition spécifique des réponses nerveuses aux goûts sucré et umami, enregistrées au niveau de la corde du tympan chez le rat [48,53,54]. Plus récemment, il a été montré qu'une exposition préalable du récepteur de souris T1R2/T1R3 exprimé en cellules de mammifères entraîne une inhibition complète des réponses pour la saccharine et l'acésulfame-K, par contre, après stimulation avec le sucralose, l'inhibition est d'environ 85% [19]. Il faut noter que malgré les travaux réalisés, les mécanismes de fixation de cette protéine au récepteur au goût sucré s'avèrent encore largement méconnus.

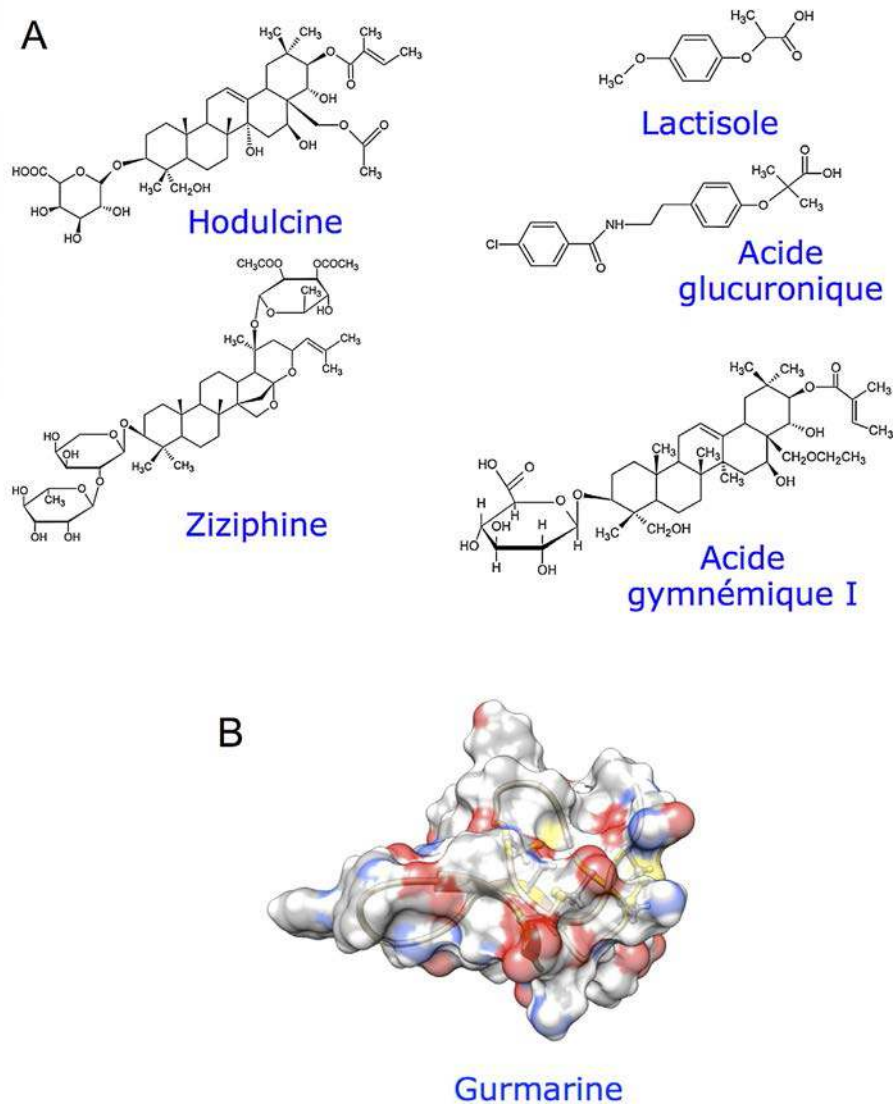


Figure 4. Structure chimique des principaux inhibiteurs du goût sucré. A. Structure chimique des principaux inhibiteurs du goût sucré chez l'être humain. Les structures ont été générées avec le logiciel ChemSketch 10.00. B. Structure tridimensionnelle de la gurmarine représentée selon son potentiel électrostatique de surface. Les régions les plus négatives sont en rouge, les plus positives en bleu, les neutres en blanc. Le squelette carboné de la gurmarine est représenté en gris. La figure a été générée à l'aide du logiciel PyMOL à partir de la structure tridimensionnelle de la gurmarine résolue par RMN (référéncée sous le code de la *Protein data bank*, pdb : 1C4E).

