

Université de Montréal

**Rôles des facteurs de croissance dans la  
prolifération de la cellule  $\beta$ -pancréatique en  
réponse à un excès de nutriments**

Étude du facteur de croissance HB-EGF et du récepteur à l'EGF

par  
Isma Benterki

Département de biochimie  
Faculté de médecine  
Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès science  
en biochimie (M. Sc.)

Avril 2015

© Isma Benterki, 2015



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Rôles des facteurs de croissance dans la prolifération  
de la cellule  $\beta$ -pancréatique en réponse à un excès de nutriments

Présenté par  
Isma Benterki

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteure Sylvie Mader, présidente-rapporteuse

.....

Docteur Vincent Poitout, directeur de recherche

.....

Docteure Audrey Claing, membre du jury

.....



## Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) résulte d'une résistance à l'insuline par les tissus périphériques et par un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Au fil du temps, la compensation des îlots de cellules  $\beta$  pour la résistance à l'insuline échoue et entraîne par conséquent une baisse progressive de la fonction des cellules  $\beta$ . Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la compensation de la cellule  $\beta$ . Toutefois, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la compensation de la masse de la cellule  $\beta$  reste à ce jour inconnue. Le but de ce mémoire était d'identifier précisément quel mécanisme pouvait amener à la compensation de la cellule  $\beta$  en réponse à un excès de nutriments et plus précisément à l'augmentation de sa prolifération et de sa masse. Ainsi, avec l'augmentation de la résistance à l'insuline et des facteurs circulants chez les rats de six mois perfusés avec du glucose et de l'intralipide, l'hypothèse a été émise et confirmée lors de notre étude que le facteur de croissance HB-EGF active le récepteur de l'EGF et des voies de signalisations subséquentes telles que mTOR et FoxM1 impliquées dans la prolifération de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Collectivement, ces résultats nous permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la compensation de la masse de la cellule  $\beta$  dans un état de résistance à l'insuline et peuvent servir de nouvelles approches thérapeutiques pour prévenir ou ralentir le développement du DT2.

**Mots-clés** : Diabète, îlots de Langerhans, cellule  $\beta$ -pancréatique, prolifération, compensation, HB-EGF, mTOR, nutriments, FoxM1, récepteur EGF.

**Abstract**

Type 2 diabetes (T2D) results from insulin resistance in peripheral tissues and impaired insulin secretion from the pancreatic  $\beta$ -cell. Over the time, compensation of the  $\beta$  cell islets for insulin resistance fails, and therefore leads to a gradual decline in  $\beta$ -cell function. Several factors may contribute to  $\beta$ -cell compensation. However, the cellular and molecular mechanisms underlying  $\beta$ -cell compensation remain unknown. The purpose of this thesis was to identify what mechanism could lead to  $\beta$  cell compensation in response to nutrients excess and specifically the increase in proliferation and  $\beta$ -cell mass. Thus, with increasing insulin resistance and circulating factors in the 6 month rats infused with glucose + intralipid, the hypothesis was made and confirmed in our study that the growth factor HB-EGF would activate the EGF receptor, and subsequent signaling pathways such as mTOR and FoxM1, both involved in the proliferation of the pancreatic beta-cell. Collectively, these results allow us to understand better the molecular mechanisms involved in the  $\beta$  cell compensation in the insulin resistance state and may serve as a potential new therapeutic approach to prevent or delay T2D development.

**Keywords:** Diabetes, islets of Langerhans, pancreatic  $\beta$ -cell, proliferation, compensation, HB-EGF, mTOR, nutrients, FoxM1, EGF receptor.

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures .....	v
Abbréviations.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
INTRODUCTION.....	1
Chapitre 1- Le pancréas endocrine.....	2
La morphologie .....	2
Les îlots de Langerhans .....	3
Régulation hormonale de la glycémie .....	5
Mécanisme de compensation de la cellule $\beta$ -pancréatique.....	6
Chapitre 2 – Le diabète .....	9
Définition, prévalence et critères diagnostiques .....	9
Les différents types de diabète .....	11
Étiologie du diabète de type 2 .....	13
Chapitre 3- La pathophysiologie du diabète de type 2.....	14
La dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique .....	15
La résistance à l'insuline .....	16
La diminution de la masse de la cellule $\beta$ .....	18
La diminution de la masse de la cellule $\beta$ -pancréatique entraine sa dysfonction. ....	19
Chapitre 4 –Mécanismes de l'augmentation de la masse de la cellule $\beta$ -pancréatique .....	19
La prolifération de la cellule $\beta$ -pancréatique.....	19
Adaptation de la cellule $\beta$ -pancréatique .....	20
Prolifération de la cellule $\beta$ -pancréatique.....	22
Récepteur de la famille <i>Epidermal Growth Factor</i> (EGF) .....	27
Différentes voies de signalisation subséquentes au récepteur à l'EGF.....	28
Chapitre 5 – Mise en contexte de la thèse.....	34
Problématique.....	34
Hypothèse et objectif du mémoire.....	35
Publications .....	35
Résultats.....	37

Article 1 .....	38
ABSTRACT .....	39
Introduction .....	40
RESEARCH DESIGN AND METHODS .....	41
RESULTS .....	47
DISCUSSION .....	52
ACKNOWLEDGEMENTS .....	56
REFERENCES .....	57
Supplementary Figures and tables: .....	68
Discussion et perspectives .....	72
Rappel des résultats .....	73
Interprétation des résultats .....	75
Forces et limites de l'étude .....	77
Travaux futurs .....	81
Conclusion .....	84
BIBLIOGRAPHIE .....	85



## Liste des figures

Figure 1: Anatomie du pancréas chez l'humain et morphologie des îlots de Langerhans (2).....	5
Figure 2. La dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique et l'histoire naturelle du diabète de type 2. ....	8
Figure 3. Comparaison du diabète diagnostiqué selon les études démographiques de l'IDF.....	10
Figure 4: Mécanisme proposé décrivant la glucolipotoxicité. ....	16
Figure 5. L'obésité et le développement de l'inflammation et de la résistance de l'insuline. ....	17
Figure 6. La voie de signalisation à partir du glucose vers la prolifération des cellules $\beta$ via mTOR, ChREBP/cMyc.....	23
Figure 7. Voie de signalisation de HB-EGF menant à la prolifération cellulaire. ....	26
Figure 8. Modèle de transactivation et mécanisme de prolifération dans la cellule $\beta$ . ....	33
Figure 9. Perspectives et travaux entamés au laboratoire .....	83
Figure 10. Technique de criblage à haut débit des cellules $\beta$ -pancréatiques. ....	83

## **Abréviations**

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Bêta
$\delta$	Delta
4EBP1	4E-binding proteins 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AURKB	Aurora kinase B
C/EBP $\beta$	CCAAT-enhancer-binding proteins $\beta$
CRM197	Cross-reacting material 197
DGDG	Diabetes Gene Discovery Group
Dl	Décilitre
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular-signal-regulated kinases
FoxM1	Forkhead box protein M1
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3
HB-EGF	Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor
HGPO	Hyperglycémie provoquée par voie orale
HHEX	Hematopoietically-expressed homeobox protein
IDF	Fédération internationale du diabète
IG	Intolérance au glucose
IGT	Intolérance au glucose.
IMC	Indice de masse corporelle
IR	Résistance à l'insuline
L	Litre
MAPK	Mitogen-activated protein kinases

Mg	Milligramme
Mmol	Millimole
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NGT	Tolérance normale au glucose
OMS	Organisation mondiale de la santé
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PDX-1	Pancreatic duodenal homeobox 1
PH	Pleckstrin homology
PHLPP	PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases
PK	Proteine Kinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3 kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate
PLK1	Polo-like kinase 1
PP	Polypeptide pancréatique RE Réticulum endoplasmique
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
REL	Réticulum endoplasmique lisse
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
TORC1	TOR complexe 1
TORC2	TOR complexe 2
THP1	Tryptophan hydroxylase
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
TYR	Tyrosine
UPR	Unfolded protein response

## **INTRODUCTION**

*Les reins me paraissent aussi affectés dans la maladie que les uns appellent hydropisie dans le pot de chambre. [...] Quant à moi, je ne l'ai vue que deux fois jusqu'à présent; les malades avaient une soif inextinguible; ils buvaient démesurément et rendaient par les urines le liquide ingéré tel qu'ils l'avaient bu.*

-Galien

## **Chapitre 1- Le pancréas endocrine**

### **La morphologie**

Chez l'homme, le pancréas est un organe abdominal d'environ 15 centimètres qui possède trois segments, soit la tête, le corps et la queue. La tête, la partie plus large, est rattachée au duodénum par le canal cholédoque. Le corps, qui forme la partie centrale, se déploie vers la rate. La glande pancréatique est classifiée comme hétérocrine, car elle possède à la fois des tissus exocrines et endocrines. Le tissu exocrine représente environ 99 % du poids total du pancréas. Ce tissu a pour fonction de sécréter un liquide alcalin riche en enzymes digestives. Quant à la partie endocrine, elle représente environ 1 % de la masse totale du pancréas. Le tissu endocrine est composé de petits amas de cellules nommés îlots de Langerhans. (1)

### **Les îlots de Langerhans**

Découverts en 1869 par le biologiste allemand Paul Langerhans, les petits îlots de Langerhans, qui forment environ 1 % de la masse du pancréas, sont l'unité fonctionnelle du tissu endocrine. Un adulte en possède entre 750 000 et 1,5 million. Ils mesurent en moyenne 140  $\mu\text{m}$  et sont situés dans la partie antérieure du pancréas. Un dense réseau de capillaires entouré par une mince couche de collagène irrigue ces îlots, qui contiennent quatre différentes sortes de cellules endocrines : les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et PP. Ces quatre cellules sécrètent respectivement quatre hormones : le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique. Chacune de ces hormones possède une fonction distincte et adéquate dans la régulation de la glycémie et des besoins métaboliques.

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques forment l'essentiel de la masse endocrine du pancréas. Constituant entre 50 % et 80 % de la masse totale de l'îlot, ces cellules sécrètent l'insuline, un peptide constitué de 51 acides aminés avec une forte action hypoglycémiante.

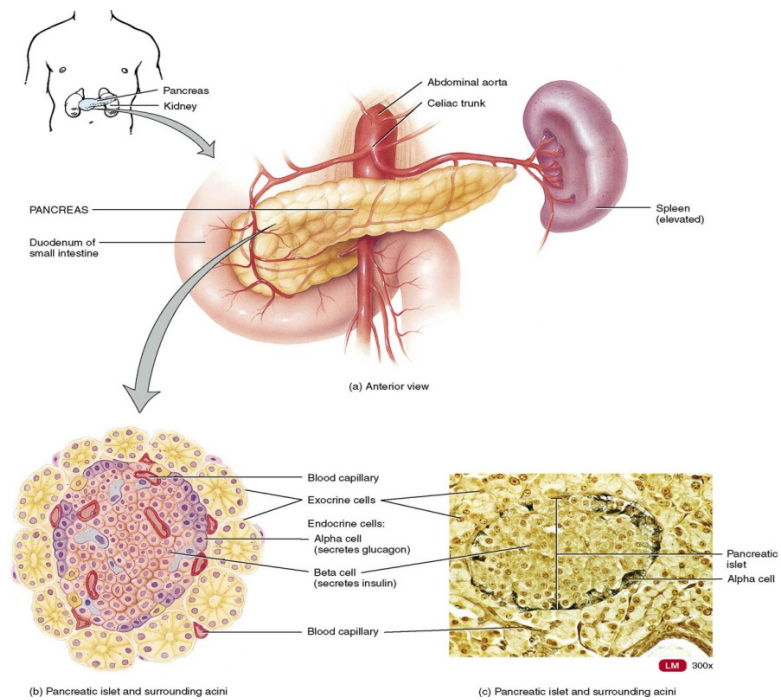
Le second type cellulaire le plus répandu et constituant entre 15 % et 20 % de la masse totale d'un îlot est la cellule  $\alpha$  sécrétrice d'un peptide constitué de 29 acides aminés, le glucagon. Dérivé du clivage du proglucagon, ce peptide possède une action hyperglycémiante.

De 5 % à 10 % de la masse de l'îlot est allouée aux cellules  $\gamma$  qui sécrètent la somatostatine, un peptide constitué de 14 acides aminés. Ce peptide est en fait un puissant inhibiteur de la sécrétion du glucagon et de l'insuline.

Enfin, les cellules PP, les moins étudiées de l'îlot, sécrètent le polypeptide pancréatique. Le polypeptide pancréatique joue vraisemblablement un rôle de mécanisme d'inhibition de la sécrétion pancréatique exocrine. Toutefois, son mode d'action endocrine est encore méconnu.

L'anatomie des îlots est complexe, et ce, surtout en raison des différentes espèces. D'une part, les cellules endocrines dans le pancréas forment différents agrégats d'aspects et de grandeurs variés. D'autre part, la répartition des îlots de Langerhans n'est pas aléatoire et est spécifique à chaque espèce. Chez les espèces murines, par exemple, la majorité des cellules productrices d'insuline sont situées dans le centre de l'îlot et entourées de cellules sécrétrices de glucagon. L'organisation de leurs îlots est donc bien connue. Toutefois, le même phénomène n'est pas observé dans les îlots humains, qui sont variables et désorganisés autour des cellules  $\beta$ .

Plusieurs études ont démontré que la direction du flux sanguin est définie par la direction des cellules  $\beta$  vers les cellules non  $\beta$  et que l'organisation des îlots a un aspect fonctionnel. **Figure 1 (2)**



**Figure 1:** Anatomie du pancréas chez l'humain et morphologie des îlots de Langerhans (2).

## Régulation hormonale de la glycémie

Exerçant un rôle majeur dans l'organisme, le glucose est un substrat catabolique essentiel à la fonction de plusieurs organes, notamment au fonctionnement des muscles, du cerveau et des hématies. La glycémie normale chez un individu sain se situe entre 3,9 et 6,1 mmol/L. Une perturbation de la glycémie, comme dans le cas de l'hypoglycémie ou de l'hyperglycémie, entraîne des conséquences délétères pour l'organisme. L'équilibre de la glycémie est régulé par la combinaison de différents organes et hormones. Ces hormones n'agissent pas de la même façon, ni au même moment. Ainsi, l'homéostasie du glucose se fait en combinant l'action des hormones sécrétées par les îlots de Langerhans,



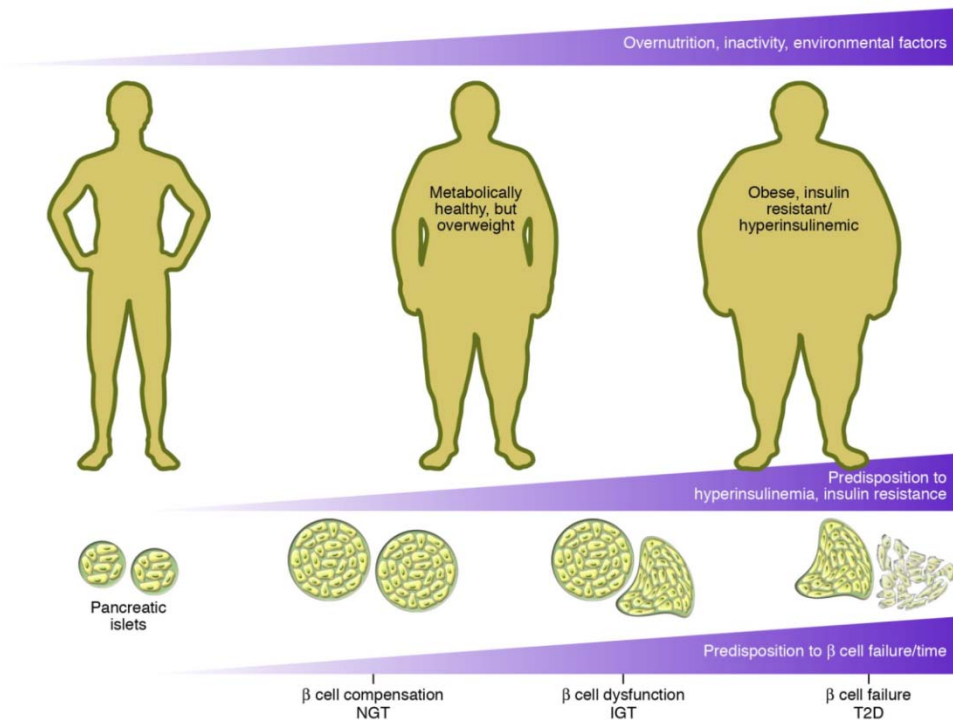
par la production par le foie de glucose et par leur recapture par les tissus musculaires et adipeux. Le pancréas joue le rôle majeur dans la régulation de la glycémie grâce à la sécrétion d'hormone anabolique comme l'insuline et aussi d'hormones cataboliques comme le glucagon (3).

### **Mécanisme de compensation de la cellule $\beta$ -pancréatique.**

Le diabète de type 2 (DT2) résulte d'une insuffisance de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots de Langerhans et d'une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Il se développe en réponse à une suralimentation et à un manque d'activités chez les sujets ayant une prédisposition génétique. Au fil du temps, chez environ 20% des individus, la compensation des cellules  $\beta$  pour la résistance à l'insuline échoue, entraînant ainsi un déclin progressif de la fonction des cellules  $\beta$ . L'adaptation anatomique et fonctionnelle de la cellule  $\beta$  à l'augmentation de la demande d'insuline chez les individus obèses est donc cruciale pour prévenir le diabète ou l'hyperglycémie. Toute altération de ces mécanismes conduit au développement du diabète. En effet, cette compensation se traduit par une augmentation de la sécrétion de l'insuline et de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Il a été démontré que chez certains patients humains obèses, la sécrétion de l'insuline augmente considérablement afin de maintenir une glycémie normale. Il a aussi été démontré que dans les pancréas de patients décédés, la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique est augmentée chez les sujets obèses non diabétiques

comparativement aux sujets ayant un poids santé. Ces observations suggèrent que l'altération anatomique de la compensation de la cellule  $\beta$ -pancréatique à l'obésité contribuerait au développement du diabète de type 2 (4).

Chez les rongeurs, l'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique est d'abord amorcée par la réplication des cellules existantes et est drastiquement régulée en réponse à la résistance à l'insuline induite par l'obésité. Le mécanisme moléculaire qui conduit à la compensation de la cellule  $\beta$ -pancréatique à la résistance à l'insuline est encore inconnu. Les études *in vivo* effectuées dans notre laboratoire avec des modèles de rats perfusés en nutriments pendant 72 heures ont révélé une augmentation de la masse et de la prolifération de la cellule  $\beta$ -pancréatique, qui pourrait avoir un impact sur sa compensation.



**Figure 2. La dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique et l'histoire naturelle du diabète de type 2.** Le diabète de type 2 se développe en réponse à la suralimentation et au manque d'activité physique chez les sujets ayant des prédispositions génétiques à l'hyperinsulinémie, à la résistance à l'insuline et à la défaillance de la cellule  $\beta$ . Au fil du temps, la compensation des îlots de cellules  $\beta$  pour la résistance à l'insuline échoue, entraînant par conséquent une baisse progressive de la fonction des cellules  $\beta$ . Une hyperglycémie s'ensuit avec la dysfonction et la défaillance de la cellule  $\beta$ . (Ref. : Prentki M.) (4)

*NGT : Tolérance normale au glucose; IGT : Intolérance au glucose.*

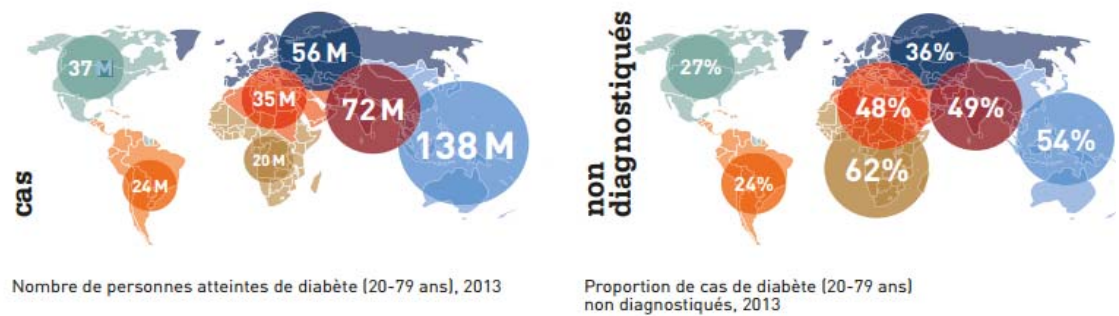
## **Chapitre 2 – Le diabète**

### **Définition, prévalence et critères diagnostiques**

Bien qu'il ait fallu un certain temps pour trouver une définition exacte au diabète, il semble de nos jours qu'il puisse être défini comme « une maladie chronique qui survient lorsque l'organisme est incapable de produire suffisamment d'insuline, ou d'utiliser l'insuline de manière efficace ».

#### ***Fédération internationale du diabète (IDF)***

Plusieurs causes peuvent expliquer une augmentation du nombre d'individus souffrant de diabète : le vieillissement de la population, l'urbanisation, l'augmentation de la prévalence de l'obésité et le manque d'activité physique sont parmi ces causes. D'après l'IDF, le diabète est l'une des maladies chroniques les plus communes. Il affecte plus de 387 millions d'individus à travers le monde, soit quelque 5 % de la population mondiale. En 2015, une personne meurt du diabète toutes les six secondes, ce qui représente 5,1 millions de décès. Si la tendance se maintient, ce pourcentage atteindra 6,3 % en 2025 (5).



**Figure 3.** Comparaison selon les études démographiques de l'IDF de la proportion mondiale d'individus âgés de 20 à 79 ans diagnostiqués et non diagnostiqués avec le diabète (Ref: FID) (5).

Un diagnostic de diabète est posé lorsqu'une glycémie à jeun supérieure à 7,1 mmol/L est observée à deux reprises, si des symptômes comme une perte de poids, la polyurie et la nycturie se manifestent ou qu'un taux de glycémie supérieur à 11mmol/L est analysé après un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO), c'est-à-dire d'un test qui compare la glycémie à jeun à un test effectué deux heures après l'ingestion par voie orale de 75 grammes de glucose (5). Ces critères de diagnostic du diabète ont été établis par l'Association canadienne du diabète. Un autre test pertinent pour poser un diagnostic de diabète est celui de l'hémoglobine A1C qui mesure la concentration de glucose dans le sang sur une période de deux à trois mois. Ce test n'oblige pas le patient à être à jeun et est très utile pour suivre l'évolution de la glycémie. D'une part, selon les critères de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le diagnostic de diabète est posé lorsque l'hyperglycémie modérée à jeun équivaut à  $\geq 6,1$  mmol/l (110 mg/dl) et  $< 7$  mmol/l (126 mg/dl).

D'autre part, l'intolérance au glucose est diagnostiquée lorsque deux conditions sont jumelées : la glycémie à jeun est de  $<7$  mmol/l (126 mg/dl) et entre  $\geq 7,8$  mmol/l (140 mg/dl) et  $<11,1$  mmol/l (200 mg/dl), deux heures après une charge de 75 g de glucose (6).

### **Les différents types de diabète**

Le diabète est le terme général utilisé pour définir un trouble d'absorption du glucose par les cellules. Deux causes expliquent cette anomalie : un défaut de sécrétion d'insuline et/ou de l'action de celle-ci.

#### **Le diabète de type 1**

Le diabète de type 1 apparaît souvent à l'enfance et au plus tard à l'âge de 30 ans. Il touche en moyenne 10 % de la population diabétique. Ce type de diabète est provoqué par une réaction auto-immune au cours de laquelle il y a destruction des cellules productrices d'insuline, les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Le diabète de type 1 apparaît généralement de manière soudaine et se distingue par la présence de symptômes tels la soif excessive, la fatigue, la perte de poids, la vision trouble, etc. Les injections quotidiennes d'insuline sont essentielles pour la survie des patients atteints du diabète de type 1. Les causes exactes engendrant ce type de diabète sont inconnues. De nombreuses études avancent que le diabète de type 1 serait lié à certains facteurs de risques. Ainsi des prédispositions génétiques, l'emplacement géographique du patient ou l'introduction de sucre trop tôt dans la vie d'un nourrisson contribueraient à son

développement (5)(6). Des recherches pour prévenir le développement du diabète de type 1 sont en cours. Parmi les approches préconisées, notons la prise quotidienne de vitamine D par les enfants en bas âge. Certains essais *in vitro* sur les animaux démontrent que la vitamine B3 joue un rôle protecteur sur la cellule  $\beta$ -pancréatique. Toutefois, l'immunothérapie est l'alternative la plus prometteuse à ce jour. Elle permet au système immunitaire de « supporter » les cellules  $\beta$ -pancréatiques (5) (6).

### **Le diabète gestationnel**

Aussi appelé diabète de grossesse, le diabète gestationnel apparaît au cours des deuxième et troisième trimestres de la grossesse. Une résistance à l'action de l'insuline ou un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques provoquent une augmentation de la glycémie et causent ce type de diabète. Comme pour les autres types de diabète, il est généralement asymptomatique. Bien maîtrisé, il ne menace pas le fœtus, puisque celui-ci est déjà bien formé (7). Cependant, si la glycémie est mal contrôlée, certains risques pour le bébé, tel le trouble de macrosomie fœtale, et un accouchement plus difficile pour la mère sont à craindre (8).

### **Le diabète de type 2**

La forme de diabète la plus courante est le diabète de type 2 (DT2). Il représente plus de 90 % des cas de diabète. Le DT2 touche plus fréquemment

les adultes, mais quelques cas chez les adolescents et les enfants ont été signalés. Une résistance à l'insuline ou une sécrétion insuffisante d'insuline sont des facteurs pouvant causer ce type de diabète. La résistance à l'insuline est un défaut de recapture et d'utilisation adéquate du glucose vers les tissus périphériques qui engendre une accumulation de glucose dans le sang. En effet, la sécrétion insuffisante d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques se produit ce qui conduit à la résistance à l'insuline responsable d'une hyperglycémie (9).

## **Étiologie du diabète de type 2**

### **Facteurs environnementaux**

Le phénotype du diabète varie en fonction des facteurs environnementaux des patients, d'un pays à l'autre, d'un continent à l'autre. Parmi ces facteurs qui jouent un rôle important dans le développement du diabète de type 2, nous retrouvons la consommation de glucose alimentaire, le surpoids (l'obésité), le comportement sédentaire et le tabagisme. Des études épidémiologiques menées en tenant compte de différents critères comme l'âge, l'IMC, l'inactivité physique et la proximité ont démontré l'influence de ces facteurs. Ces études ont aussi démontré que le diabète de type 2 peut être causé par des facteurs ethniques et génétiques (10).



### **Facteurs génétiques**

Le diabète de type 2 est non seulement lié à l'environnement, à l'alimentation et au mode de vie, mais il peut être causé par des facteurs héréditaires (11). En effet, si aucun des parents n'a développé le diabète de type 2 au cours de sa vie, le risque pour l'enfant de développer la maladie est faible. Par contre, si un des parents est atteint, le risque pour l'enfant de souffrir de diabète augmente de 40 %. Si les deux parents sont atteints, ce risque s'élève à 70 % (12). D'autres études ont révélé que si un jumeau monozygote est atteint, les risques pour l'autre jumeau de développer le diabète de type 2 sont de 25 % à 30 %. Dans le cas de jumeaux dizyotes, ce risque est de 15 % à 25 % (12). Des études récentes des chercheurs du projet *Diabetes Gene Discovery Group* (DGDG) ont démontré que quatre gènes seraient impliqués à 70 % dans l'hérédité du diabète de type 2, les gènes TCF7L2, HHEX, EXT2 et SLC30A8 (9). Les gènes TCF7L2 et HHEX sont des facteurs de transcription qui régulent les activités d'autres gènes; le gène EXT2 est impliqué dans le développement du pancréas et le gène SLC30A8 produit la protéine ZnT8 qui a pour rôle d'intervenir dans le transport du zinc, facteur important dans la production d'insuline.

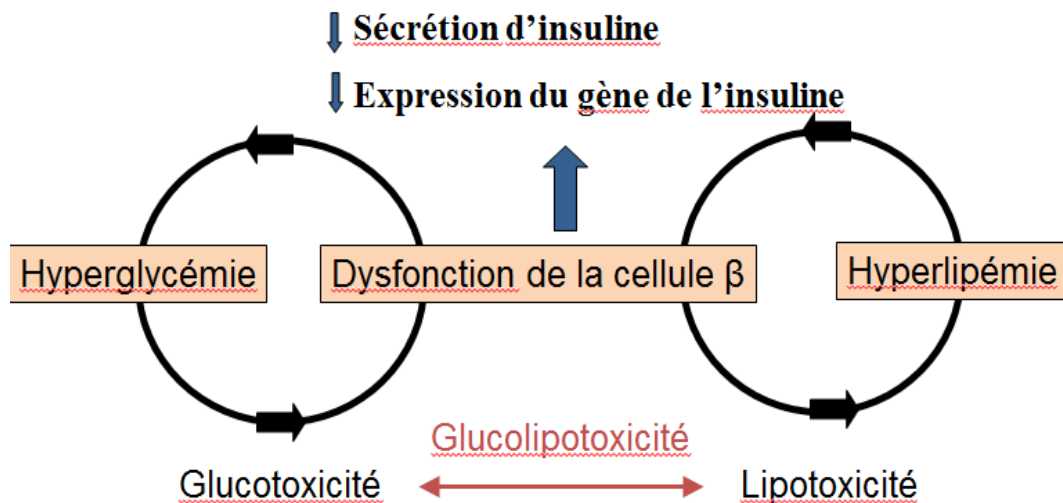
### **Chapitre 3- La pathophysiologie du diabète de type 2**

Le diabète de type 2 est causé par une insuffisance de sécrétion d'insuline par le pancréas endocrine, ainsi que par une résistance des tissus périphériques à

l'action de l'insuline. En raison de ces anomalies, l'homéostasie du glucose est altérée et mène à une détérioration de l'équilibre glycémique. Plusieurs études ont démontré que le diabète de type 2 se développe chez les individus ayant une résistance à l'insuline entraînant un défaut de compensation par les cellules  $\beta$ -pancréatiques, une intolérance au glucose et, par la suite, une hyperglycémie. L'apparition d'hyperglycémie provoque une perte de la masse de la cellule  $\beta$  accompagnée d'une perte de sa fonction sécrétoire (13).

### **La dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique**

Le mécanisme de compensation n'est pas la seule explication à la dysfonction de la cellule  $\beta$  caractérisant le diabète de type 2 (voir section chapitre 1). Le pancréas pourrait subir un autre phénomène qui déclenche une détérioration progressive, nommée glucolipotoxicité. En effet, au début des années 1990 le groupe de Robertson (14) a démontré qu'une hyperglycémie chronique combinée à une hyperlipidémie auraient une action synergique toxique sur l'homéostasie du glucose. Entre autres, il a été observé que la glucolipotoxicité aurait un impact sur la sécrétion d'insuline, sur son expression génique et sur la destruction des cellules  $\beta$  (**Figure 4**).

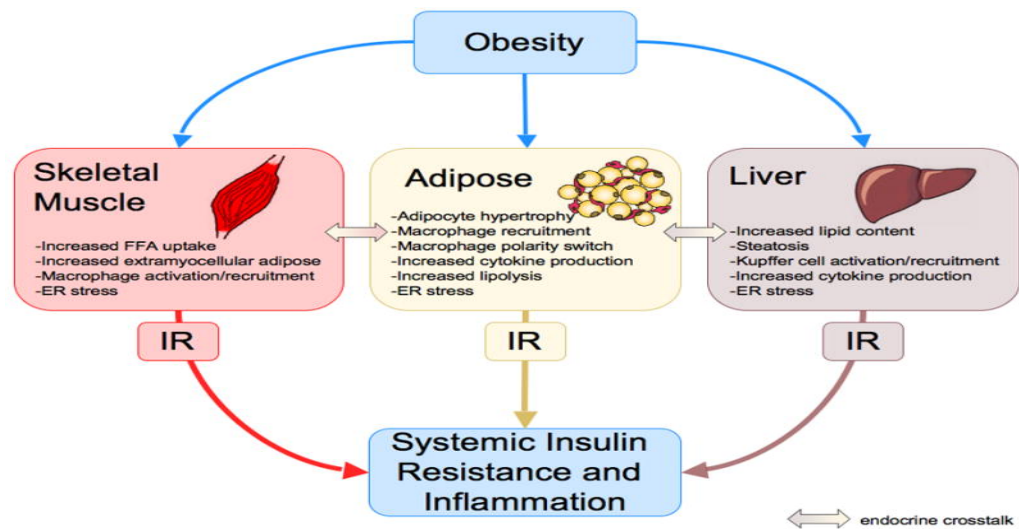


**Figure 4: Mécanisme proposé décrivant la glucolipotoxicité.** L'hyperglycémie chronique entraîne une glucotoxicité pour les cellules pancréatiques qui affecte la sécrétion d'insuline et la réduction de l'expression de son gène. Parallèlement, la lipotoxicité qui résulte de l'exposition chronique aux acides gras entraîne aussi un défaut de l'expression du gène de l'insuline. Les deux phénomènes occasionnent la dysfonction de la cellule  $\beta$  (Ref: Isma B).

### La résistance à l'insuline

Un autre facteur qui contribue à la pathophysiologie du diabète de type 2 est la résistance à l'insuline. Comme l'insuline est responsable de maintenir l'euglycémie via le captage du glucose par les tissus insulino-sensibles tels les tissus adipeux et les muscles, la résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline progresse donc le plus souvent vers le développement du diabète de type 2 (15). Cette résistance se développe à la suite d'insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques et est associée à un excès de nutriments (16). Cet excès de nutriments introduit un état inflammatoire

systemique et un stress du réticulum endoplasmique qui mènent à une résistance à l'action de l'insuline des tissus périphériques. Le mécanisme de résistance à l'action de l'insuline est engendré en partie par la production de cytokines pro-inflammatoires et de leur récepteurs qui inhiberont la transmission du signal de l'insuline à son récepteur. La source principale de la libération de ces cytokines se fait par les tissus cibles eux-mêmes, principalement par les tissus adipeux et le foie. Ceci va se traduire par la réduction du recaptage du glucose par les muscles, une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes et une activation de la gluconéogenèse hépatique. Ainsi, ce sont par ces mécanismes que la population diabétique développera une hyperglycémie et une dyslipidémie (Figure 5) (17).



**Figure 5. L'obésité et le développement de l'inflammation et de la résistance de l'insuline.** L'obésité entraîne un changement dans les muscles squelettiques, le tissu adipeux et le foie, ce qui cause une inflammation localisée et une résistance à l'insuline (IR) par des voies autocrines et paracrines (Ref : De Luca C) (17).

### **La diminution de la masse de la cellule $\beta$**

En plus des éléments mentionnés ci-haut, d'autres facteurs provoquent l'hyperglycémie. La réduction de la masse des cellules  $\beta$ -pancréatiques causée par un taux trop élevé de la mort de ces cellules est aussi responsable de l'élément prédominant des complications à long terme associées au diabète, l'hyperglycémie (18). Plusieurs études sur le diabète de type 1, entre autres sur les animaux et sur les humains, ont illustré une réduction de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique. En effet, des études sur la transplantation ont démontré que le défaut métabolique chez les patients souffrant du diabète de type 1 pouvait être rétabli par une restauration des cellules  $\beta$ -pancréatiques (19) (20). Plusieurs données animales (21) ont fortement suggéré que le défaut de la sécrétion de l'insuline dans le diabète de type 2 est en partie lié à la réduction de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Ces données sont récentes et à l'heure actuelle cette théorie est encore une idée controversée dans le modèle humain du diabète de type 2. En ce qui concerne les sujets humains, plusieurs théories sont partagées entre une prédisposition génétique et des causes environnementales telle la glucolipotoxicité (mentionnée plus haut). Une augmentation de l'apoptose des cellules  $\beta$ -pancréatiques peut prévenir une augmentation compensatrice de la masse des cellules  $\beta$  dans le diabète de type 2 (21). Ainsi, en raison de la grande variation entre les sujets, il est très difficile de récolter des données constantes sur la mesure de la cellule  $\beta$ -pancréatique chez les sujets humains. Néanmoins, plusieurs études ont clairement démontré

qu'il y a une diminution d'au moins 20 % de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique chez les patients souffrant du diabète de type 2 (22) (23).

**La diminution de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique entraîne sa dysfonction.**

Au stade embryonnaire et fœtal, les cellules  $\beta$  subissent une différenciation et une prolifération. La prolifération ne demeure pas statique de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Elle s'adapte en réponse aux lésions et aux stimuli comme l'ingestion de nutriments. La masse de la cellule  $\beta$  est maintenue par un processus actif, soit l'augmentation à travers la formation de nouvelles cellules à partir de leurs précurseurs, de l'hyperplasie et l'hypertrophie. Ainsi, la mort des cellules  $\beta$  sert de contre-régulateur à ce processus actif.

**Chapitre 4 – Mécanismes de l'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique**

**La prolifération de la cellule  $\beta$ -pancréatique**

Le développement d'une insulino-résistance périphérique entraîne une demande accrue d'insuline dans les îlots de Langerhans. Malgré cette résistance, l'hyperplasie compensatrice des îlots pancréatiques associée à une augmentation de la masse de la cellule  $\beta$  et de la production d'insuline est un mécanisme essentiel au maintien de l'euglycémie. L'altération de la

signalisation insulinique dans les cellules  $\beta$  et l'apoptose accrue de celles-ci sont associées à l'apparition du diabète chez des sujets obèses (24).

### **Adaptation de la cellule $\beta$ -pancréatique**

L'adaptation de la cellule  $\beta$ -pancréatique est une réponse à l'insulinorésistance qui se manifeste par l'augmentation de la sécrétion de l'insuline et par l'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$ . Émettant plusieurs hypothèses, le groupe de Butler et coll. a démontré que la masse de la cellule  $\beta$  augmente davantage chez les sujets obèses non diabétiques que chez les sujets normaux et qu'elle diminue autant chez les individus obèses avec une glycémie anormale à jeun que chez les individus souffrant de diabète de type 2 (25). En soit, ces observations suggèrent que la compensation de la cellule  $\beta$ -pancréatique en réponse à la résistance à l'insuline entraîne une augmentation de la masse qui survient progressivement chez les sujets diabétiques, s'atténue par la suite pour finir par causer son dysfonctionnement.

L'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique résulte de la prolifération des cellules déjà présentes. Par contre, cette hypothèse reste à ce jour encore débattue. En effet, s'il est clairement établi que la réplication de la cellule  $\beta$  joue un rôle dans le modèle de souris (26), les faits démontrent que la prolifération, chez les sujets adultes humains, serait assez faible (27).

De plus, il a été démontré que la néogenèse des cellules du canal de Wirsung et acinaires du pancréas pouvait aussi jouer un rôle important dans l'augmentation

de la masse de la cellule  $\beta$ . Comme décrit en biologie, la néogenèse correspond à la formation d'un nouveau tissu ou groupe de cellules. Pour leur part, Inada et coll. ont démontré que la néogenèse des cellules du canal de Wirsung contribue grandement à la formation des nouvelles cellules  $\beta$ -pancréatiques lors son adaptation (28). Des études plus récentes effectuées sur des primates ont démontré que la néogenèse est la source principale de production de 80 % des cellules  $\beta$  adultes nouvellement formées (28).