Rôle des récepteurs au goût sucré dans la régulation métabolique

Après sa découverte dans la bouche, le récepteur au goût sucré a été mis en évidence dans différentes parties du tractus gastro-intestinal. Dans l'estomac, la sous-unité T1R3 et l' α -gustducine sont exprimées au niveau des cellules entéroendocrines et des cellules en brosse. Les cellules entéroendocrines sont connues pour sécréter la ghréline, une hormone qui stimule l'appétit. Il est connu qu'après une augmentation de glucose sanguin suite à un repas, la sécrétion de ghréline est diminuée. Bien que la sous-unité T1R2 n'ait pas été mise en évidence dans ces cellules, il a été proposé que la sous-unité T1R3 puisse jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion de ghréline [55,56]. La fonction physiologique des cellules en brosse n'a pas encore été clairement identifiée pour le moment. Cependant, étant donné leur similarité morphologique avec les cellules gustatives de type II des bourgeons de goût et le fait qu'elles

expriment toute la machinerie de transduction associée au goût (Fig. 3), tels que la PLC- β 2 et TRPM5, certains auteurs ont proposé un rôle possible de ces cellules dans la détection des molécules sapides [57].

Le récepteur T1R2/T1R3 a aussi été mis en évidence dans l'intestin grêle au niveau des cellules entéroendocrines (Fig. 5a), qui sécrètent deux hormones de satiété, le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et le *peptide glucose-dépendant* insulino-tropique (GIP) [18,58]. Il a été montré que les souris KO pour l' α -gustducine, ne sont plus capables d'augmenter la sécrétion de GLP-1 en réponse à une administration de glucose [58]. Des travaux complémentaires sur une lignée de cellules entéroendocrines humaines ont confirmé le rôle du récepteur T1R2/T1R3 dans le contrôle de la sécrétion de GLP-1. Par ailleurs, il a été observé que la stimulation de T1R2/T1R3 par des molécules sucrées augmente l'expression du co-transporteur de sodium-glucose (SGLT-1) (Fig. 5a), qui permet le passage du glucose dans le sang [19]. Dans le duodénum, chez des patients atteints d'un diabète