La signalisation et le mécanisme moléculaire qui lie la compensation de la cellule  $\beta$ -pancréatique à la résistance à l'insuline sont encore méconnus. Par contre, une étude met en évidence le rôle de la signalisation de l'insuline dans le foie et les cellules  $\beta$ -pancréatiques. En effet, selon Michael et coll., la perturbation de la signalisation de l'insuline dans le foie résulte d'une résistance à l'insuline. À son tour, cette résistance pourrait conduire à l'hyperplasie de la cellule  $\beta$ -pancréatique (29), comme l'ont aussi démontré Escribano et coll. par la délétion du récepteur à l'insuline dans le foie (30). De plus, le rôle des signaux neurologiques aurait aussi un enjeu sur la compensation de la cellule  $\beta$ , comme l'ont démontré Imai et coll. à la suite d'une vagotomie pancréatique qui aurait aboli la prolifération cellulaire en réponse à une résistance à l'insuline au niveau du foie (31). Enfin, El Ouaamari et coll. ont proposé que des facteurs circulants dérivés du foie puissent jouer un rôle dans l'adaptation de la cellule  $\beta$ -pancréatique en réponse à une résistance à l'insuline (32).

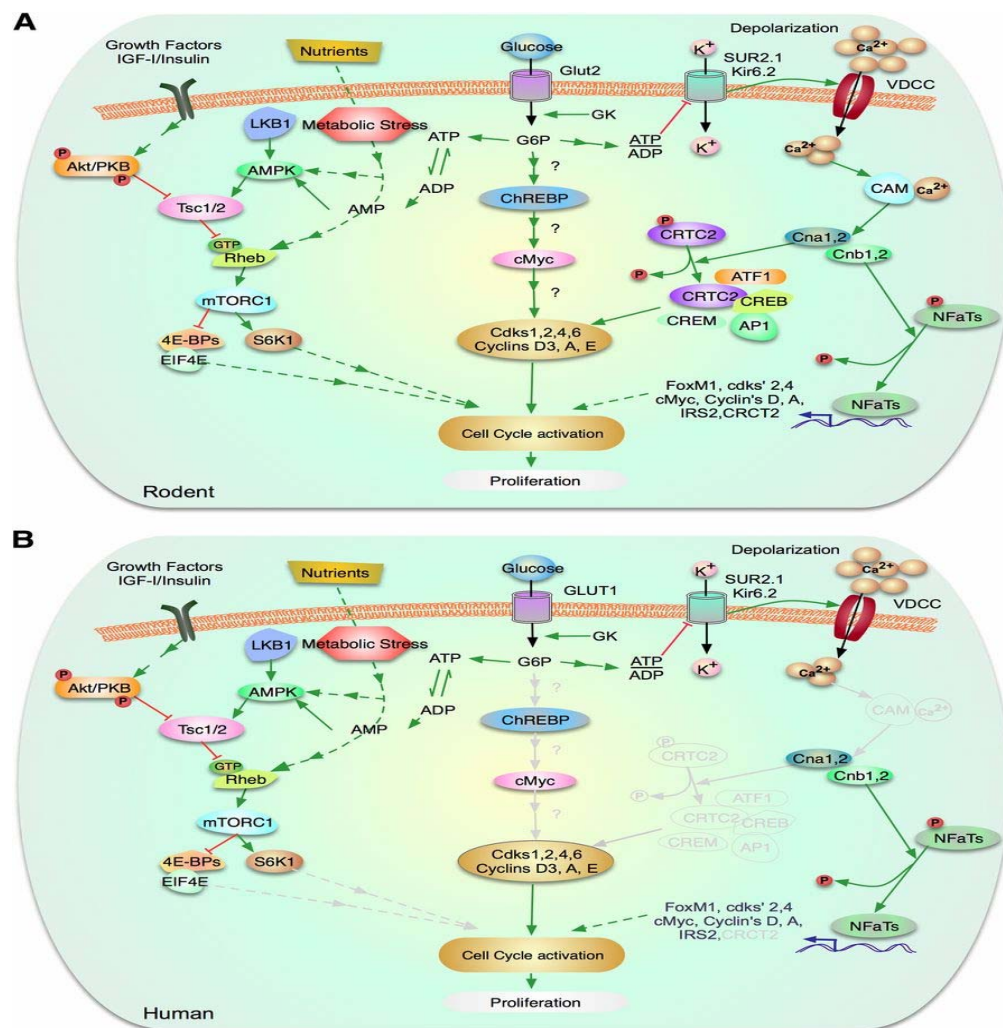


### **Prolifération de la cellule $\beta$ -pancréatique**

La prolifération dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques chez les sujets humains a été l'objet d'un grand débat au cours des dernières années dans la recherche sur le diabète de type 1 et de type 2. En effet, un des buts principaux des chercheurs dans le domaine du diabète est de développer une approche thérapeutique pour induire la réplication et l'augmentation de la masse des cellules  $\beta$  chez l'humain souffrant du diabète. Malheureusement, plusieurs groupes ont observé que le taux de réplication de la cellule  $\beta$  chez l'humain est très faible (environ 0,2 % de cellules/24 heures) et que les cellules répondent très peu aux différents facteurs de croissance, mitogènes et nutriments. Des études ont aussi démontré une augmentation de la taille des cellules chez les rongeurs (33).

Au cours des deux dernières décennies, une progression notable dans la compréhension du rôle du contrôle des facteurs de transcription dans la cellule  $\beta$  chez les sujets murins et humains a été observée. À ce jour, les différentes recherches ont démontré le rôle primordial de l'implication du cycle cellulaire des cellules  $\beta$  chez les humains et les souris. Par contre, un des domaines les moins étudiés dans les cellules  $\beta$  dans le modèle humain est le réseau intracellulaire de signalisation qui lie l'action des nutriments extracellulaires et des facteurs de croissance retrouvés à la surface des cellules  $\beta$ -pancréatiques et la machinerie du cycle cellulaire. En effet, tel qu'il a été mentionné plus haut, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la croissance de la cellule

$\beta$ -pancréatique, telles la voie de l'insuline-PI3K-AKT, la voie de GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*) et la voie de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) /S6 kinase, pour ne nommer que celles-ci. De plus, au cours des dernières années les recherches incluant des nutriments comme le glucose, les facteurs de croissance (EGF (*epidermal growth factor*), la leptine, œstrogène et la progestérone) sur d'autres facteurs impliqués dans cette prolifération ont été approfondies. (Figure 6) (33).



**Figure 6.** La voie de signalisation à partir du glucose vers la prolifération des cellules  $\beta$  via mTOR, ChREBP/cMyc A: le mécanisme de signalisation dans les

cellules  $\beta$  chez le modèle de rongeurs. **B**: le mécanisme de signalisation dans les cellules  $\beta$  chez le modèle humain (Ref. : Kulkarni RN) (34).

### **Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF)**

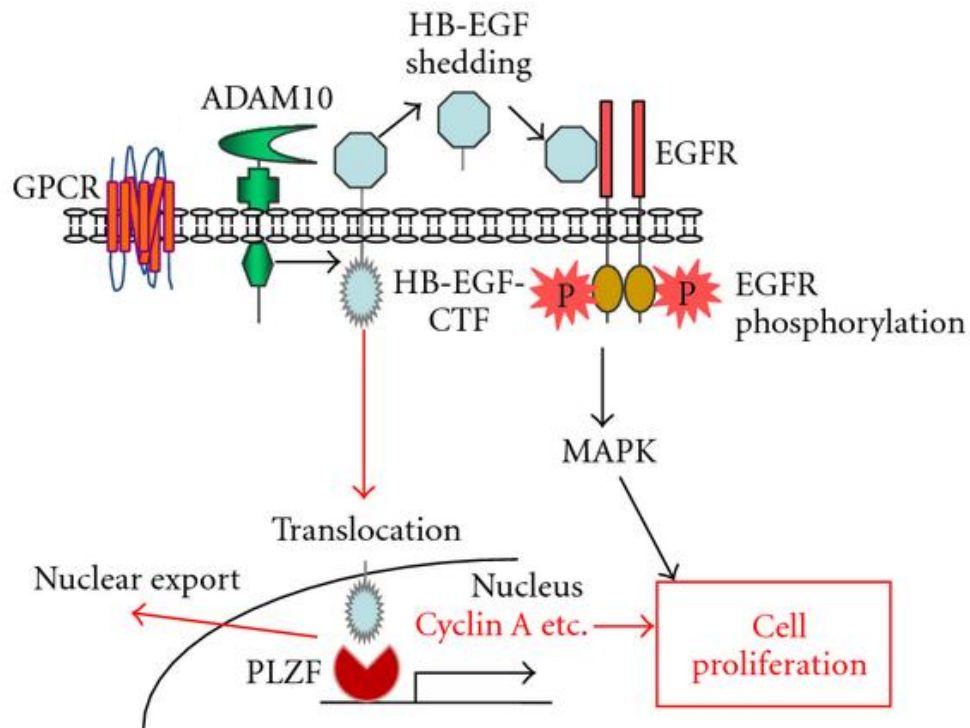
HB-EGF fait partie de la famille du facteur de croissance EGF mentionné plus haut. HB-EGF a été purifié à partir d'un milieu de cellules U937. Le gène de HB-EGF est composé de six exons et de cinq introns codant pour 208 acides aminés et correspondant à la protéine pro HB-EGF sur le chromosome 5 chez l'humain et 18 chez la souris. Pro HB-EGF contient un domaine extracellulaire clivé par une métallo protéase (ADAM) pour produire la forme de HB-EGF soluble et mature (35). Les domaines carboxy-terminaux, solubles et matures de HB-EGF sont d'importants stimulateurs de la prolifération cellulaire, et ce, par une action directe ou indirecte du récepteur de l'EGF (36) (37) (38).

En effet, les ligands de la famille EGF peuvent induire une signalisation juxtacrine, autocrine, paracrine ou endocrine, selon l'environnement cellulaire du peptide sécrété (39). L'induction de cette signalisation résulte de la transactivation par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les cellules reçoivent plusieurs signaux extracellulaires par différents récepteurs à leur surface. Ces signaux se transmettent à la cellule par différentes voies de signalisation. Plusieurs diaphonies sont possibles entre ces signaux. Dans la plupart des cas, ces diaphonies surviennent entre les voies de signalisation, mais peuvent aussi survenir directement entre les récepteurs membranaires, par exemple dans le cas des RCPG et du récepteur à l'EGF. Cette diaphonie entre

récepteurs, plus communément appelée transactivation, survient dans ce cas avec la libération de HB-EGF par son clivage à l'aide d'une métalloprotéase, à la suite d'un médiateur libéré par les RCPG (40). L'activation de HB-EGF se fait à travers une transactivation entre deux récepteurs qui induit l'activation de plusieurs voies de signalisation (**Figure 7**). Le HB-EGF peut aussi être inhibé par des inhibiteurs spécifiques. L'inhibiteur le plus commun pour HB-EGF est le *Cross-reacting material 197* (CRM 197), une variante non toxique de la toxine de Diphtérie isolée de cultures cellulaires de *Corynebacterium diphtheriae*. Afin de bloquer son activité mitogénique par l'inhibition de la liaison au récepteur de l'EGF, CRM 197 va se lier à la forme retrouvée chez l'humain de HB-EGF (41).

HB-EGF est exprimé chez l'animal, de même que chez l'humain. Il est aussi abondamment exprimé dans les cellules fœtales du pancréas et les cellules primaires du canal de Wirsung. L'expression génique de ce facteur est partiellement régulée par PDX-1 (Pancreatic Duodenal Homeobox 1) et, inversement, il a été rapporté que HB-EGF régule positivement le promoteur du gène de PDX-1 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (42). Ainsi, dans un modèle de régénération partielle du canal acinaire chez la souris, il y a augmentation de l'expression du gène de HB-EGF. Dans ce modèle, il a été démontré que l'expression de HB-EGF par les cellules acinaires induisait la prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques déjà existantes et la différenciation de celles-ci en

cellules acinaires, ce qui améliorerait par la suite la tolérance au glucose par l'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$  (42).



**Figure 7. Voie de signalisation de HB-EGF menant à la prolifération cellulaire.** L'activation de récepteurs couplés aux protéines G, envoie un signal intrinsèque induisant le clivage de Pro HB-EGF par la métalloprotéase ADAM10, produisant la forme mature de HB-EGF. La partie soluble de HB-EGF va se lier au récepteur de l'EGF et induire des cascades de signalisation sous-jacentes, comme la voie des MAP kinase qui va induire l'activation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Ref : Yan Y) (40).

### **Récepteur de la famille *Epidermal Growth Factor* (EGF)**

Le récepteur de l'EGF se trouve à la surface de la membrane cellulaire. Il est un récepteur extracellulaire de ligand protéique. EGFR est membre de la famille des récepteurs ErbB qui comporte quatre sous-familles de type récepteur tyrosine kinase, soit EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) et Her 4 (ErbB-4). La signalisation du récepteur de l'EGF en réponse aux facteurs de croissance est essentielle pour plusieurs processus morphogéniques et toute activité incohérente des membres de la famille de ce récepteur peut entraîner un défaut dans le développement et dans la croissance cellulaire. Par sa structure, le récepteur de l'EGF permet aux signaux d'être transmis à travers la membrane plasmique où ils activent l'expression des gènes et induisent une réponse cellulaire telle que la prolifération. L'activité tyrosine kinase du récepteur à l'EGF est régulée par la dimérisation du récepteur, les monomères étaient inactifs. De nombreux ligands peuvent activer le récepteur par liaison à son domaine extracellulaire et inductrice d'une conformation homodimérique ou hétérodimérique. Les résidus tyrosine sur un récepteur est alors phosphorylés par son récepteur apparié et forme un site d'échafaudage pour des complexes de signalisation se trouvant dans le cytoplasme. À la suite de la phosphorylation, des voies mitogéniques telles les voies de MAPK, AKT et PK seront activées (43). À l'inverse, plusieurs molécules inhibent les voies induites par EGFR, dont la plus commune est AG1478.

## **Différentes voies de signalisation en aval du récepteur de l'EGF Protein kinase B (Akt)**

Akt est une protéine kinase sérine/thréonine qui joue un rôle prédominant dans plusieurs fonctions cellulaires, telles le métabolisme du glucose, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la transcription et la migration cellulaire. Akt existe en trois isoformes chez le mammifère : Akt1 est retrouvée dans une large distribution de tissu; Akt2 est prédominante dans les cellules adipeuses et musculaires; et la protéine Akt3 est exprimée dans les testicules et le cerveau. Les protéines Akt est activées par plusieurs facteurs de croissance, hormones et cytokines, et ce, par leur liaison aux récepteurs tyrosine kinase, récepteurs de cytokines ou bien RCPG. Aussi, Akt se lie à PIP3 (Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate) par son domaine PH (*pleckstrin homology*). Cette liaison provoque une translocation de Akt à la membrane. Cette activation se fait à travers deux mécanismes de phosphorylation. PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1), qui est aussi transporté à la membrane par son domaine PH, phosphoryle Akt par sa boucle d'activation sur Thr308. Enfin, une seconde phosphorylation sur la Ser473 doit aussi avoir lieu pour que se réalisent son activité et son transport par le complexe mTOR/rictor/ mTORC2 (44).

Plusieurs molécules ou facteurs peuvent inhiber ou réguler négativement Akt. Parmi les molécules et les facteurs, on peut nommer la phosphatase de lipides PTEN (Phosphatase and tensin homolog), qui déphosphoryle PIP3; PP2A (protéine phosphatase 2A); PHLPP (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatases) et LY294002 (45). Néanmoins, une signalisation aberrante d'Akt est observée dans plusieurs pathologies sévères. Par exemple, le développement du cancer chez l'humain où Akt est constamment activée mène à une prolifération cellulaire incontrôlée. En raison de son rôle dans la croissance de cellules cardiaques, l'angiogenèse et l'hypertrophie, Akt est aussi un facteur primordial dans les maladies cardiovasculaires. (46).

Akt joue un rôle dans l'activation positive de plusieurs substrats en aval. Ces substrats possèdent tous une séquence consensus RXXRXXS/T. Une des fonctions principales de leur activation est de promouvoir la croissance cellulaire et la synthèse protéique à travers la régulation de la voie de signalisation de mTOR. Ainsi, Akt phosphoryle et active directement ou indirectement mTOR par l'inhibition de la protéine PRAS40 (Proline-rich Akt substrate of 40 kDa) et tubérine, deux inhibiteurs de mTOR. Enfin, cette activation promeut la croissance cellulaire et la progression du cycle cellulaire (G1), et ce, par l'activation de p70S6Kinase et l'inhibition de 4EBP1 (4E-binding proteins 1), tous deux en aval de mTOR (47).



### **The mammalian target of rapamycin (mTOR)**

La cible de la rapamycine (mTOR) est une sérine / thréonine kinase conservée qui régule la croissance et le métabolisme cellulaire en réponse à divers stimuli environnementaux. mTOR est composée de deux complexes multiprotéiques distincts : TOR complexe 1 (TORC1), qui est sensible à la rapamycine (composée de mTOR, Raptor, GβL (mLST8) et Deptor), et TOR complexe 2 (TORC2), qui n'est pas sensible à la rapamycine. Un défaut de la régulation de TORC1 entraîne plusieurs conséquences comme une augmentation de l'autophagie, un arrêt de transcription de plusieurs gènes et la diminution de synthèse des protéines, suggérant que les inhibiteurs de TOR peuvent être utiles dans le traitement du cancer, des maladies cardiovasculaires, de l'auto-immunité et des dysfonctions métaboliques (48). Ainsi, l'activation de cette voie se fait par l'inhibition de TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2). En effet, lorsqu'Akt est elle-même activée, elle phosphoryle TSC2. Ainsi, Akt ne pourra inhiber davantage Rheb (une petite protéine GTPase) qui activera à son tour mTOR. À faible niveau d'énergie, l'AMPK (AMP-activated protein kinase) phosphoryle et active TSC2 qui inhibe Rheb et mTOR par conséquent, ce qui occasionne une réduction de la synthèse de protéine (49).

Les substrats en aval de mTORC1 sont 4E-BP1 et pS6K1-2 (50). La fonction de 4E-BP1 est d'être un répresseur de la traduction quand celui-ci n'est pas phosphorylé. Pour induire la croissance cellulaire et la prolifération, mTOR procède à la phosphorylation de 4E-BP1; la traduction de l'ARNm peut donc

avoir lieu. De plus, S6K peut aussi réguler la croissance cellulaire et la prolifération, et ce, d'une manière complètement dépendante de la signalisation de mTORC1 par la phosphorylation de la Thr389 (51) (52). En effet, S6K1 a tout d'abord été identifiée comme une kinase de la protéine ribosomale S6 (rpS6). Toutefois, la fonction principale de la phosphorylation de rpS6 par S6K1 est encore méconnue. D'autres cibles de la kinase S6 sont SKAR, eIF4B et eEF2K. Grâce à toutes ces cibles en aval, S6K influence donc considérablement le niveau de synthèse protéique dans les cellules (53).

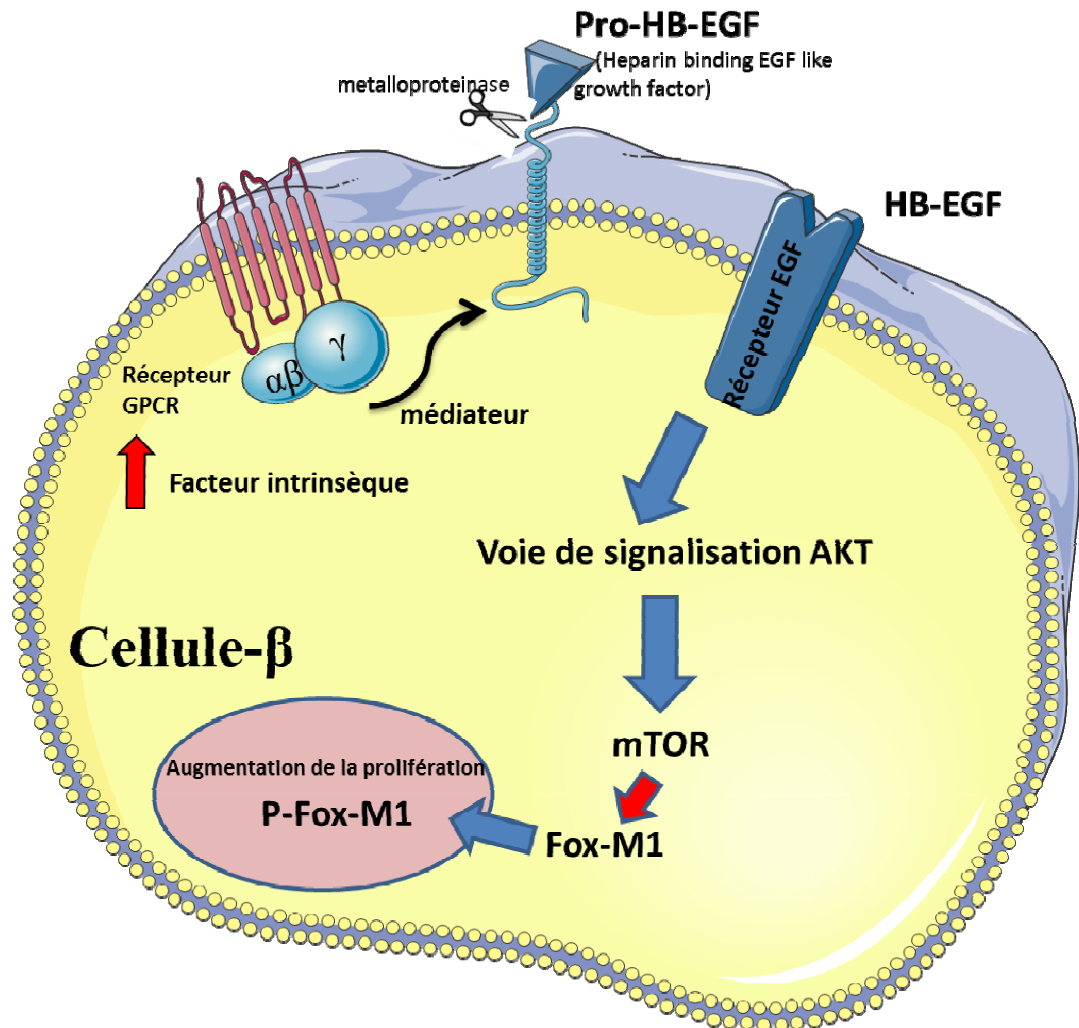
### **Forkhead box protein M1 (FoxM1)**

FoxM1 est un membre de la famille de facteurs de transcription Forkhead. La protéine FoxM1 existe en trois différentes isoformes : FoxM1b et FoxM1c, qui sont tous deux transcriptionnellement actifs, et FoxM1a, qui est transcriptionnellement inactif. Initialement, FoxM1 a été décrit comme un facteur de transcription exclusivement spécifique à la prolifération chez les mammifères (54). Ainsi FoxM1 est exprimé dans les cellules en prolifération, mais est exclu des cellules en différenciation terminale ou en phase de quiescence. Les niveaux protéiques et de l'ARN messager de FoxM1, augmentent lorsque la cellule entre dans sa phase S du cycle cellulaire et continuent à être élevés pendant la phase G2 et M (55). Plus le cycle cellulaire progresse, plus l'activité transcriptionnelle de FoxM1 augmente dépendamment de sa phosphorylation par Cyclin B et Cdk1. Par la suite, FoxM1 est

hyperphosphorylé par de multiples protéines kinases et atteint son activité maximale à la phase G2/M (56).

Lors de la transition de la phase G2/M et pendant la mitose, FoxM1 est essentielle pour l'expression de cyclines et de protéines kinases, comme Aurora B, Polo-like kinase-1. (57).

Ainsi, FoxM1 semble être impliqué dans nombreux types cellulaires et apparait être un gène indispensable pour la régulation de la transcription du cycle cellulaire des cellules  $\beta$  (**Figure 8**). Le groupe de Gannon et coll. a démontré à l'aide d'un modèle murin avec inactivatrice de FoxM1 spécifiquement dans le pancréas que FoxM1 est indispensable pour la prolifération cellulaire chez l'adulte, le maintien de la masse cellulaire et l'augmentation de la masse cellulaire en réponse à une pancréatectomie partielle et durant la grossesse (58).



**Figure 8. Modèle de transactivation et mécanisme de prolifération dans la cellule  $\beta$ .** Modèle de transactivation par les RCPG en réponse à un facteur intrinsèque. Suite à ce stimulus, Pro-HB-EGF sera clivé par une métalloprotéase. La forme active, HB-EGF se lie au récepteur à l'EGF, qui active la cascade de signalisation AKT/mTOR/FoxM1. Enfin, lorsque FoxM1 est phosphorylé, celui-ci contrôle le cycle cellulaire et, par conséquent, il y a augmentation de la prolifération cellulaire (Ref: Isma B.).

## Chapitre 5 – Mise en contexte de la thèse

### Problématique

Le diabète de type 2 résulte d'une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots de Langerhans et d'une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Au cours de l'évolution de la maladie, une diminution de la sécrétion d'insuline se produit, résultant notamment d'anomalies du métabolisme lipidique. Une exposition prolongée des cellules  $\beta$ -pancréatiques à des concentrations élevées de glucose et d'acides gras, appelée glucolipotoxicité, induit un dysfonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatiques, se traduisant par une diminution de la sécrétion d'insuline et de l'expression du gène de l'insuline (59). Dans notre laboratoire, nous avons établi un modèle *in vivo* de rats Wistar de six mois perfusés simultanément pendant 72 heures avec du glucose (12 mmol/l) et de l'intralipide (1 mmol/l). Nous avons observé ainsi dans ce modèle une diminution de la fonction de la cellule  $\beta$  associée à une augmentation de la prolifération et de la masse de ces cellules, qui cependant reste insuffisante pour compenser la résistance à l'insuline. Dans ce même modèle de rats perfusés, nous avons identifié, par analyse transcriptomique dans les îlots de Langerhans, l'augmentation de facteurs sécrétés tels que le facteur de croissance HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor). Ainsi, dans cette étude, nous voulons étudier le lien qu'aurait ce facteur de croissance avec la prolifération de la cellule  $\beta$ .

### **Hypothèse et objectif du mémoire**

Ainsi, avec l'augmentation de la résistance à l'insuline et des facteurs circulants dans les rats de six mois perfusés, nous avons émis **l'hypothèse** que le facteur de croissance HB-EGF, par son activation par des métalloprotéinases, activerait le récepteur de l'EGF et des voies de signalisation subséquentes impliquées dans la prolifération de la cellule  $\beta$ .

**Objectif** : L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer la capacité d'HB-EGF à promouvoir la prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques par l'activation des voies de signalisation telles les voies de AKT, de ERK1/2 et de mTOR.

### **Publications**

Les travaux de recherche de ce mémoire ont mené à la rédaction d'un article de recherche original :

**Zarrouki B, Benterki I, Fontés G, Peyot M-L, Seda O, Prentki M and Poitout V.** *Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Promotes Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation in Response to Nutrient Excess in Rats through mTOR and FOXM1.* Diabetes Vol. 63, 2014; 982-993

Ce mémoire a également mené à la publication de deux articles à titre de deuxième auteure :

1. Amyot J, **Benterki I**, Fontés G, Hagman D, Ferdaoussi M, Teodoro T, Volchuk A, Joly E and Poitout V. *Binding of Activating Transcription Factor 6 to the A5/Core of the Rat Insulin II Gene Promoter does not Mediate its Transcriptional Repression.* J Mol Endocrinol, 2011. 47(3): p. 273-283.
2. Fontes G, **Benterki I**, Zarrouki B, Berthiaume Y, Poitout V. *The  $\Delta F508$  Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator is Associated with Progressive Insulin Resistance and Decreased Functional Beta-Cell Mass in Mice.* En révision dans le journal *Diabetes* sous conditions.

## **Résultats**



**Article**

Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Promotes Pancreatic  $\beta$ -Cell  
Proliferation in Response to Nutrient Excess in Rats through mTOR and  
FOXO1

Bader Zarrouki<sup>1,2,3</sup>, Isma Benterki<sup>1,2,4</sup>, Ghislaine Fontés<sup>1,2</sup>, Marie-Line  
Peyot<sup>1,2</sup>, Ondrej Seda<sup>1,2</sup>, Marc Prentki<sup>1,2,4,5</sup>, and Vincent Poitout<sup>1,2,3,4,5</sup>

Montreal Diabetes Research Center<sup>1</sup>, CRCHUM<sup>2</sup>, and Departments of  
Medicine<sup>3</sup>, Biochemistry<sup>4</sup>, and Nutrition<sup>5</sup>, University of Montreal, QC,  
Canada;

Corresponding Author: Vincent Poitout, DVM, PhD CRCHUM

Word count: Abstract: 198

Main text: 3601

Diabetes Publish Ahead of Print, published online November 5, 2013

## ABSTRACT

The cellular and molecular mechanisms underpinning the compensatory increase in  $\beta$ -cell mass in response to insulin resistance are essentially unknown. We previously reported that a 72-h co-infusion of glucose and Intralipid (GLU+IL) induces insulin resistance and a marked increase in  $\beta$ -cell proliferation in 6-mo-old but not in 2-mo-old Wistar rats. The aim of the present study was to identify the mechanisms underlying nutrient-induced  $\beta$ -cell proliferation in this model. A transcriptomic analysis identified a central role for the forkhead transcription factor FOXM1 and its targets, and for heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF), a ligand of the EGF receptor (EGFR), in nutrient-induced  $\beta$ -cell proliferation. Phosphorylation of ribosomal S6 kinase, an mTOR target, was increased in islets from GLU+IL-infused 6-mo-old rats. HB-EGF induced proliferation of insulin-secreting MIN6 cells and isolated rat islets, and this effect was blocked in MIN6 cells by the EGFR inhibitor AG1478 or the mTOR inhibitor rapamycin. Co-infusion of either AG1478 or rapamycin blocked the increase in FOXM1 signaling,  $\beta$ -cell proliferation, and  $\beta$ -cell mass and size in response to GLU+IL infusion in 6-mo-old rats. We conclude that chronic nutrient excess promotes  $\beta$ -cell mass expansion via a pathway that involves EGFR signaling, mTOR activation, and FOXM1-mediated cell proliferation.

## **Introduction**

Type 2 diabetes occurs when the pancreatic  $\beta$ -cell is unable to compensate for the increase in insulin demand due to insulin resistance in peripheral tissues. The compensatory response of the  $\beta$ -cell to insulin resistance occurs via two mechanisms: enhanced insulin secretion and increased  $\beta$ -cell mass. In obese humans, insulin secretion is considerably enhanced to maintain normoglycemia (1). In addition, investigations in human cadaveric pancreata have shown that  $\beta$ -cell mass is increased in obese non-diabetic compared to lean individuals, but decreased in obese individuals with impaired fasting glucose and type 2 diabetic patients (2). These observations suggest that alterations of the anatomical compensation of the  $\beta$ -cell to obesity may contribute to the onset of type 2 diabetes.

In rodents,  $\beta$ -cell mass expansion is primarily driven by replication of existing cells (3) and is dynamically regulated in response to insulin resistance induced by obesity, high-fat feeding or gestation (4). The molecular mechanisms underlying  $\beta$ -cell compensation to insulin resistance are essentially unknown; however, experimental evidence points to the importance of inter-organ crosstalk between insulin-resistant peripheral tissues and the  $\beta$ -cell. For instance, altered insulin signaling in the liver triggers a large increase in  $\beta$ -cell proliferation (5; 6), and circulating factors likely play a role in  $\beta$ -cell adaptation to insulin resistance (7). Importantly, a recent study showed that human islets

transplanted into mice subjected to an obesogenic diet undergo a compensatory increase in mass through enhanced proliferation (8).

We have established an *in vivo* model of chronic nutrient excess in rats, in which a 72-h co-infusion of glucose and Intralipid (GLU+IL) triggers a marked increase in  $\beta$ -cell mass and proliferation at 6 mo. but not at 2 mo. of age, despite similar levels of hyperglycemia, hyperlipidemia and hyperinsulinemia (9). We surmised that the  $\beta$ -cell proliferative response in this model is driven by insulin resistance in response to nutrient excess, which only occurs in 6-mo-old rats. This model provides a unique opportunity to identify the molecular mechanisms underlying nutrient-induced  $\beta$ -cell proliferation. The aims of this study were therefore 1- to characterize the changes in the islet transcriptome in response to the GLU+IL infusion in 6-mo-old rats; and 2- to identify the molecular mechanisms governing the adaptive increase in  $\beta$ -cell proliferation in response to nutrient excess.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **Reagents and solutions**

RPMI-1640 and FBS were from Invitrogen (Burlington, ON). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) was from Wisent (Saint Bruno, QC). AG1478 and Rapamycin were from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Recombinant Heparin-Binding EGF- like Growth Factor (HB-EGF) was from

R&D systems (Minneapolis, MN, USA). CRM197 was from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

### **Animal infusions and drug treatments**

All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Infusions were performed as previously described (9). Male Wistar rats weighing 250-300 g (~ 2-mo-old) and 500-

600 g (~ 6-mo-old) (Charles River, St.-Constant, QC) were housed under controlled temperature on a 12-h light-dark cycle with unrestricted access to water and standard laboratory chow. The animals were randomized into two groups, receiving either 0.9% saline (Baxter, Mississauga, ON) (SAL) or 70% dextrose (McKesson Canada Corp, Montreal, QC) plus 20% Intralipid (Fresenius Kabi, Sweden; a soybean oil emulsion which generates a mixture of approximately 80% unsaturated / 20% saturated fatty acids when co-infused with heparin (10)) with 20 U/ml heparin (Sandoz Canada, Boucherville, QC) (GLU+IL). Infusions were performed using Harvard infusion pumps (Pump 33; Harvard Apparatus) independently operating two syringes simultaneously. During the infusions, all animals had unrestricted access to food and water. For drug administration, AG1478 or rapamycin were dissolved in N, N-dimethylacetamide (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to a concentration of 50 mg/mL and then diluted in propylene glycol to generate a 2 mg/mL stock solution. Daily, the stock solution was diluted to the working concentration in

1.2% Tween 80 / 27% polyethylene glycol 400 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and injected intravenously at a dose of 0.5 mg/kg/d. The control group was injected with the same volume of vehicle.

### **Cell culture**

MIN6 cells (passage 25–30) were cultured as previously described (11). Cells were seeded in six-well plates at a density of 500,000 cells/well. The following day, the cells were cultured in complete medium with increasing concentrations of HB-EGF in the absence or presence of inhibitors for an additional 24 h. For cell counting, cells were fixed with 10% formaldehyde, nuclei were stained by Hoechst reagent (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and ten images per well were taken randomly. Cell numbers were determined using ImageJ software (NIH).

### **Rat islet proliferation**

Isolated rat islets were dispersed and plated in 96-well plates coated with HTB-9 cell extracellular matrix as described (12). Dispersed rat islets were treated for 72h in absence or presence of 100 ng/mL HBEGF in complete islet media. The media was changed every 24 hours. At the end of treatment, cells were fixed and stained for the  $\beta$ -cell marker pancreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1) and the proliferative marker Ki67 as described (13). Proliferation was calculated as percentage of double-positive Ki67+ / PDX-1+ cells over total PDX-1+ population.

### **Human islets**

The use of human islets was approved by the Institutional Ethics Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Isolated islets from non-diabetic human cadaveric donors were provided by the Clinical Islet Laboratory at the University of Alberta and the Integrated Islet Distribution Program (IIDP) sponsored by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) and the Juvenile Diabetes Research Foundation International (JDRFI).

### **Transcriptomic profiling and qRT-PCR validation**

Rat islets were isolated by collagenase digestion and dextran density gradient centrifugation as described previously (14). Total RNA was extracted from 150 islets with TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and purified with RNeasy MinElute cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's protocol. Microarray analysis was performed on total RNA using the GeneChip® Rat Gene 1.0 ST microarrays (5 arrays per group, Affymetrix, Santa Clara, CA). One hundred ng of total RNA was processed using the Ambion® WT Expression Kit (Invitrogen). The resulting fragmented and labeled single-stranded cDNA was processed according to Affymetrix protocol. Partek Genomics Suite (Partek, St. Louis, Missouri) was used for data analysis. The data were normalized by Robust Multichip Average (RMA) algorithm, which uses background adjustment, quantile normalization and

summarization. After correction of statistical significance for multiple comparisons using false discovery rate (FDR,  $p < 0.01$ ), the transcripts significantly and differentially expressed by more than 20% between the GLU+IL and control group were processed for gene set enrichment analyses using Ingenuity Pathways Analysis (application build 192063, content build 14400082; Ingenuity Systems, Inc., Redwood City, CA). Selected genes were validated by qRT-PCR as previously described (9). All qRT-PCR results were normalized to cyclophilin A mRNA levels. Primer sequences are described in Suppl. Table 1.

#### **Analytical measurements**

Plasma glucose and free fatty-acid (FFA) levels were measured using Wako kits (Wako Chemical, Osaka, Japan). Insulin and glucagon were measured by ELISA (Alpco, Windham, NH, USA).

#### **Immunostaining of pancreatic sections**

Pancreata were trimmed of fat, weighed, fixed for 3-4 hours in 4% paraformaldehyde, and cryoprotected overnight in 30% sucrose. Pancreata were then embedded in OCT (TissueTek) and 8  $\mu\text{m}$  sections were obtained by cryosection (Leica). Antigen retrieval was performed using sodium citrate buffer. Primary antibodies and dilutions are listed in Suppl. Table 2. Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA,



USA). Images were taken with a fluorescence microscope (Zeiss, Thornwood, NY). Beta-cell mass and size were determined as previously described (9; 15). To assess  $\beta$ -cell proliferation, insulin<sup>+</sup> and double-positive insulin<sup>+</sup> / Ki67<sup>+</sup> cells were counted manually for at least 2,000  $\beta$ -cells per animal.

### **Immunoblotting**

Twenty  $\mu$ g of proteins from cells or islets were extracted and resolved by SDS-PAGE as described (11). Primary antibodies are listed in Suppl. Table 2. Signals were detected using a horseradish peroxidase–labeled IgG (BioRad, Richmond, CA) and enhanced chemiluminescence (ECL; PerkinElmer Las Canada, Woodbridge, ON) on Kodak BioMax XAR films (Kodak, Rochester, NY). The bands were quantified by densitometry and Image J software (NIH).

### **Expression of data and statistics**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using Student's t-test or ANOVA followed by two-by-two comparisons using Bonferroni post-hoc adjustments, as appropriate using GraphPad InStat (GraphPad Software).  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### **Infusion of glucose + Intralipid induces insulin resistance in 6-mo-old Wistar rats.**

In response to the 72-h GLU+IL infusion, circulating blood glucose and FFA raised to similar levels in 2-mo-old and 6-mo-old animals (n=4; NS; Fig 1A&B). Insulin levels also increased in response to the GLU+IL infusion but were not different between the two age groups (n=4, NS; Fig 1C). Consistent with our previous observation in this model (9), significantly less glucose was required to maintain the same level of glycemia in 6-mo-old vs. 2-mo-old rats, suggestive of insulin resistance ( $p < 0.001$ ; n=11-18; Fig 1D). Circulating glucagon levels decreased to the same extent in response to the GLU+IL infusion in both age groups (Fig 1E). Expression of Ki67, a marker of cell proliferation, was strongly induced in response to the GLU+IL infusion in 6-mo-old rats only (Fig 1F). This is also in accordance with the previously observed increase in  $\beta$ -cell mass and number of Ki67-positive  $\beta$ -cells in this model (9).