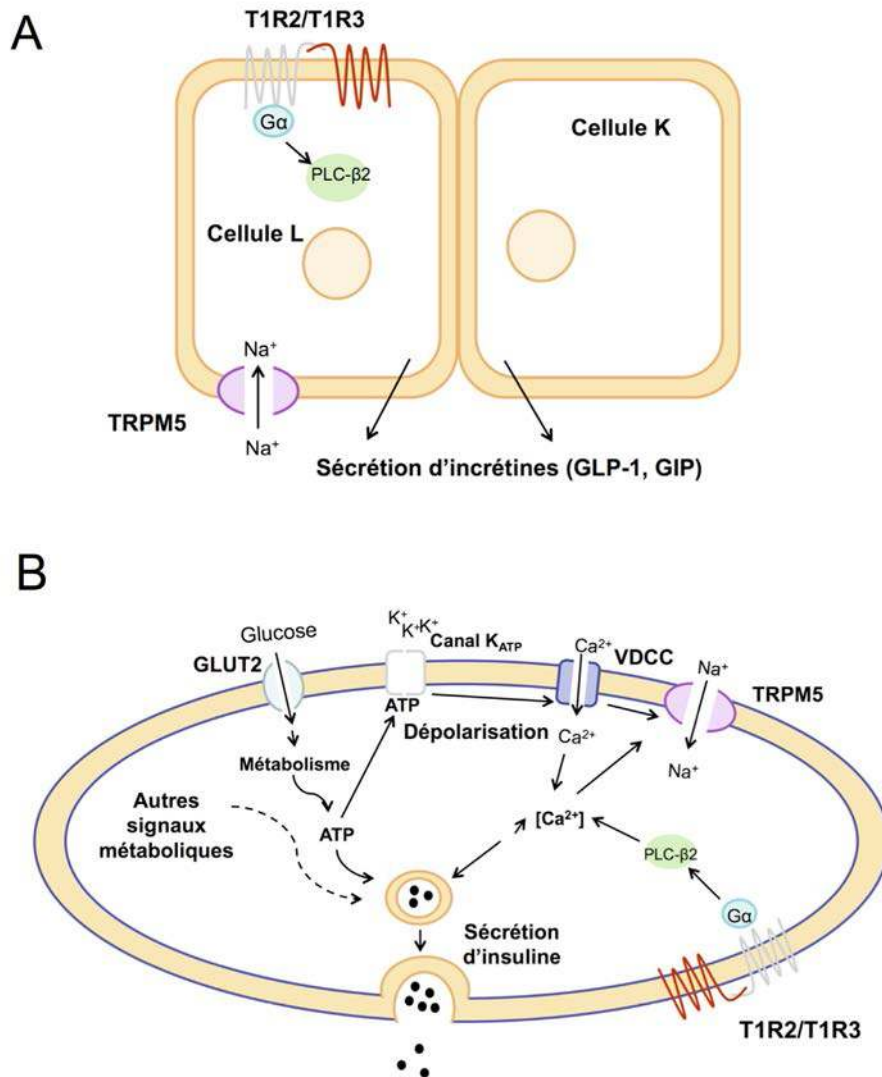


Figure 5. Rôle du récepteur T1R2/T1R3 dans l'intestin grêle et dans le pancréas. Schéma descriptif des voies de signalisation liées à la sécrétion des incrétines (GLP-1 et GIP) dans les cellules entéroendocrines de l'intestin grêle (A) et à la sécrétion d'insuline dans les cellules bêta du pancréas (B). GLUT2 : transporteur de glucose type 2 ; VDCC : canal calcique voltage-dépendant ; TRPM5 : *transient receptor potential cation channel subfamily M member 5* ; ATP : adénosine tri-phosphate ; PLC-β2 : phospholipase C-β2 ; Gα : alpha gustducine ; T1R2/T1R3 : récepteur au goût sucré.

de type 2, il a été montré que le niveau d'expression du récepteur au goût sucré est augmenté [59]. L'ensemble de ces données montrent que le récepteur T1R2/T1R3 joue un rôle important dans le processus de détection des glucides au niveau du système digestif et de leur régulation (Fig. 5a).

Le récepteur T1R2/T1R3 et l' α -gustducine ont été mis en évidence dans le pancréas, plus précisément, dans les cellules bêta [60]. Bien que le rôle du récepteur dans cet organe ne soit pas complètement élucidé, il a été montré qu'il joue un rôle majeur dans la régulation du glucose dans le sang par l'intermédiaire de la sécrétion d'insuline. Il est bien connu que la principale voie contrôlant la sécrétion d'insuline est une voie métabolique. Ainsi, lorsque la concentration du glucose dans le sang augmente, la quantité de glucose transporté activement dans les cellules bêta, situées dans les îlots de Langerhans, augmente également. Le glucose est transporté par un transporteur du glucose (GLUT2) conduisant à la glycolyse et en conséquence à la production d'ATP. Cette augmentation d'ATP est responsable de la fermeture de canaux K⁺ sensibles à

l'ATP, qui conduit à une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire via l'activation du canal calcique voltage-dépendant (VDCC). Cette libération de Ca²⁺ intracellulaire conduit elle-même à la dépolarisation membranaire et en conséquence la libération d'insuline (Fig. 5b). Plusieurs études suggèrent l'existence d'une seconde voie non métabolique, indépendante de la glycolyse, impliquée également dans la régulation de la sécrétion d'insuline. En effet, il a été montré que certains édulcorants non énergétiques tels que la saccharine, le cyclamate ou l'acésulfame-K renforcent la libération d'insuline [61]. De plus, il a été montré sur des modèles cellulaires que la sécrétion d'insuline est plus rapide suite à une stimulation par le fructose. Cette rapidité va à l'encontre d'une réponse métabolique qui demande un certain temps de réponse et conforte la présence d'un autre type de réponse basée sur l'implication du récepteur T1R2/T1R3. De plus, un analogue non métabolisable du glucose, le 3-O-méthylglucose, induit une élévation de la concentration en ATP en dépit de l'incapacité de la cellule à métaboliser cette molécule. Par ailleurs, il a été montré que

le lactisole, un inhibiteur de T1R2/T1R3 supprime la réponse de libération d'insuline induite par le fructose [62]. Ces travaux confirment le rôle du récepteur au goût sucré dans la sécrétion d'insuline et soulèvent des interrogations sur l'impact des édulcorants sur la régulation de la glycémie. La question d'un rôle plus large du récepteur au goût sucré au niveau du pancréas à savoir dans la libération d'autres hormones reste encore ouverte.