### **Transcriptional profiling of GLU+IL-infused 6-mo-old rat islets identifies a transcriptional network involved in cell-cycle progression**

To gain insight into the molecular mechanisms involved in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in response to nutrient-induced insulin

resistance, we performed a microarray-based transcriptomic analysis of the islets of 6-mo-old rats. Six-mo-old Wistar rats were infused with either SAL or GLU+IL for 72 h and islets were isolated from 5 animals in each group matched for body weight at the end of the infusion. As shown in Fig. 2A, with a false discovery rate  $< 0.01$ , approximately 3,000 genes were significantly modulated by the GLU+IL infusion. Overall, half of the genes was up-regulated and half was down-regulated. When the cut-off was set to a 2-fold difference between the SAL group and the GLU+IL group, 300 genes were significantly up-regulated, whereas only 30 genes were down-regulated by GLU+IL infusion. Within the 300 up-regulated genes, a group of genes expressed at low levels in the SAL group were strongly up-regulated in the GLU+IL group (lower left corner of the graph in Fig. 2A). Gene set enrichment analysis performed using Ingenuity Pathway Analysis software revealed that these genes were, for the most part, related to cell-cycle progression and mitosis (Fig. 2B). A more detailed analysis revealed that within this group, most of the direct downstream targets of the forkhead transcription factor FOXM1, a key regulator of the G2/M cell cycle transition, were up-regulated by the GLU+IL infusion (Fig. 2C). Interestingly, expression of the forkhead transcription factor FOXO3a, a repressor of FOXM1 (16; 17), was decreased upon GLU+IL infusion (Fig. 2C). In addition, expression of the gene encoding HB-EGF, a potential autocrine/paracrine growth factor inducing  $\beta$ -cell proliferation ((18) and Fig. 2C), was also up-regulated in the GLU+IL group. These changes in

expression were validated by qRT-PCR analysis. First, we verified that expression of the proliferation marker Ki67 was enhanced in the GLU+IL group to the same extent as shown in Fig. 1 (data not shown). Second, we confirmed that expression of FOXO3a was repressed by the GLU+IL infusion (Fig. 3A), while that of HB-EGF, FOXM1, and the direct targets of FOXM1 Aurora kinase B (AURKB) and Polo-like kinase 1 (PLK1) was markedly induced (Fig. 3B-E). FOXM1 protein levels were also significantly increased in the GLU+IL group (Fig. 3F). In accordance with the role of HB-EGF as a trophic factor, its expression in individual samples was positively correlated with that of Ki67, FOXM1, AURKB and PLK1; and negatively correlated with FOXO3a (data not shown). Expression of all these genes remained unchanged in the islet of 2-month old rats upon GLU+IL infusion (Fig. 3A-E). To confirm that this transcriptional network is activated in a more chronic model of nutrient excess, we measured expression of these genes in islets from C57Bl/6 mice fed a high-fat diet for 8 weeks and stratified in two groups according to body weight gain: Low-Diet Responders (LDR) and High-Diet Responders (HDR) (19). Expression of FOXM1, AURKB, and PLK1 was significantly increased in islets from HDR mice, albeit to a lesser extent than in infused rats (Suppl. Fig. 1).

### **HB-EGF promotes $\beta$ -cell proliferation through EGFR and mTOR**

To determine the mitogenic potential of HB-EGF in  $\beta$ -cells, we evaluated its ability to stimulate proliferation of MIN6 cells and dispersed rat islets.

Exogenous HB-EGF dose- dependently increased MIN6 cell proliferation after a 24h treatment (Fig. 4A), and this effect was also observed in dispersed rat islets (Fig. 4B). This was associated with a time- dependent phosphorylation of S6 ribosomal kinase (S6R), a downstream target of mTOR, in both MIN6 cells (Fig. 4C) and human islets (Fig. 4D). The phosphorylation of S6R by HB-EGF in human islets was abolished in the presence of the PI3 kinase inhibitor LY294002 (Fig. 4E-F). The ability of HB-EGF to enhance proliferation of MIN6 cells was similar to that of betacellulin, an EGFR ligand that has been reported to promote  $\beta$ - cell replication both in vitro and in vivo (20; 21) (Fig. 4G). Induction of MIN6 cell proliferation in response to HB-EGF was completely blocked in the presence of the EGFR inhibitor AG1478 or the mTOR inhibitor rapamycin (Fig. 4G and Suppl. Fig. 2), as well as in the presence of CRM197, a diphtheria toxin mutant that binds to and neutralizes HB-EGF (Fig. 4H).

**Inhibition of EGFR signaling and mTOR inhibits  $\beta$ -cell mass expansion,  $\beta$ -cell proliferation, and prevents up-regulation of FOXM1 and its targets in islets from GLU+IL-infused 6-mo-old rats.**

To ascertain the implication of the mTOR pathway in GLU+IL-induced  $\beta$ -cell proliferation, we examined S6R phosphorylation in pancreatic sections from 6-mo-old GLU+IL-infused rats. As shown in Fig. 5, phosphorylation of S6R was strongly increased in islets from GLU+IL-infused rats (Fig. 5B), concomitant

with a marked increase in the number of cells staining positive for Ki67 (Fig. 5A).

To test the importance of the EGFR and mTOR in  $\beta$ -cell proliferation in response to GLU+IL, we treated another group of 6-mo-old rats with AG1478 or rapamycin during the SAL or GLU+IL infusion. In GLU+IL-infused animals, blood glucose and FFA levels were maintained at a similar level irrespective of the drug treatment (Table 1). The glucose infusion rate was not affected by AG1478 but was significantly reduced in the animals treated with rapamycin (Table 1), consistent with the known effect of this drug on insulin resistance (22; 23). In accordance with our previous report in this model (9),  $\beta$ -cell mass was markedly increased in GLU+IL-infused 6-mo-old rats (Fig. 6A). This was also associated with a significant increase in  $\beta$ -cell size (Fig. 6B). Remarkably, treatment of the rats with either AG1478 or rapamycin completely prevented both  $\beta$ -cell hyperplasia (Fig. 6A) and hypertrophy (Fig. 6B). Consistent with the data shown in Fig. 5, the number of KI67+  $\beta$  cells was markedly increased in islets from GLU+IL-infused animals (Fig. 7A-B). This was associated with increased nuclear staining of FOXM1 (Fig. 7C) and AURKB (Fig. 7D). Importantly, the increase in Ki67, FOXM1 and AURKB was totally abolished upon treatment of GLU+IL-infused rats with AG1478 or rapamycin (Fig. 7A-D). Finally, both AG1478 and rapamycin prevented the decrease in FOXO3a and the increase in FOXM1, AURKB, and Ki67 mRNA expression in islets from GLU+IL-infused rats (Fig. 7E).

## DISCUSSION

This study was aimed to characterize the changes in the islet transcriptome in response to nutrient excess and to identify the molecular mechanisms governing the adaptive increase in  $\beta$ -cell proliferation in response to nutrients. Our results show that a 72-h combined infusion of GLU+IL in 6-mo-old rats activates a signaling cascade that leads to the induction of FOXM1 and its downstream targets and is dependent upon EGFR signaling and mTOR activation (Fig. 7F). A potential role of HB-EGF as a mitogenic signal acting through the EGFR and mTOR is supported by both its increased expression in islets from GLU+IL-infused 6-mo-old rats and its ability to activate mTOR and enhance proliferation in MIN6 cells and dispersed rat islets. Importantly, HB-EGF also activates the mTOR pathway in human islets in a PI3 kinase-dependent manner.

In addition to a large increase in insulin secretion, the pancreatic  $\beta$ -cell response to physiological (e.g. pregnancy) or pathological (e.g. obesity) conditions of insulin resistance involves an expansion of  $\beta$ -cell mass which results, at least in part, from replication of existing  $\beta$  cells (3). This compensatory response is crucial to maintain normoglycemia in the face of insulin resistance and thereby prevents the development of type 2 diabetes (24), but its underlying mechanisms are poorly understood. We previously reported that a 72-h infusion of GLU+IL in 6-mo-old Wistar rats induces insulin resistance,  $\beta$ -cell dysfunction, and a marked increase in  $\beta$ -cell proliferation and mass (9). None of

these abnormalities occurred in 2-mo-old animals. Since circulating levels of glucose, FFA, and insulin were similar in 2- and 6-mo-old animals during the infusion, we reasoned that the increase in  $\beta$ -cell mass likely occurs in response to the insulin resistance that only develops in 6-mo-old animals in response to the GLU+IL infusion. In the present study, we confirmed that GLU+IL infusions in 6-mo-old rats led to a marked increase in the expression of the proliferation marker Ki67 (Figs. 1 and 7E) as well as Ki67+  $\beta$ -cells (Figs. 5A and 7A-B), resulting in  $\beta$ -cell hyperplasia and hypertrophy (Fig. 6). Our results may appear in contradiction with a recent study in which glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation in mice was inhibited by co-infusion with lipids (25). However, besides possible species-related differences, the age of the animals and the lipid emulsion (Lyposin, vs. Intralipid in our study) were different, and the levels of circulating glucose and insulin much lower in the study of Pascoe et al (25).

The question arises as to which signals are driving  $\beta$ -cell proliferation in response to the GLU+IL infusion in 6-mo-old rats. In this regard, a recent study clearly demonstrated that circulating factors produced by the liver in insulin resistant states can induce  $\beta$ -cell proliferation of not only rodent but also human islets (26). Our results are consistent with this possibility, although we have not measured liver insulin sensitivity in our model. The implication of neural signals has also been reported (27). Glucose itself is a potent inducer of  $\beta$ -cell proliferation in rodents (25; 28-30), but marked  $\beta$ -cell proliferation can occur under normoglycemia, for instance in liver-specific insulin receptor knock-out



mice (6). Since a common feature of all these models is high circulating levels of insulin, it is conceivable that insulin is the  $\beta$ -cell mitogen. However, hyperinsulinemia is likely a permissive factor for  $\beta$ -cell proliferation (6) but is insufficient by itself ((25) and Fig. 1). Here we have identified a key role for EGFR signaling and a potential involvement of its autocrine/paracrine ligand HB-EGF. Indeed, blocking EGFR signaling prevented the increase in  $\beta$ -cell proliferation both in response to HB-EGF in MIN6 cells (Fig. 4G) and in response to the GLU+IL infusion in 6-mo-old rats (Fig. 7). Consistent with our results, a cell surface proteomic analysis revealed that EGFR is amongst the most highly expressed cell surface kinase receptors in the  $\beta$ -cell (31). EGFR is important for pancreatic  $\beta$ -cell development and postnatal growth (32), and is required for  $\beta$ -cell compensation to high-fat diet and pregnancy in mice (33). Betacellulin, an autocrine/paracrine ligand of the EGFR, is a potent inducer of  $\beta$ -cell proliferation both in vivo and in vitro (20; 21; 34; 35). In addition, over-expression of HB-EGF in adult mice pancreas promotes  $\beta$ -cell proliferation and conversion of ductal cells to insulin-producing cells (18). Downstream of the EGFR, we showed that  $\beta$ -cell proliferation is associated with and dependent upon activation of the mTOR pathway both in vitro (Fig. 4) and in vivo (Figs. 5&7). Our findings are in accordance with the known role of the mTOR pathway in  $\beta$ -cell proliferation in rodent models (36-39) and establish, to our knowledge for the first time in  $\beta$ -cells, a link between the EGFR and mTOR.

Transcription profiling of islets of 6-mo-old infused rats revealed a central role of the forkhead transcription factor FOXM1 in mediating the mitotic progression of the  $\beta$ -cell in response to GLU+IL infusion (Figs. 2&3). Importantly, a similar pattern was observed in high-fat fed mice, a more chronic and milder model of nutrient-induced  $\beta$ -cell proliferation (Suppl. Fig. 1). This is in accordance with the reported role of FOXM1 in adult  $\beta$ -cell replication in response to pancreatectomy (40), pregnancy (41) and obesity (42). The intracellular mechanisms leading to FOXM1 activation remained unknown. In this regard, we have identified a possible reciprocal relationship between FOXM1 and the forkhead transcription factor FOXO3a, where FOXO3a might be acting as an upstream repressor of FOXM1 (Fig. 2 & 3). In rat cardiomyocytes, expression of FOXM1 is negatively correlated with that of FOXO3a (16), and induction of FOXO3a inhibits proliferation through repression of FOXM1 (17).

We acknowledge that there are limitations to the model used in this study. First, the relatively short duration of nutrient excess imposed here is clearly different from the natural history of nutrient-induced insulin resistance in human obesity, which occurs over several decades. Second, important differences exist between rodents and human islets regarding the control and mechanisms of  $\beta$ -cell proliferation (43). These limitations notwithstanding, our findings identify a signaling cascade leading to the activation of the FOXM1 transcription factor through activation of the EGFR/mTOR pathway, and a possible role of the

autocrine/paracrine growth factor HB-EGF. These findings might provide new therapeutic approaches to enhance  $\beta$ -cell mass in insulin resistant states and thereby prevent or delay the occurrence of type 2 diabetes. Further investigations are underway to identify the circulating factors activating the EGFR/mTOR/FOXO1 pathway in this model.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by the U.S. National Institutes of Health (R01DK58096 to V.P.) and the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77686 to V.P.). B.Z. is supported by a postdoctoral fellowship from Eli Lilly. V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta cell Function. M.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Metabolism. We are grateful to G. Fergusson and M. Éthier (CRCHUM) for valuable technical assistance. We thank Drs. James Shapiro and Tatsuya Kin from the University of Alberta, as well as the NIDDK- and JDRFI-sponsored IIDP for providing isolated human islets. B.Z. performed the study, researched data, analyzed the results, and wrote the manuscript. I.B., G.F., M-L.P., and O.S. performed the study, researched data, analyzed the results and reviewed the manuscript. V.P. conceived the study, analyzed the results and wrote the manuscript. M.P. reviewed the manuscript. V.P. is the guarantor of this work and, as such, takes full responsibility for the work. The authors declare no conflict of interest related to this work.

## REFERENCES

1. Reaven GM, Chen YD, Hollenbeck CB, Sheu WH, Ostrega D, Polonsky KS: Plasma insulin, C-peptide, and proinsulin concentrations in obese and nonobese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1993;76:44-48
2. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:102-110
3. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004;429:41-46
4. Sachdeva MM, Stoffers DA: Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol* 2009;23:747-758
5. Escribano O, Guillen C, Nevado C, Gomez-Hernandez A, Kahn CR, Benito M: Beta- Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 2009;58:820-828
6. Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, Yin C, Holzenberger M, Stoffel M, Kulkarni RN: Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8977-8982
7. Flier SN, Kulkarni RN, Kahn CR: Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:7475-7480
8. Gargani S, Thevenet J, Yuan JE, Lefebvre B, Delalleau N, Gmyr V, Hubert T, Duhamel A, Pattou F, Kerr-Conte J: Adaptive changes of human islets to an obesogenic environment in the mouse. *Diabetologia* 2013;56:350-358
9. Fontes G, Zarrouki B, Hagman DK, Latour MG, Semache M, Roskens V, Moore PC, Prentki M, Rhodes CJ, Jetton TL, Poitout V: Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 2010;53:2369-2379
10. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD: Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 1996;97:2728-2735

11. Fontes G, Semache M, Hagman DK, Tremblay C, Shah R, Rhodes CJ, Rutter J, Poitout V: Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2009;58:2048-2058
12. Walpita D, Hasaka T, Spoonamore J, Vetere A, Takane KK, Fomina-Yadlin D, Fiaschi-Taesch N, Shamji A, Clemons PA, Stewart AF, Schreiber SL, Wagner BK: A human islet cell culture system for high-throughput screening. *Journal of biomolecular screening* 2012;17:509-518
13. Annes JP, Ryu JH, Lam K, Carolan PJ, Utz K, Hollister-Lock J, Arvanites AC, Rubin LL, Weir G, Melton DA: Adenosine kinase inhibition selectively promotes rodent and porcine islet beta-cell replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:3915-3920
14. Kelpel CL, Johnson LM, Poitout V: Increasing triglyceride synthesis inhibits glucose- induced insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans. A study using adenoviral expression of diacylglycerol acyltransferase. *Endocrinology* 2002;143:3326-3332
15. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, Trotman WE, Larmie B, Habibovic A, Peshavaria M, Leahy JL: Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 2005;54:2294-2304
16. Sengupta A, Kalinichenko VV, Yutzey KE: FoxO1 and FoxM1 Transcription Factors Have Antagonistic Functions in Neonatal Cardiomyocyte Cell-Cycle Withdrawal and IGF1 Gene Regulation. *Circ Res* 2013;112:267-277
17. Delpuech O, Griffiths B, East P, Essafi A, Lam EW, Burgering B, Downward J, Schulze A: Induction of Mxi1-SR alpha by FOXO3a contributes to repression of Myc- dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 2007;27:4917-4930
18. Kozawa J, Tokui Y, Moriwaki M, Li M, Ohmoto H, Yuan M, Zhang J, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Tochino Y, Shimomura I, Higashiyama S, Miyagawa J: Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector. *Pancreas* 2005;31:32-42
19. Peyot ML, Pepin E, Lamontagne J, Latour MG, Zarrouki B, Lussier R, Pineda M, Jetton TL, Madiraju SR, Joly E, Prentki M: Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory

dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes* 2010;59:2178-2187

20. Li L, Seno M, Yamada H, Kojima I: Promotion of beta-cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology* 2001;142:5379-5385

21. Oh YS, Shin S, Lee YJ, Kim EH, Jun HS: Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS One* 2011;6:e23894

22. Blattler SM, Cunningham JT, Verdeguer F, Chim H, Haas W, Liu H, Romanino K, Ruegg MA, Gygi SP, Shi Y, Puigserver P: Yin Yang 1 deficiency in skeletal muscle protects against rapamycin-induced diabetic-like symptoms through activation of insulin/IGF signaling. *Cell Metab* 2012;15:505-517

23. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, Davis JG, Salmon AB, Richardson A, Ahima RS, Guertin DA, Sabatini DM, Baur JA: Rapamycin- induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 2012;335:1638-1643

24. Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:1802-1812

25. Pascoe J, Hollern D, Stamateris R, Abbasi M, Romano LC, Zou B, O'Donnell CP, Garcia-Ocana A, Alonso LC: Free fatty acids block glucose-induced beta-cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. *Diabetes* 2012;61:632-641

26. El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E, Liew CW, Shadrach JL, Hu J, Katsuta H, Hollister-Lock J, Qian WJ, Wagers AJ, Kulkarni RN: Liver-Derived Systemic Factors Drive beta Cell Hyperplasia in Insulin-Resistant States. *Cell Rep* 2013;

27. Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y: Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 2008;322:1250-1254

28. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC: Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 1989; 38:49-53