Très récemment, il a été montré que T1R2/T1R3 est impliqué dans la régulation de l'adipogénèse. Ainsi, les souris déficientes pour T1R2 montrent une quantité significativement réduite du nombre d'adipocytes en particulier, dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Étant donné que l'adipogénèse et l'ostéogénèse sont des processus proches l'un de l'autre, les auteurs ont étudié la masse osseuse chez les souris KO pour T1R2 ou T1R3, et dans les deux cas ont observé une masse osseuse augmentée par rapport à des souris de génotype sauvage [63].

Rôle des récepteurs au goût sucré dans les autres organes

Le récepteur au goût sucré a été identifié dans de nombreux autres organes tels que le cœur, le cerveau, la vessie, l'épithélium respiratoire nasal, les reins, ainsi que dans certains types cellulaires, tels que les lymphocytes B. Ainsi, le récepteur T1R2/T1R3 a été mis en évidence dans l'urothélium de la vessie. Il a été proposé que le récepteur puisse participer aux phénomènes de contraction de la vessie lors de la miction. En effet, il a été montré que chez l'être humain, la contraction de la vessie est augmentée par la stimulation par la saccharine et est diminuée par un inhibiteur du récepteur T1R2/T1R3, à savoir le sulfate de zinc [64].

La sous-unité T1R3 (en absence de T1R2) a aussi été détectée dans le cœur entier au niveau des myocytes, qui permettent la contraction cardiaque, avec un niveau d'expression qui est constant depuis la naissance jusqu'à la fin de la vie. Le rôle de T1R3 reste à élucider, d'autant plus qu'aucune variation de son niveau d'expression n'a pu être constatée suite à une privation de glucose de 24 heures [65].

Chez la souris, les deux sous-unités T1R2 et T1R3 ont été observées dans l'hippocampe, et plus particulièrement dans les neurones du gyrus denté et du *cornu ammonis* [66]. À l'aide d'un modèle cellulaire, il a été montré que le niveau d'expression de la sous-unité T1R2 est directement corrélé à l'indice glycémique du milieu de culture des cellules hypothalamique [66]. Cette étude a été confortée par une étude réalisée sur la souris qui a montré que le niveau d'expression des ARNm codant T1R2, est corrélé à l'état nutritionnel de l'animal. De plus, une ischémie provoquée par la diminution du flux sanguin dans le cerveau induit une augmentation du niveau d'expression du récepteur au goût sucré [67]. Ces études montrent clairement que le récepteur au goût sucré dans le cerveau est impliqué dans la détection du glucose permettant probablement d'adapter au mieux le cerveau en cas d'ischémie.

Le rôle du récepteur au goût sucré a été étendu récemment à la lutte contre les infections microbiennes en partenariat avec certains récepteurs au goût amer. En effet, il a été montré que les récepteurs à l'amer dans certains tissus permettent la détection de molécules d'origine bactérienne et facilitent la défense de l'organisme. Les

récepteurs à l'amer sont en partie désensibilisés dans des conditions physiologiques normales permettant ainsi de limiter leur réponse dans le cas d'une faible colonisation bactérienne. Le récepteur T1R2/T1R3 a été détecté dans les cellules épithéliales de la muqueuse nasale [68] où il a été proposé que le récepteur pourrait jouer un rôle dans la désensibilisation des récepteurs à l'amer. En cas d'infection, la propagation bactérienne va provoquer une diminution du taux de glucose habituellement présent à une concentration de 0,5 mM dans le liquide nasal. Cette diminution du taux de glucose ainsi détectée par le récepteur au goût sucré va permettre la levée de l'inhibition partiel des récepteurs à l'amer, qui en s'activant sous l'effet des molécules issues des bactéries vont déclencher une réaction de défense consistant en la sécrétion de peptides antimicrobiens [68]. Le rôle du récepteur au goût sucré dans la réponse aux infections est également conforté par la mise en évidence de la sous-unité T1R3 dans les lymphocytes B et le thymus humain [57]. Ces expressions ont été démontrées par la détection d'ARNm codant T1R3 et suggère un rôle plus important que celui soupçonné au départ dans l'immunité humaine.

Récemment, l'expression de la sous-unité T1R3 et l' α -gustducine (et non la sous-unité T1R2) a été décrite dans les organes reproducteurs mâles [69] et les spermatozoïdes humains [70]. En utilisant des souris déficientes pour la sous-unité T1R3 et l' α -gustducine, mais qui expriment leurs homologues humains, il a été montré que lorsque la sous-unité T1R3 humaine est inhibée par un analogue du lactisole (clofibrate), les souris mâles deviennent stériles et montrent des changements pathologiques au niveau de leurs organes reproducteurs [69]. Certains pesticides appartiennent à des familles chimiques comprenant des inhibiteurs du récepteur au goût sucré. Ces observations soulèvent des inquiétudes sur l'impact de ces composés sur la fertilité masculine.

Perspectives et applications thérapeutiques

La préférence des consommateurs pour la combinaison d'aliments à la fois sucrés et gras est à l'origine d'une augmentation de la prévalence de problème d'obésité et de maladies métaboliques telles que le diabète sucré et l'hyperlipidémie. Dans ce contexte de surconsommation de sucre, il apparaît particulièrement intéressant d'étudier le rôle physiologique du récepteur au goût sucré dans tout l'organisme et d'investiguer l'impact des édulcorants sur la santé. Par ailleurs, le rôle du récepteur T1R2/T1R3 dans la physiologie gastro-intestinale et le pancréas, en particulier dans le contrôle de l'absorption du glucose est à l'origine d'un intérêt croissant pour le développement de molécules inhibitrices à visée thérapeutique. Une absorption réduite du glucose et ainsi un apport réduit de calories par de tels composés pourrait offrir une alternative originale pour traiter l'obésité et les maladies associées. Dans cette perspective, les inhibiteurs naturels d'origine végétale, tels que l'acide gymnémique et la ziziphine ont été proposés comme alternative thérapeutique pour aider à contrôler la glycémie. Ainsi, par exemple, la plante *G. sylvestre* est utilisée depuis des siècles dans la médecine traditionnelle ayurvédique pour aider à soigner le diabète sucré [71,72]. Au Japon, il a été traditionnellement observé que la consommation d'infusion de feuilles de *G. sylvestre* constituait une aide pour contrôler le poids corporel. Cependant, il faut souligner que l'efficacité du traitement par *G. sylvestre* n'a été

confirmée que par un nombre restreint d'essais cliniques [73]. Par ailleurs, il convient de rester très prudent face à l'utilisation de ces plantes et aux risques liés soit, à la molécule inhibitrice en elle-même, soit à l'inhibition du récepteur au goût sucré dans certains tissus. Par exemple, une étude récente a révélé un cas de lésion hépatique induite par un médicament chez un patient traité avec *G. sylvestre* pour un diabète sucré [74].

La gurmarine est un autre candidat potentiellement intéressant pour bloquer le récepteur T1R2/T1R3. Il est communément accepté que les polypeptides puissent constituer d'excellents médicaments, parce que ces petites protéines ont évolué pour devenir des inhibiteurs hautement spécifiques et efficaces envers les récepteurs. De plus, la gurmarine appartient à la famille structurale des knottines, polypeptides décrits pour leur remarquable stabilité thermique, leur rigidité de structure et leur haute résistance à la dégradation protéolytique [75]. Plusieurs études ont montré que les knottines présentent une bonne tolérance à la substitution d'un acide aminé par un autre ou encore à l'insertion d'un acide aminé supplémentaire au niveau d'une boucle, sans perte de leur intégrité structurale [76,77]. Elles présentent donc un grand intérêt pour des études de bio-fonctionnalisation et de façon plus générale, en pharmacologie pour le développement de nouvelles molécules actives. En outre, en raison de leur grande stabilité, les knottines sont considérés comme non immunogènes, par manque de présentation au système immunitaire. L'ingénierie des ces polypeptides est un domaine porteur puisque lors de ces dernières années plusieurs études et brevets mentionnent l'utilisation de knottines modifiées comme outils pour l'imagerie et le suivi de cancers [78,79]. Etant donné que la gurmarine est uniquement active sur le récepteur de rongeur T1R2/T1R3 et non sur le récepteur au goût sucré humain, une possibilité est d'utiliser la mutagenèse dirigée ou l'évolution dirigée [80] afin de développer une molécule thérapeutique dérivée de la gurmarine présentant une forte inhibition et une spécificité pour le récepteur humain T1R2/T1R3. La recherche des mécanismes d'inhibition et la possible conception de nouveaux inhibiteurs du goût sucré représentent sans aucun doute un domaine de recherche d'intérêt pour les industries pharmaceutiques. Ces opportunités thérapeutiques devraient conduire dans le futur à des recherches fondamentales visant à élucider les mécanismes d'inhibition du récepteur du goût sucré.