29. Levitt HE, Cyphert TJ, Pascoe JL, Hollern DA, Abraham N, Lundell RJ, Rosa T, Romano LC, Zou B, O'Donnell CP, Stewart AF, Garcia-Ocana A, Alonso LC: Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Diabetologia* 2011;54:572-582
30. Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, Scott DK, Kim SK, O'Donnell CP, Garcia-Ocana A: Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* 2007;56:1792-1801
31. Stutzer I, Esterhazy D, Stoffel M: The pancreatic beta cell surface proteome. *Diabetologia* 2012;55:1877-1889
32. Miettinen P, Ormio P, Hakonen E, Banerjee M, Otonkoski T: EGF receptor in pancreatic beta-cell mass regulation. *Biochem Soc Trans* 2008;36:280-285
33. Hakonen E, Ustinov J, Mathijs I, Palgi J, Bouwens L, Miettinen PJ, Otonkoski T: Epidermal growth factor (EGF)-receptor signalling is needed for murine beta cell mass expansion in response to high-fat diet and pregnancy but not after pancreatic duct ligation. *Diabetologia* 2011;54:1735-1743
34. Kodera T, Yamada S, Yamamoto Y, Hara A, Tanaka Y, Seno M, Umezawa K, Takei I, Kojima I: Administration of conophylline and betacellulin-delta4 increases the beta- cell mass in neonatal streptozotocin-treated rats. *Endocr J* 2009;56:799-806
35. Cho YM, Lim JM, Yoo DH, Kim JH, Chung SS, Park SG, Kim TH, Oh SK, Choi YM, Moon SY, Park KS, Lee HK: Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:129-134
36. Blandino-Rosano M, Chen AY, Scheys JO, Alejandro EU, Gould AP, Taranukha T, Elghazi L, Cras-Meneur C, Bernal-Mizrachi E: mTORC1 signaling and regulation of pancreatic beta-cell mass. *Cell Cycle* 2012;11:1892-1902
37. Fraenkel M, Ketzinel-Gilad M, Ariav Y, Pappo O, Karaca M, Castel J, Berthault MF, Magnan C, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G: mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57:945-957
38. Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, Walsh K, Bernal-Mizrachi E: mTORC1 activation regulates beta-cell mass and

proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem* 2009;284:7832-7842

39. Velazquez-Garcia S, Valle S, Rosa TC, Takane KK, Demirci C, Alvarez-Perez JC, Mellado-Gil JM, Ernst S, Scott DK, Vasavada RC, Alonso LC, Garcia-Ocana A: Activation of protein kinase C-zeta in pancreatic beta-cells in vivo improves glucose tolerance and induces beta-cell expansion via mTOR activation. *Diabetes* 2011;60:2546-2559

40. Ackermann Misfeldt A, Costa RH, Gannon M: Beta-cell proliferation, but not neogenesis, following 60% partial pancreatectomy is impaired in the absence of FoxM1. *Diabetes* 2008;57:3069-3077

41. Zhang H, Zhang J, Pope CF, Crawford LA, Vasavada RC, Jagasia SM, Gannon M: Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes* 2010;59:143-152

42. Davis DB, Lavine JA, Suhonen JI, Krautkramer KA, Rabaglia ME, Sperger JM, Fernandez LA, Yandell BS, Keller MP, Wang IM, Schadt EE, Attie AD: FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation. *Mol Endocrinol* 2010;24:1822-1834

43. Kulkarni RN, Mizrahi EB, Ocana AG, Stewart AF: Human beta-cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map. *Diabetes* 2012;61:2205-2213