Conclusion

La perception du goût sucré est réalisée grâce à un récepteur unique exprimé dans la bouche destiné à apporter des informations sur le contenu calorique et le contenu en macronutriments des aliments ingérés. De façon inattendue, après sa découverte dans la langue, l'expression fonctionnelle de T1R2/T1R3 a été décrite dans de nombreux tissus et organes extra-oraux. Dans l'intestin, il a été montré que, le récepteur T1R2/T1R3 est impliqué dans la détection du glucose luminal, la régulation de la sécrétion de certaines hormones de satiété et l'expression d'un transporteur de glucose. L'identification de nouveaux rôles fonctionnels du récepteur au goût sucré dans les différents organes soulève des interrogations sur l'impact des édulcorants sur notre contrôle métabolique et est à l'origine d'un intérêt sur la modulation de ce récepteur via des inhibiteurs sélectifs. Ainsi T1R2/T1R3 peut représenter une cible potentielle et prometteuse pour le traitement de

l'obésité et des maladies métaboliques telles que le diabète et l'hyperlipidémie.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par des bourses de l'Institut national de la recherche agronomique et par le Conseil régional de Bourgogne (PARI 2010-2011-2012, Projet AGRAL1) et par le financement d'une bourse de thèse du Conseil régional de Bourgogne (Anni Laffitte). Les auteurs remercient l'Institut Benjamin Delessert pour l'obtention d'un prix de projet de recherche (Loïc Briand).

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, et al. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 2006;444(7117):288–94.
- [2] Li X, Staszewski L, Xu H, et al. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(7):4692–6.
- [3] Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, et al. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 2001;106(3):381–90.
- [4] Behrens M, Meyerhof W, Hellfrisch C, et al. Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50(10):2220–42.
- [5] DuBois GE. Chemistry of gustatory stimuli. In: Firestein S, Beauchamp GK, editors. *The senses: a comprehensive reference*. 4: Elsevier; 2008. p. 27–74.
- [6] Assadi-Porter FM, Maillet EL, Radek JT, et al. Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2-T1R3 human sweet receptor. *J Mol Biol* 2010;398(4):584–99.
- [7] Cui M, Jiang P, Maillet E, et al. The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites. *Curr Pharm Des* 2006;12(35):4591–600.
- [8] Jiang P, Ji Q, Liu Z, et al. The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem* 2004;279(43):45068–75.
- [9] Koizumi A, Nakajima K, Asakura T, et al. Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358(2):585–9.
- [10] Liu B, Ha M, Meng XY, et al. Molecular mechanism of species-dependent sweet taste toward artificial sweeteners. *J Neurosci* 2011;31(30):11070–6.
- [11] Masuda K, Koizumi A, Nakajima K, et al. Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS One* 2012;7(4):e35380.
- [12] Nie Y, Vignes S, Hobbs JR, et al. Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol* 2005;15(21):1948–52.
- [13] Nie Y, Hobbs JR, Vignes S, et al. Expression and purification of functional ligand-binding domains of T1R3 taste receptors. *Chem Senses* 2006;31(6):505–13.
- [14] Winnig M, Bufe B, Meyerhof W. Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of *rTas1r3* mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neurosci* 2005;6:22.
- [15] Winnig M, Bufe B, Kratochwil NA, et al. The binding site for neohesperidin dihydrochalcone at the human sweet taste receptor. *BMC Struct Biol* 2007;7:66.
- [16] Xu H, Staszewski L, Tang H, et al. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(39):14258–63.

- [17] Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014;17(4):379–85.
- [18] Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, et al. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 1):302–5.
- [19] Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(38):15075–80.
- [20] Rozengurt N, Wu SV, Chen MC, et al. Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(5):G792–802.
- [21] Mace OJ, Lister N, Morgan E, et al. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol* 2009;587(Pt 1):195–210.
- [22] Drewnowski A, Rehm CD. Consumption of added sugars among US children and adults by food purchase location and food source. *Am J Clin Nutr* 2014;100(3):901–7.
- [23] Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, et al. An amino-acid taste receptor. *Nature* 2002;416(6877):199–202.
- [24] Poirier N, Roudnitzky N, Brockhoff A, et al. Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem* 2012;60(39):9807–14.
- [25] Behrens M, Meyerhof W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav* 2011;105(1):4–13.
- [26] Maitrepierre E, Sigoillot M, Le Pessot L, et al. Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. *Protein Expr Purif* 2012;83(1):75–83.
- [27] Maitrepierre E, Sigoillot M, Le Pessot L, et al. An efficient *Escherichia coli* expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. *Bioengineered* 2013;4(1):25–9.
- [28] Raliou M, Grauso M, Hoffmann B, et al. Human genetic polymorphisms in T1R1 and T1R3 taste receptor subunits affect their function. *Chem Senses* 2011;36(6):527–37.
- [29] Iwatsuki K, Uneyama H. Sense of taste in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 2012;118(2):123–8.
- [30] Tomonari H, Miura H, Nakayama A, et al. Galpha-gustducin is extensively coexpressed with sweet and bitter taste receptors in both the soft palate and fungiform papillae but has a different functional significance. *Chem Senses* 2012;37(3):241–51.
- [31] Sigoillot M, Brockhoff A, Meyerhof W, et al. Sweet-taste-suppressing compounds: current knowledge and perspectives of application. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96(3):619–30.
- [32] Galindo-Cuspinera V, Breslin PA. The liaison of sweet and savory. *Chem Senses* 2006;31(3):221–5.
- [33] Sciafani A, Perez C. Cypha [propionic acid, 2-(4-methoxyphenol) salt] inhibits sweet taste in humans, but not in rats. *Physiol Behav* 1997;61(1):25–9.
- [34] Schiffman SS, Booth BJ, Sattely-Miller EA, et al. Selective inhibition of sweetness by the sodium salt of +2-(4-methoxyphenoxy)propanoic acid. *Chem Senses* 1999;24(4):439–47.
- [35] Jiang P, Cui M, Zhao B, et al. Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem* 2005;280(15):15238–46.
- [36] Keast RS. The effect of zinc on human taste perception. *J Food Sci* 2003;68(5):1871–7.
- [37] Galindo-Cuspinera V, Winnig M, Bufe B, et al. A *TAS1R* receptor-based explanation of sweet 'water-taste'. *Nature* 2006;441(7091):354–7.
- [38] Kennedy LM, Saul LR, Seffeka R, et al. Hodulcin: selective sweetness-reducing principle from *Hovenia dulcis* leaves. *Chem Senses* 1988;13(4):529–43.
- [39] Liu HM, Kiuchi F, Tsuda Y. Isolation and structure elucidation of gymnemic acids, antisweet principles of *Gymnema sylvestris*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992;40(6):1366–75.
- [40] Meiselman HL, Halpern BP, Dateo GP. Reduction of sweetness judgements by extracts from the leaves of *Ziziphus jujuba*. *Physiol Behav* 1976;17(2):313–7.
- [41] Hellekant G, af Segerstad CH, Roberts T, et al. Effects of gymnemic acid on the chorda tympani proper nerve responses to sweet, sour, salty and bitter taste stimuli in the chimpanzee. *Acta Physiol Scand* 1985;124(3):399–408.
- [42] Hellekant G, Gopal V. On the effects of gymnemic acid in the hamster and rat. *Acta Physiol Scand* 1976;98(2):136–42.
- [43] Hellekant G, Ninomiya Y. On the taste of umami in chimpanzee. *Physiol Behav* 1991;49(5):927–34.
- [44] Sanematsu K, Yoshida R, Shigemura N, et al. Structure, function, and signaling of taste G-protein-coupled receptors. *Curr Pharm Biotechnol* 2014;15(10):951–61.
- [45] Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005;54(8):2460–70.
- [46] Vainio H, Linnainmaa K, Kahonen M, et al. Hypolipidemia and peroxisome proliferation induced by phenoxyacetic acid herbicides in rats. *Biochem Pharmacol* 1983;32(18):2775–9.
- [47] Maillet EL, Margolskee RF, Mosinger B. Phenoxy herbicides and fibrates potently inhibit the human chemosensory receptor subunit T1R3. *J Med Chem* 2009;52(21):6931–5.
- [48] Imoto T, Miyasaka A, Ishima R, et al. A novel peptide isolated from the leaves of *Gymnema sylvestris*-I. Characterization and its suppressive effect on the neural responses to sweet taste stimuli in the rat. *Comp Biochem Physiol A* 1991;100(2):309–14.
- [49] Arai K, Ishima R, Morikawa S, et al. Three-dimensional structure of gurmarin, a sweet taste-suppressing polypeptide. *J Biomol NMR* 1995;5(3):297–305.
- [50] Fletcher JI, Dingley AJ, Smith R, et al. High-resolution solution structure of gurmarin, a sweet-taste-suppressing plant polypeptide. *Eur J Biochem* 1999;264(2):525–33.
- [51] Sigoillot M, Brockhoff A, Lescop E, et al. Optimization of the production of gurmarin, a sweet-taste-suppressing protein, secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96(5):1253–63.
- [52] Craik DJ, Daly NL. NMR as a tool for elucidating the structures of circular and knotted proteins. *Mol Biosyst* 2007;3(4):257–65.
- [53] Miyasaka A, Imoto T. Electrophysiological characterization of the inhibitory effect of a novel peptide gurmarin on the sweet taste response in rats. *Brain Res* 1995;676(1):63–8.
- [54] Ninomiya Y, Imoto T. Gurmarin inhibition of sweet taste responses in mice. *Am J Physiol* 1995;268:1019–25.
- [55] Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res* 2010;339(3):493–504.
- [56] Janssen S, Laermans J, Verhulst PJ, et al. Bitter taste receptors and alpha-gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(5):2094–9.
- [57] Iwatsuki K, Nomura M, Shibata A, et al. Generation and characterization of T1R2-LacZ knock-in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402(3):495–9.
- [58] Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(38):15069–74.
- [59] Young RL, Chia B, Isaacs NJ, et al. Disordered control of intestinal sweet taste receptor expression and glucose absorption in type 2 diabetes. *Diabetes* 2013;62(10):3532–41.
- [60] Henquin JC, Nenquin M. Activators of PKA and Epac distinctly influence insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ in female mouse islets stimulated by glucose and tolbutamide. *Endocrinology* 2014;155(9):3274–87.
- [61] Malaisse WJ, Vanonderbergen A, Louchami K, et al. Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets. *Cell Signal* 1998;10(10):727–33.