Fig.1

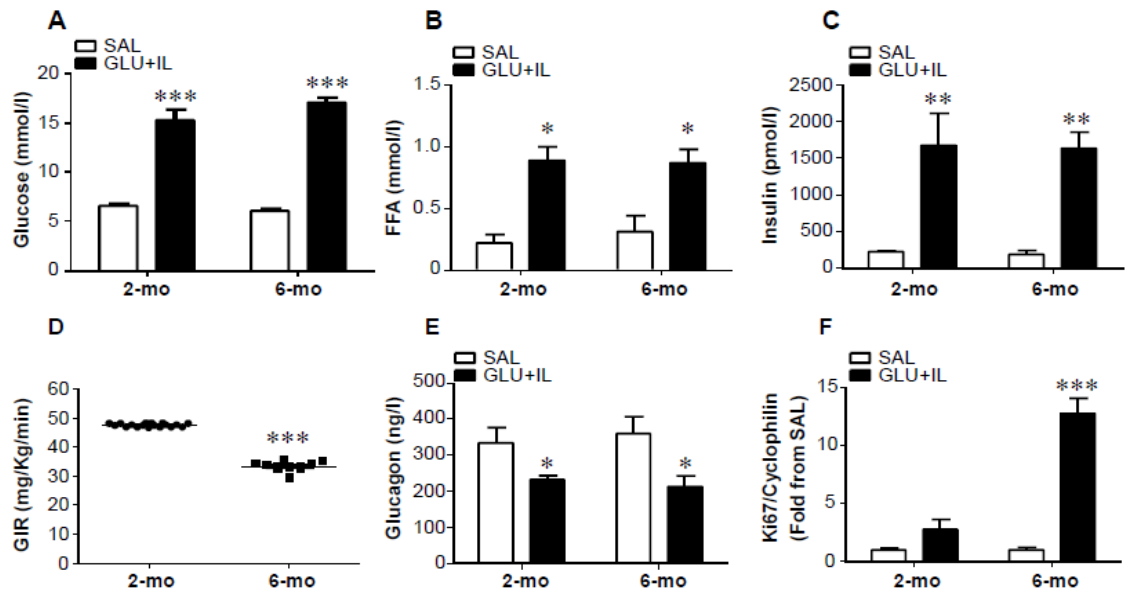


Fig.2

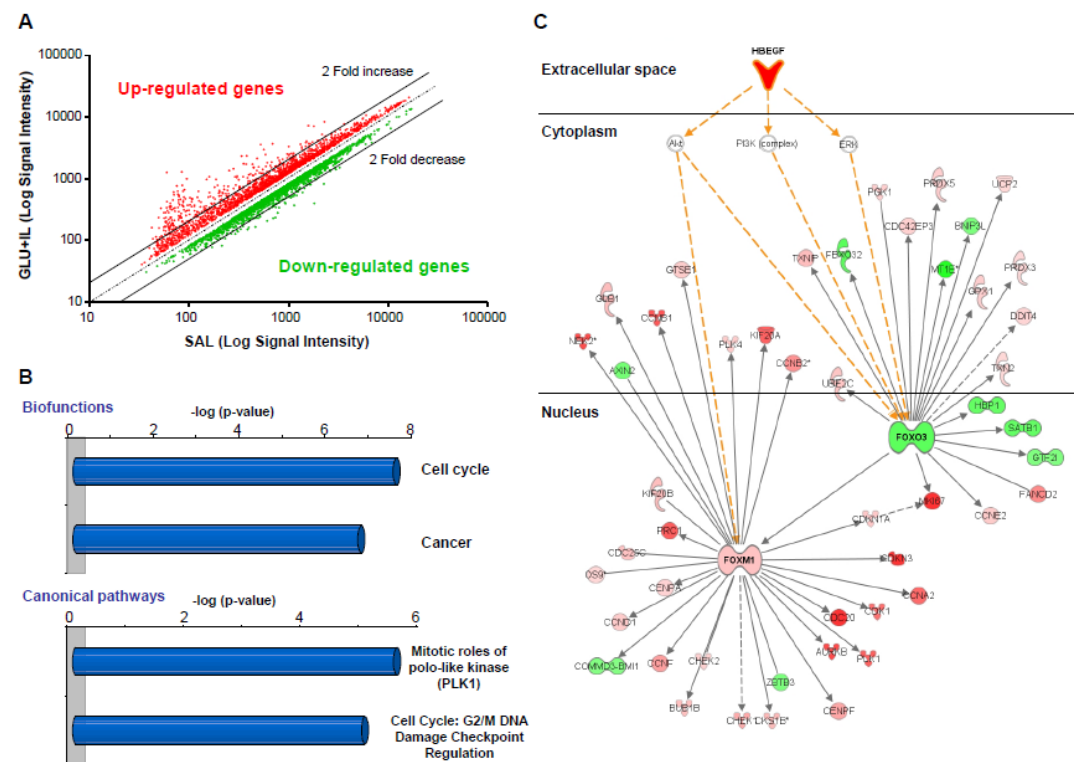


Fig.3

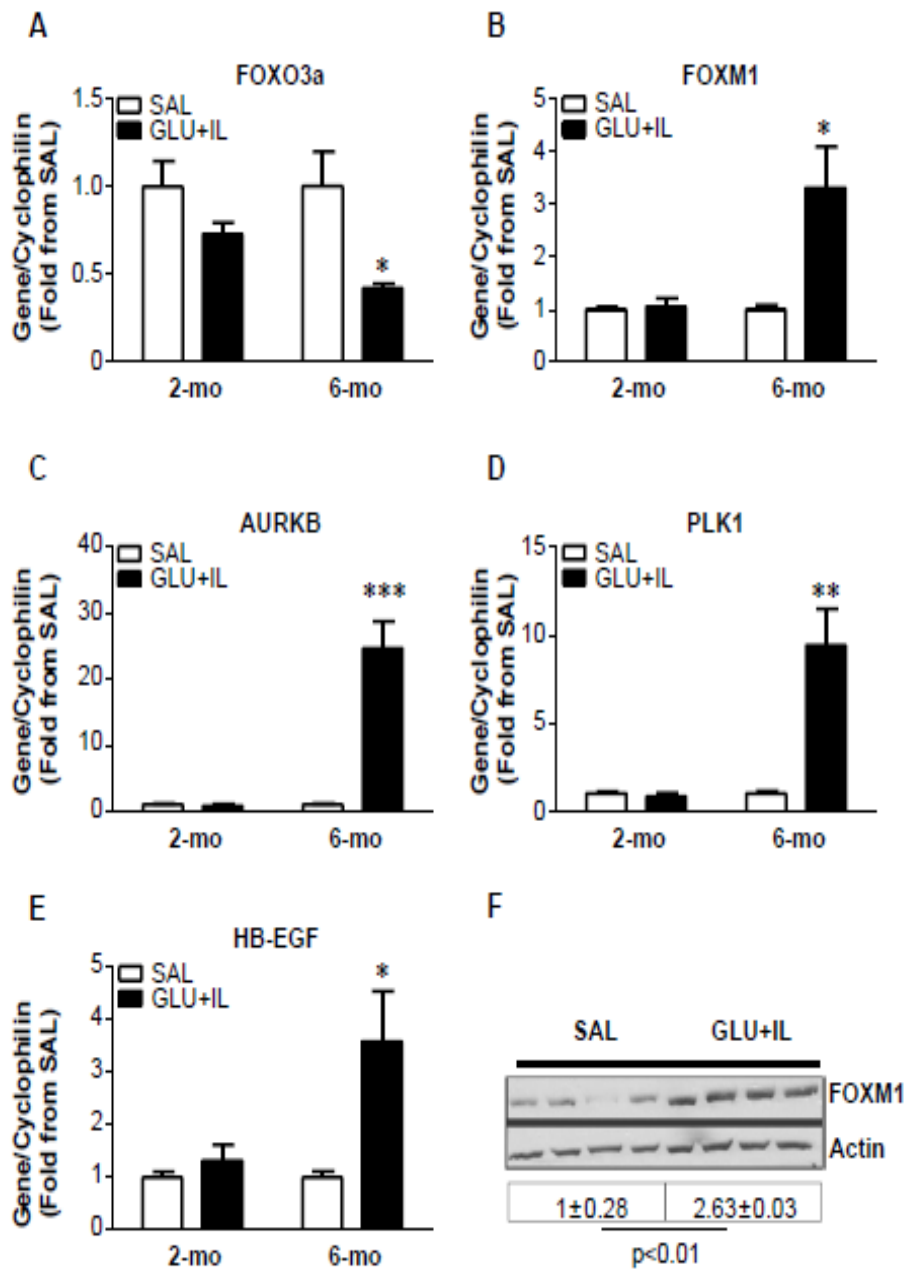


Fig.4

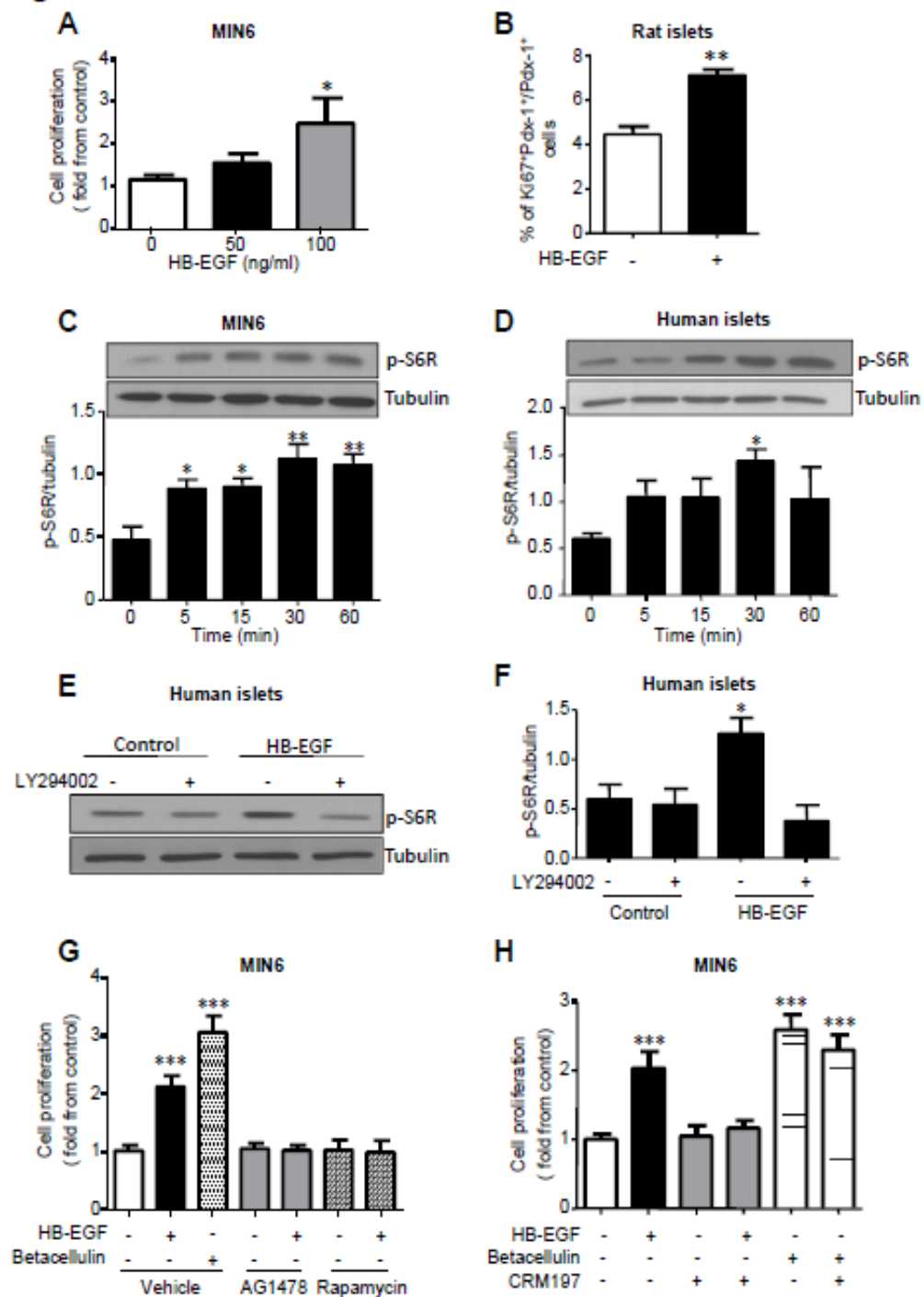


Fig.5

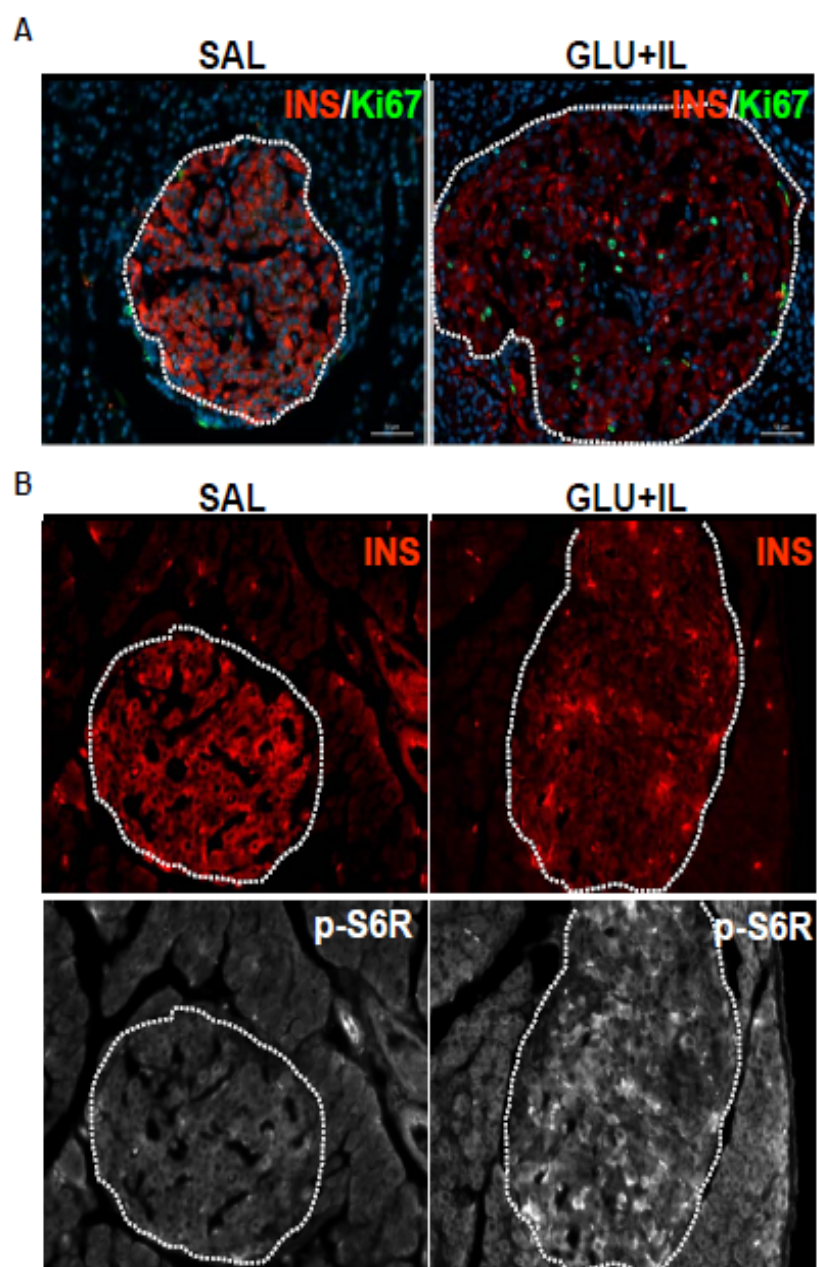


Fig. 6

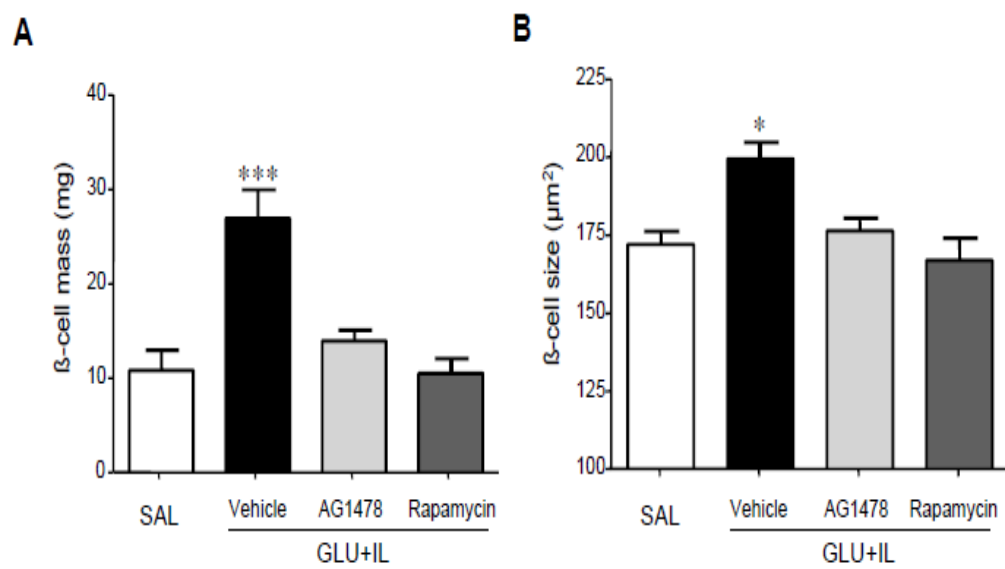
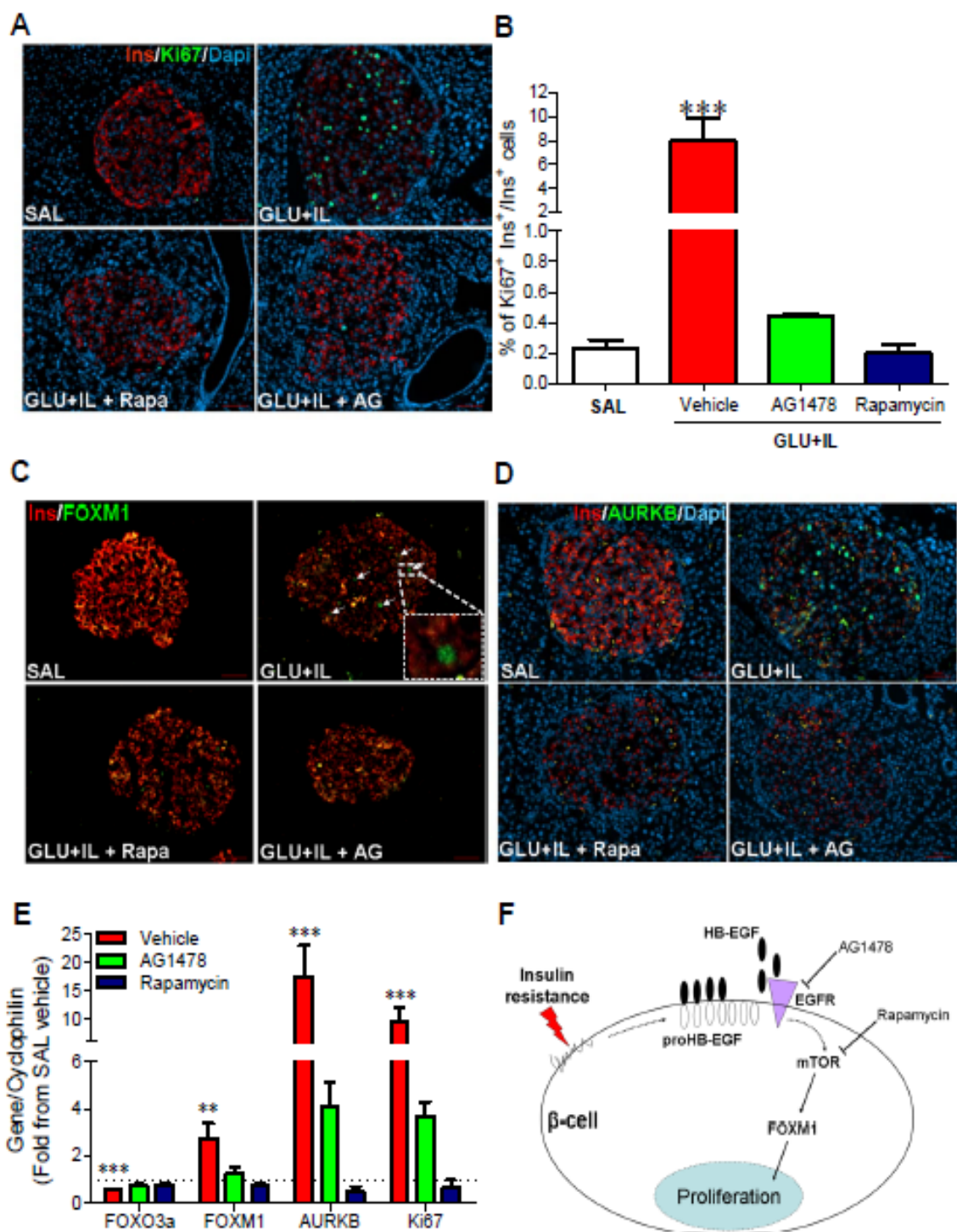


Fig. 7



**Supplementary Figures and tables:**

**Supplementary Figure 1:** FOXM1 signaling is induced in mouse islets after 8 w of high fat feeding. Mice were separated in two groups according to body weight gain induced by the high-fat diet: Low- and High-Diet Responders (LDR and HDR (1)) and compared to normal-diet (ND) fed mice. At the end of the 8 weeks of diet, islets were isolated and gene expression was assessed by qRT-PCR. Expression levels were normalized by cyclophilin A. Data are mean  $\pm$  SEM of 8 animals in each group. \*\*\*P <0.001.

**Supplementary Figure 2:** AG1478 dose dependently inhibits HB-EGF-induced  $\beta$ -cell proliferation in MIN6 cells. MIN6 cell proliferation was measured by counting nuclei after 24h-treatment with HB-EGF with or without AG1478 (3-300 nmol/l). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of 4 replicate experiments. \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001.

**References:**

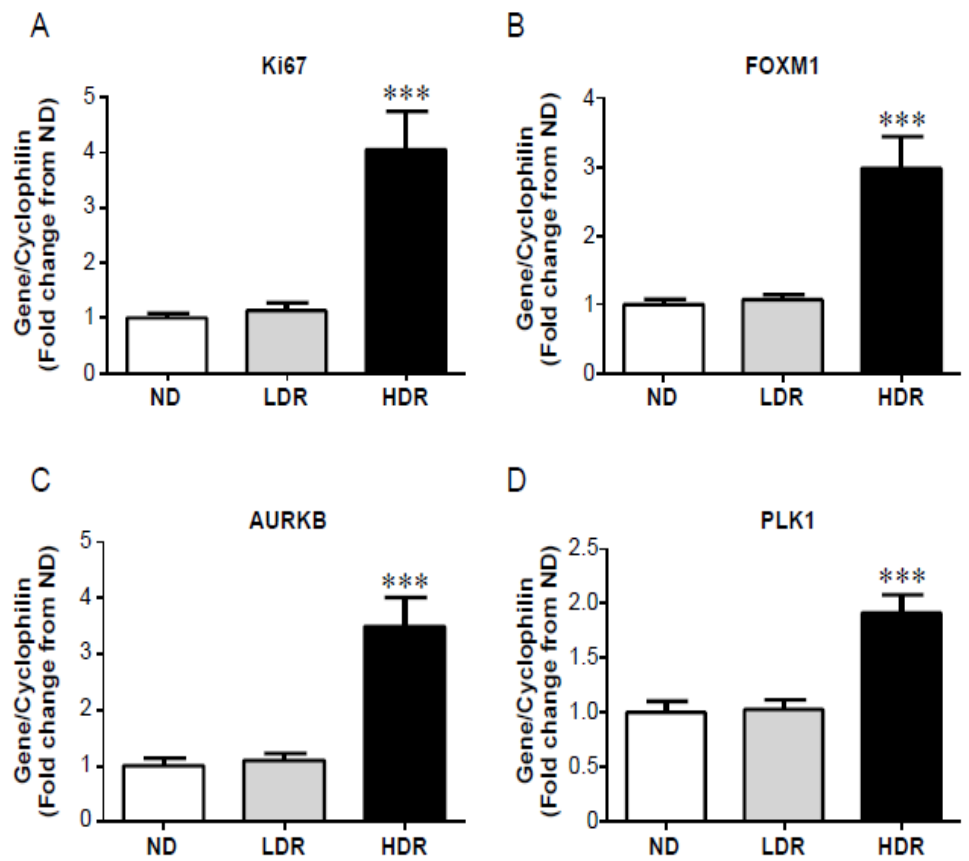
1. Peyot, M.L., Pepin, E., Lamontagne, J., Latour, M.G., Zarrouki, B., Lussier, R., Pineda, M., Jetton, T.L., Madiraju, S.R., Joly, E., et coll. 2010. Beta-cell failure in diet induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes* 59:2178-2187.

Supplementary Table 2: List and references of primary antibodies.

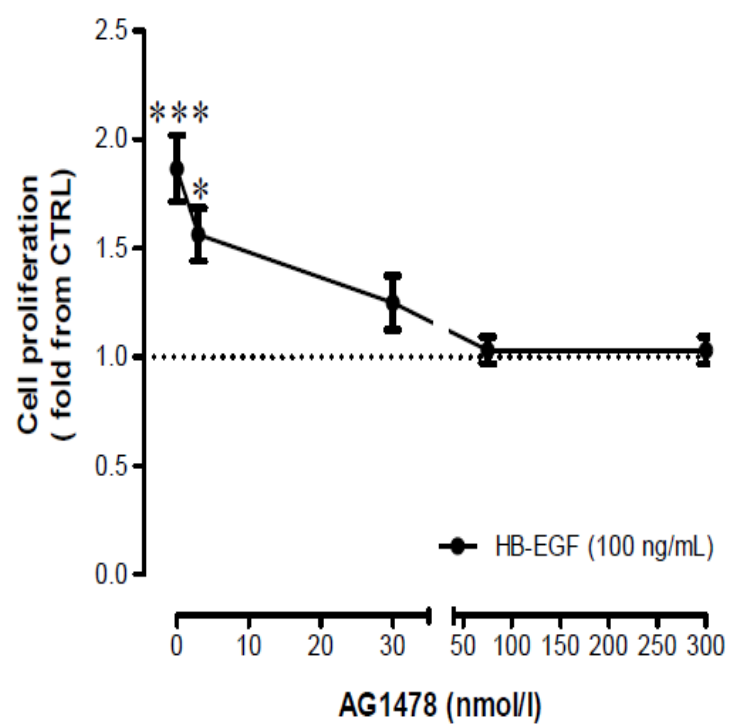
	Provider	Reference	Dilution
PDX-1	R&D systems	AF2517	1/300 (IHC)
AURKB	Abcam	ab2254	1/200 (IHC)
Phospho-S6 ribosomal protein	Cell signaling	2211	1/1000 (WB) 1/50 (IHC)
FOXM1 (K-19)	Santa Cruz	sc-500	1/500 (WB) 1/100 (IHC)
Ki67	Abcam	ab88155	1/600
Insulin	Dako	A0584	1/500
Tubulin	Abcam	ab4074	1/2000
Actin (C-11)	Santa Cruz	sc-1615	1/2000



## Supplementary Fig.1



Supplementary Fig. 2



## **Discussion et perspectives**

### **Contributions aux résultats**

En tant que deuxième auteure de l'article présenté ci-dessus, j'ai contribué aux expériences *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*. En effet, toutes les données expérimentales sur les cellules MIN6 et les îlots pancréatiques animaux et humains ont été générées par moi. De plus, plusieurs expériences non publiées ont été effectuées afin d'élucider le mécanisme par lequel HB-EGF induit la prolifération de la cellule  $\beta$  pancréatique (**Figure 9**). Enfin, le développement de méthode de criblage à haut débit afin d'analyser la prolifération et répliquions des cellules  $\beta$ -pancréatiques humaines a été effectué lors des derniers mois de mes études (**Figure 10**).

### **Rappel des résultats**

Dans cet article publié dans le journal *Diabetes*, nous avons tout d'abord démontré que les rats de Wistar âgés de six mois avaient une tendance à développer une résistance à l'insuline en réponse à la perfusion de glucose et d'intralipide après 72 heures en comparaison avec les rats âgés de deux mois soumis aux mêmes conditions. De plus, le marqueur de prolifération cellulaire Ki67 augmente chez les rats âgés de six mois en concordance avec l'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$ . Après avoir obtenu ces résultats et afin d'en savoir plus sur la cause potentielle de la prolifération des cellules  $\beta$ , nous avons effectué des analyses transcriptomique basées sur les îlots de rats âgés de six mois perfusés avec du glucose et de l'intralipide. Ces analyses ont révélé une augmentation de facteur de transcription FoxM1, facteur essentiel à la régulation du cycle cellulaire. De plus, ces mêmes analyses démontrent l'augmentation du gène codant pour HB-EGF, facteur de croissance connu pour

induire la prolifération de la cellule  $\beta$ . Afin de confirmer les résultats précédents, des analyses au niveau messager par qRT-PCR et au niveau protéique par immunobuvardage de type western ont été effectuées. Ces analyses démontrent une augmentation de l'expression de Ki67, FoxM1, HB-EGF et des cibles directes de FOXM1, Aurora kinase B et PLK1. L'expression de ces derniers facteurs est aussi augmentée dans les îlots de modèles murins nourris avec une diète riche en gras, confirmant ainsi que ces résultats sont aussi reproductibles dans d'autres modèles. Aussi, nous avons aussi démontré que HB-EGF pouvait induire la prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris. Cette prolifération est associée à l'activation de mTOR dans ces mêmes cellules et dans les îlots provenant de patients humains décédés. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de HB-EGF et de mTOR par des inhibiteurs spécifiques à chacun pouvait arrêter la prolifération des cellules  $\beta$ . Afin de vérifier si l'activation de HB-EGF passe par mTOR, nous avons utilisé des inhibiteurs de la voie d'AKT (LY294002). Ainsi, par des expériences d'immunohistochimie, il a été démontré que la cible en aval de mTOR, S6R, est augmentée dans les îlots de rats âgés de six mois perfusés avec du glucose et de l'intralipide, pareillement au marqueur de prolifération, Ki67. Enfin, afin de mesurer l'importance du récepteur à l'EGF et de la voie de mTOR dans les cellules  $\beta$ , des rats perfusés avec du glucose et de l'intralipide ont aussi été traités avec les inhibiteurs spécifiques à ces derniers. Le traitement avec les

deux inhibiteurs a prévenu l'augmentation de l'expression des facteurs FoxM1, AURKB, PLK1 et Ki67.

### **Interprétation des résultats**

À la suite des recherches effectuées par notre laboratoire sur l'adaptation des cellules  $\beta$  en réponse à un excès de nutriments, nous avons voulu démontrer les causes qui conduisent à l'augmentation de l'expression des facteurs FoxM1, AURKB, PLK1 et Ki67(60). Ainsi, dans le but d'identifier le mécanisme moléculaire qui conduit à l'augmentation de la prolifération de la cellule  $\beta$  en réponse à un excès aux nutriments, nous avons utilisé le modèle de rats perfusés pendant 72 heures avec du glucose et de l'intralipide. Les résultats générés lors de cette étude ont bien démontré que, dans notre modèle, il y a activation des cascades de signalisation qui mènent à l'activation de FoxM1 et de ses cibles en aval. Ces effets dépendant du récepteur à l'EGF et de l'activation de mTOR. De plus, nous avons aussi démontré que le facteur de croissance HB-EGF est impliqué dans l'activation de cette voie dans le modèle *in vitro* et *ex vivo*. De plus, il est connu qu'en réponse à des conditions physiologiques et pathologiques, la masse des cellules  $\beta$  et la sécrétion d'insuline augmentent. (61). Ainsi, comme nous l'avons décrit dans le chapitre sur la compensation de la cellule  $\beta$ , afin de prévenir le développement du diabète de type 2, la compensation de la cellule  $\beta$  est indispensable au maintien d'un équilibre glycémique en cas de résistance à l'insuline (4).

Dans un modèle de rats adultes perfusés avec du glucose pendant 96 heures, le groupe de Bonne-Weir et coll. (62) a démontré la présence d'une augmentation de la masse des cellules  $\beta$  de plus de 50 % en comparaison avec le groupe perfusé avec de la saline. Par contre, le groupe de Garcia-Ocaña A et coll. (63) a aussi démontré que, dans le modèle de souris perfusées avec du glucose pendant 96 heures, aucune augmentation de la réplication des cellules  $\beta$  et aucun changement au niveau de la masse ne sont observables. De plus, ce même groupe a démontré que la prolifération des cellules  $\beta$  semble être inhibée dans leur modèle de souris perfusées avec du glucose et des lipides (64), ce qui est contradictoire avec les résultats de notre étude. Nous pouvons donc affirmer que les résultats varient vraisemblablement selon le modèle expérimental et le type de traitement utilisés. Ainsi, selon les résultats générés dans notre étude, il semble que le modèle de rats perfusés que nous avons utilisé est le plus rationnel dans l'étude de la masse et de la prolifération de la cellule  $\beta$ .

De plus, à l'aide de ce modèle, il nous a aussi été permis de démontrer quel mécanisme régit la compensation de la cellule  $\beta$ . Bien qu'il ait été suggéré que la présence d'un facteur circulant pouvait induire la prolifération des cellules  $\beta$  dans le modèle de rongeur et d'humain (32), nous avons démontré avec notre modèle la présence d'un facteur qui cause l'augmentation de cette prolifération. Tel qu'il a été mentionné dans le chapitre sur HB-EGF, notre étude a démontré qu'un ligand autocrine/paracrine du récepteur à l'EGF peut induire la

prolifération dans les cellules Min6 dans les îlots de rats de six mois perfusés et dans les îlots humains. Par contre, il n'a jamais été démontré sur nos modèles utilisés que HB-EGF peut induire la prolifération de la cellule  $\beta$ -pancréatique *in vivo* et *ex vivo*, ni les mécanismes par lesquels cela pouvait se produire. Or, il a été démontré que la surexpression de HB-EGF dans les pancréas murins augmente la prolifération (42) et que la signalisation du récepteur EGF est indispensable pour l'augmentation de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique en réponse à une diète riche en gras ou durant la gestation (74). Enfin, le profil transcriptomique des îlots de rats âgés de six mois perfusés a démontré un rôle primordial du facteur de transcription FoxM1 dans les cellules  $\beta$ . Nos résultats sont en concordance avec ceux trouvés dans la littérature dans un modèle de cellule  $\beta$  adulte (58) (73). Toutefois, bien que nous ayons démontré que FoxM1 et ses cibles étaient augmentés en réponse à un excès de nutriments et inhibés lorsqu'en présence des inhibiteurs de mTOR et EGFR, nous n'avons pas pu démontrer le mécanisme intrinsèque à cette activation et l'inhibition qui en découle. Cela demeure encore inconnu. En somme, d'autres travaux et recherches sont nécessaires pour élucider cette question.