- [62] Kyriazis GA, Soundarapandian MM, Tyrberg B. Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(8):E524–32.
- [63] Simon BR, Learman BS, Parlee SD, et al. Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass. *PLoS One* 2014;9(1):e86454.
- [64] Elliott RA, Kapoor S, Tincello DG. Expression and distribution of the sweet taste receptor isoforms T1R2 and T1R3 in human and rat bladders. *J Urol* 2011;186(6):2455–62.
- [65] Foster SR, Porrello ER, Purdue B, et al. Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One* 2013;8(5):e64579.
- [66] Ren X, Zhou L, Terwilliger R, et al. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci* 2009;3:12.
- [67] Shin YJ, Park JH, Choi JS, et al. Enhanced expression of the sweet taste receptors and alpha-gustducin in reactive astrocytes of the rat hippocampus following ischemic injury. *Neurochem Res* 2010;35(10):1628–34.
- [68] Lee RJ, Cohen NA. Bitter and sweet taste receptors in the respiratory epithelium in health and disease. *J Mol Med (Berlin, Germany)* 2014;92(12):1235–44.
- [69] Mosinger B, Redding KM, Parker MR, et al. Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(30):12319–24.
- [70] Meyer D, Voigt A, Widmayer P, et al. Expression of Tas1 taste receptors in mammalian spermatozoa: functional role of Tas1r1 in regulating basal Ca(2)(+) and cAMP concentrations in spermatozoa. *PLoS One* 2012;7(2):e32354.
- [71] Hardy ML, Coulter I, Venuturupalli S, et al. Ayurvedic interventions for diabetes mellitus: a systematic review. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 2001;(41), 2 p.
- [72] Warren RP, Warren RM, Weninger MG. Inhibition of the sweet taste by *Gymnema sylvestre*. *Nature* 1969;223(5201):94–100.
- [73] Leach MJ. *Gymnema sylvestre* for diabetes mellitus: a systematic review. *J Altern Complement Med (New York, NY)* 2007;13(9):977–83.
- [74] Shiyovich A, Sztarkier I, Nesher L. Toxic hepatitis induced by *Gymnema sylvestre*, a natural remedy for type 2 diabetes mellitus. *Am J Med Sci* 2010;340(6):514–7.
- [75] Craik DJ, Daly NL, Waine C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* 2001;39(1):43–60.
- [76] Vita C, Drakopoulou E, Vizzavona J, et al. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(23):13091–6.
- [77] Stricher F, Huang CC, Descours A, et al. Combinatorial optimization of a CD4-mimetic miniprotein and cocrystal structures with HIV-1 gp120 envelope glycoprotein. *J Mol Biol* 2008;382(2):510–24.
- [78] Daly NL, Craik DJ. Bioactive cystine knot proteins. *Curr Opin Chem Biol* 2011;15(3):362–8.
- [79] Moore SJ, Hayden Gephart MG, Bergen JM, et al. Engineered knottin peptide enables noninvasive optical imaging of intracranial medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(36):14598–603.
- [80] Bonsor DA, Sundberg EJ. Dissecting protein-protein interactions using directed evolution. *Biochemistry* 2011;50(13):2394–402.