### **Forces et limites de l'étude**

Seulement quelques études ont été capables de rapporter des résultats suggérant le mécanisme de la compensation de la cellule  $\beta$  en excès aux nutriments (65) (66) (67) (68). Or, dans notre étude nous avons non seulement démontré par



quel mécanisme la cellule  $\beta$  pouvait compenser un excès de nutriments, mais nous l'avons aussi démontré dans les modèles *in vivo* chez les rats perfusés, *in vitro* dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris MIN6 et *ex vivo* dans les îlots humains. Les résultats reproductibles et confirmés dans le modèle humain sont sans aucun doute une force de l'étude. Néanmoins, nous sommes bien conscients que bien des différences existent entre les modèles utilisés. Tout en ayant une voie d'action différente, chacun représente un modèle unique (**figure 6**). Toutefois, malgré ces différences, ces modèles nous ont permis de mettre en place des pièces manquantes du puzzle dans le mécanisme menant à la compensation de la cellule  $\beta$ . De plus, au point de vue expérimental, la prolifération des cellules  $\beta$  *in vitro* a été effectuée sur des cellules MIN6, des cellules  $\beta$ -pancréatiques primaires sécrétrices d'insuline de culture de tumeur insulinémique de pancréas. En effet, en plus de se répliquer très facilement, elles forment des agrégats lors de leur prolifération (69) (70). Ces deux caractéristiques des MIN6 nous ont donc porté préjudice lors des analyses des résultats de prolifération. En effet, la technique par coloration de Hoechst ne nous permettait pas de compter les cellules dans les agrégats étant donné leur prolifération rapide et leur nombre très élevé. Néanmoins, après maints essais, nous sommes parvenu à établir une meilleure dilution lors de la préparation des cellules en présence de doses croissantes de HB-EGF, ce qui a permis de ne pas avoir trop d'agrégats et de pouvoir bien différencier les cellules lors de leur prolifération et le taux rapide de croissances des cellules. Aussi, les MIN6 n'ont

pas été la seule difficulté rencontrée lors des manipulations. En effet, les îlots humains provenant d'individus décédés, servant à mesurer la phosphorylation de S6K en réponse à HB-EGF, ont été particulièrement difficiles à traiter. En raison du fonctionnement pour la distribution des îlots, les îlots fraîchement reçus des universités d'Alberta et des États-Unis étaient soit très souvent dans des milieux où ils avaient été digérés par des particules exocrines, soit en nombre insuffisant pour pouvoir effectuer des expériences complètes ou soit altérés à leurs reproductibilités. (Tous les laboratoires qui nécessitent des îlots sont inscrits sur une liste d'attente; lorsque des îlots sont disponibles, le premier laboratoire à répondre à l'appel les reçoit). Malgré toutes ces difficultés, nous sommes tout de même parvenu à obtenir des résultats concluants et reproductibles. Enfin, lors des expériences d'immunohistochimie, nous avons aussi rencontré des difficultés de reproductibilité et des difficultés techniques au moment de la coupe des sections de pancréas et de leur coloration.

## **Perspectives**

À ce jour, les chercheurs n'ont pas réussi à trouver la cure qui contribuerait à la guérison du diabète de type 2. Néanmoins, il existe des traitements secondaires qui permettent de normaliser la glycémie des patients diabétiques. En effet, les traitements existant présentement sur le marché visent plutôt à améliorer la sensibilité des récepteurs à l'insuline afin de capter le glucose excédentaire dans le sang. Parmi ces nombreux traitements, nous pouvons compter les analogues de GLP-1 (Glucagon-like peptide-1), hormone incrétine libérée par les cellules

L qui possède un fort impact dans le contrôle de la glycémie. De plus, parmi les traitements commerciaux disponibles, nous pouvons nommer la Metformine, qui est la pierre angulaire du traitement chez la grande majorité des diabétiques de type 2. Son action permet de diminuer la résistance à l'insuline, ce qui aide l'organisme à utiliser plus efficacement le glucose, et ce, sans risque d'hypoglycémie.

Récemment, des interventions précoces à l'aide de l'insulinothérapie auprès des patients souffrant de DT2 nouvellement diagnostiqués (75), en combinaison à des traitements anti-inflammatoire utilisant un antagoniste de IL-1 $\beta$  (76) et des agonistes des récepteurs GLP-1 (77) ont démontré que la dysfonction des cellules  $\beta$  peut être inversée temporairement. Toutefois, la durabilité de ces effets après le retrait de la thérapie reste laborieuse. À ce jour, ces traitements n'ont été évalués que dans le cas de diabète déjà établi et la science ignore encore si ces traitements peuvent modifier la progression naturelle de l'échec de la compensation des cellules  $\beta$  plus tôt dans la progression de la maladie.

Comme nous avons pu le démontrer lors des recherches qui font le sujet de ce mémoire, les symptômes du DT2 peuvent aussi résulter du défaut de la compensation de la cellule bêta-pancréatique. Rappelons que le DT2 se développe en réponse à la suralimentation et au manque d'activité physique. Au fil du temps, la compensation des îlots des cellules  $\beta$  pour la résistance à l'insuline échoue, entraînant par conséquent une baisse progressive de la

fonction des cellules  $\beta$ . Une hyperglycémie s'ensuit avec la dysfonction et la défaillance des cellules  $\beta$ .

Les résultats présentés démontrent que des nouveaux mécanismes seraient aussi responsables du développement du DT2. Néanmoins, la thérapie présente sur le marché ne cible pas ces mécanismes précis. À ce jour, les recherches qui visent ces cibles spécifiquement sont encore au stade du modèle animal. Dans le futur, il serait envisageable de combiner, en plus des thérapies courantes, des traitements irréversibles qui ciblent la réplication et la prolifération des cellules  $\beta$  et qui, de plus, seraient administrés dès l'apparition des symptômes prédiabétiques (78).

### **Travaux futurs**

En vue de perspectives de recherches à plus long terme, il serait important d'examiner les effets de l'inhibition du facteur de croissance HB-EGF sur les différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire des cellules  $\beta$ -pancréatiques. À cette fin, nous aurons recours à des méthodes d'interférence à l'ARN (ARNi de HB-EGF) et des inhibiteurs spécifiques *ex vivo* tels que CRM197. Des inhibiteurs de métallo protéinase tels que BB94 seront aussi utilisés pour empêcher l'activation de HB-EGF.

Des études (71) sur les souris en gestation ont démontré une augmentation de l'enzyme THP1 (*Tryptophan hydroxylase*), l'enzyme limitante à la biosynthèse de la sérotonine. Ces études ont aussi démontré qu'une diminution de la compensation de la masse de la cellule  $\beta$ -pancréatique est possible en inhibant

la biosynthèse de la sérotonine chez ces souris. Puisque dans nos résultats de microarray effectués au laboratoire dans les îlots de rats de six mois perfusés avec du glucose et de l'intralipide nous avons observé une augmentation de l'enzyme TPH1, nous utiliserons des inhibiteurs de la sérotonine telle la Ketanserin pour observer les effets sur les différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques (**figure 9**).

Au cours de ma dernière année d'étude, nous avons développé une technique de criblage pour mesurer la prolifération des cellules  $\beta$  des îlots des rats et des humains. Sous certaines conditions, cette technique nous permet *ex vivo* de démontrer si les cellules  $\beta$ -pancréatiques peuvent proliférer. Cela est effectué à l'aide d'un marquage immunohistochimique de Ki67 et PDX-1 en calculant le ratio de cellules marquées Ki67+PDX-1/PDX-1 (72) (**figure10**).

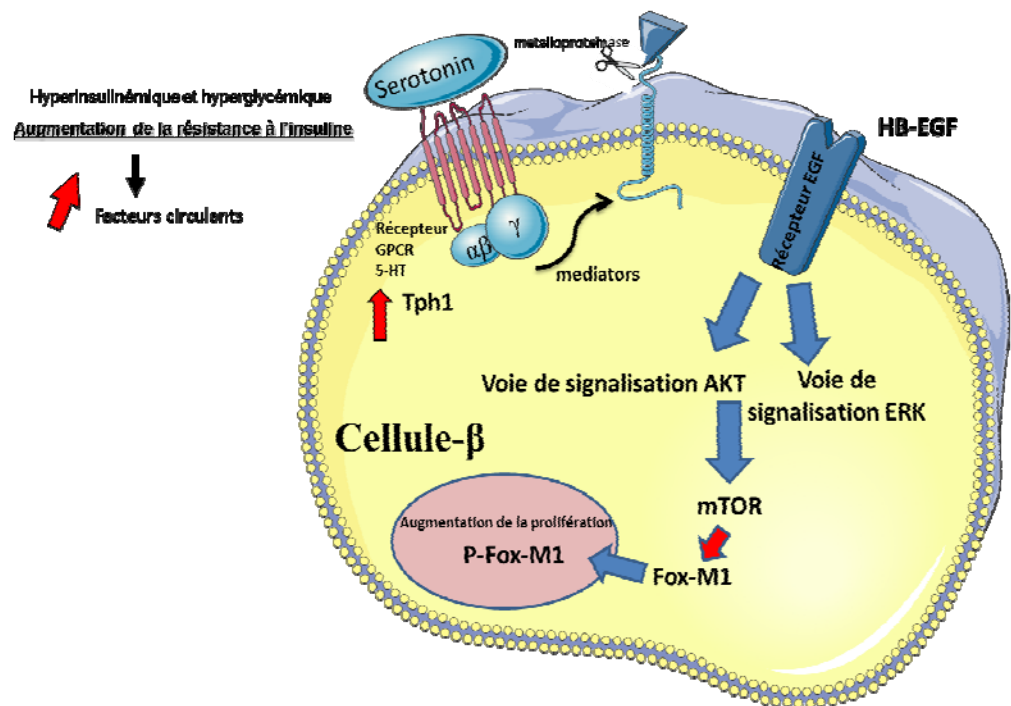


Figure 9. Perspectives et travaux entamés au laboratoire. (Ref : Isma

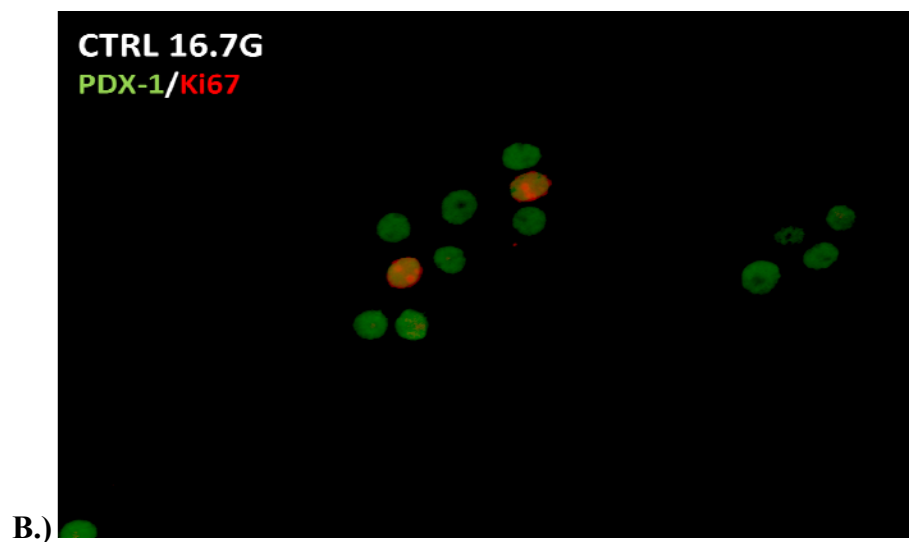


Figure 10. Technique de criblage à haut débit. Prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques provenant d'îlots humains dans une condition contrôle à haut glucose (16.7G). Le ratio (Ki67 (marqueur de prolifération) + PDX-1 (cellule  $\beta$ )/PDX-1) est calculé sur des images capturées aléatoirement au microscope après immunohistochimie. (Ref : Isma B.)

## **Conclusion**

Collectivement, les travaux présentés dans ce mémoire ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la compensation des cellules  $\beta$ -pancréatiques en réponse à un excès de nutriments. En effet, cette réponse est le phénomène qui se manifeste plusieurs décennies avant le développement du diabète de type 2 chez l'humain. D'une part, l'identification du facteur HB-EGF comme facteur important dans l'activation des voies menant à l'augmentation de la prolifération des cellules  $\beta$  contribue à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la cellule  $\beta$ -pancréatique dans le DT2. D'autre part, l'identification du rôle de mTOR et FoxM1 dans l'augmentation de la prolifération cellulaire permet de proposer de nouvelles hypothèses mécanistiques qui serviront à ajouter les pièces manquantes à la signalisation complexe menant à la réponse compensatoire de la cellule  $\beta$ . Ces recherches peuvent donc être utilisées comme de nouvelles approches thérapeutiques. Un jour, elles pourraient améliorer la compensation de la masse de la cellule  $\beta$  dans un état de résistance à l'insuline pour prévenir ou ralentir le développement du DT2. Bien que le DT2 soit causé par différents facteurs, par exemple la prédisposition génétique et les causes environnementales, des interventions thérapeutiques orientées sur le mode de vie représentent tout de même une solution pour réduire de plus de moitié les cas de DT2 au Canada.

## BIBLIOGRAPHIE

1. *Pancreatic cancer*. American Cancer Society. (2007, 29 April). American Cancer Society (ACS). Atlanta, GA: American Cancer Society.
2. *Endocrine Pancreas*. Norbert Freinkel, Donald F. Steiner, 1972 - Medical - 721 pages
3. *Physiologie médicale*. William Ganong, 2003-835 pages
4. Prentki M et al., *Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest. 2006. **116**(7):1802– 1812.
5. *ATLAS du DIABÈTE de la FID*. Fédération Internationale du Diabète, 2013. 6 ième éditions.
6. Harris M, Zimmet P. *Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance*. Alberti K, Zimmet P, Defronzo R, editors. International Textbook of Diabetes Mellitus. Second Edition. Chichester J.
7. Hunt KJ, Schuller KL. *The increasing prevalence of diabetes in pregnancy*. Obstet Gynecol Clin North Am 2007; **34** (2): 173-199, vii.
8. Negrato CA, Gomes MB. *Historical facts of screening and diagnosing diabetes in pregnancy*. Diabetol Metab Syndr 2013; **5**(1): 22.
9. Yanick Farmer et Denise Avard. *La composante génétique du diabète de type 2 : suivi des progrès scientifiques du projet DGDG*. Diabetes Voice. Mars 2008, Vol 53(1).
10. Agence de la santé publique du Canada. *Le diabète au Canada : Perspective de santé publique sur les faits et chiffres*. Chapitre 4. 2011.
11. [https://www.idf.org/sites/default/files/attachments/article\\_77\\_fr.pdf](https://www.idf.org/sites/default/files/attachments/article_77_fr.pdf)
12. GENETIQUE DES MALADIES MULTIFACTORIELLES – LILLE. *Phénotypes, génotype et environnement*. CNRS
13. Maedler K. *Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis*. Diabetes Obes Metab. 2008 May; **10**(5):408-20.
14. Robertson RP. *Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene*. Diabetes. 1994 Sep; **43**(9):1085-9.
15. Ann N. *Insulin resistance in latent autoimmune diabetes of adulthood*. Y Acad Sci. 2003 Nov; **1005**:374-7
16. Denis McGarry J. *Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes*. Diabetes January 2002 vol. 51 no. 17-18
17. De Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. FEBS, Lett, 2008. **582**(1): p. 97-105.



18. WANG Q. *L'insulinorésistance due à la dysfonction des cellules bêta contribue à l'apparition du diabète*. Endocrinologie. Juin 2008, Volume 8, numéro 5.
19. Keymeulen B et al., *Implantation of standardized beta-cell grafts in a liver segment of IDDM patients: graft and recipients characteristics in two cases of insulin-independence under maintenance immunosuppression for prior kidney graft*. Diabetologia 41: 452–459, 1998.
20. Street CN et al., *Islet graft assessment in the Edmonton protocol: implications for predicting long-term clinical outcome*. Diabetes 53: 3107–3114, 2004.
21. Butler AE et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes 52: 102–110, 2003.
22. Clark A et al., *Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes*. Diabetes Res 9: 151–159, 1988.
23. Kloppel G et al., *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited*. Surv Synth Pathol Res 4: 110–125, 1985.
24. Reaven GM. *Role of insulin resistance in the pathophysiology of non-insulin dependent diabetes mellitus*. Diabetes Metab Rev. 1993 Nov;9 Suppl 1:5S-12S.
25. Butler AE et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes 52: 102–110, 2003.
26. Dor Y et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. Nature. 2004 May 6;429(6987):41-6.
27. Meier JJ et al., *Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans*. Diabetes. 2008 Jun;57(6):1584-94
28. Inada A et al., *Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 16;105(50):19915-9.
29. Michael MD et al., *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction*. Mol Cell. 2000 Jul;6(1):87-97.
30. Escribano O et al., *Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform*. Diabetes. 2009 Apr;58(4):820-8.
31. Imai J et al., *Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver*. Science. 2008 Nov 21;322(5905):1250-4.
32. El Ouaamari A et al., *Liver-derived systemic factors drive  $\beta$  cell hyperplasia in insulin-resistant states*. Cell Rep. 2013 Feb 21;3(2):401-10.

33. Bernal-Mizrachi E et al., *Human  $\beta$ -Cell Proliferation and Intracellular Signaling Part 2: Still Driving in the Dark Without a Road Map*. Diabetes. 2014 Mar;63(3):819-31.
34. Kulkarni RN et al., *Human  $\beta$ -cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map*. Diabetes. 2012 Sep;61(9):2205-13.
35. Satoshi T et al., *Involvement of Cell Proliferation Induced by Dual Intracellular Signaling of HB-EGF in the Development of Colitis-Associated Cancer during Ulcerative Colitis*. Ulcers. Volume 2011 (2011).
36. D. Nanba et al., *Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF*. J Cell Biol, 163 (2003), pp. 489–502.
37. Zhou Z et al., *Amino-terminal deletion of heparin-binding EGF-like growth factor4-127 (HB-EGF) stimulates cell proliferation but lacks insulin-like activity*. Cell Prolif, 40 (2) (2007), pp. 213–230.
38. Atli M et al., *Expression of epidermal growth factor (EGF) and heparin-binding EGF (HB-EGF) mRNA in mare endometrium*. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 29 (2012), pp. 463–467.
39. Sing A.B. et al., *Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands*. Cell Signal, 17 (2005), pp. 1183–1193.
40. Yan Y et al., *The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors*. J Cell Biol. 2002 Jul 22;158(2):221-6.
41. Mitamura T et al., *Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity*. J Biol Chem. 1995 Jan 20;270(3):1015-9.
42. Kozawa J et al. *Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector*. Pancreas. 2005 Jul;31(1):32-42.
43. Yarden Y. *The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. Eur J Cancer. 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.
44. Robey RB et al., *Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis*. Semin Cancer Biol. 2009 Feb;19(1):25-31.
45. Zhang S et al., *PI(3)king apart PTEN's role in cancer*. Clin Cancer Res. 2010 Sep 1;16(17):4325-30.
46. Hers I et al., *Akt signalling in health and disease*. Cell Signal. 2011 Oct;23(10):1515-27.
47. Zoncu R et al., *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Jan;12(1):21-35.

48. Dunlop EA et al., *Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms*. Cell Signal. 2009 Jun;21(6):827-35.
49. Bolster DR et al., *AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling*. J Biol Chem. 2002 Jul 5;277(27):23977-80.
50. Brown EJ et al., *Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo*. Nature. 1995 Oct 5;377(6548):441-6.
51. Fingar DC et al., *Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E*. Genes Dev. 2002 Jun 15;16(12):1472-87.
52. Fingar DC et al., *mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E*. Mol Cell Biol. 2004 Jan;24(1):200-16.
53. Wang X et al., *Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase*. EMBO J. 2001 Aug 15;20(16):4370-9.
54. Wierstra I et al., *FOXO1 a typical proliferation-associated transcription factor*. Biol Chem. 2007 Dec;388(12):1257-74.
55. Korver W et al., *The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells*. Nucleic Acids Res. 1997 May 1;25(9):1715-9.
56. Laoukili J et al., *FoxO1: at the crossroads of ageing and cancer*. Biochim Biophys Acta. 2007 Jan;1775(1):92-102.
57. Costa RH. *FoxO1 dances with mitosis*. Nat Cell Biol. 2005 Feb;7(2):108-10.
58. Zhang H et al., *Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxO1, a novel downstream effector of placental lactogen*. Diabetes. 2010 Jan;59(1):143-52.
59. Poirout V et al., *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction*. Endocr Rev. 2008 May;29(3):351-66.
60. Fontés G et al., *Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass*. Diabetologia. 2010 Nov;53(11):2369-79.
61. Sachdeva MM et al., *Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion*. Mol Endocrinol. 2009 Jun;23(6):747-58.
62. Bonner-Weir S et al., *Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion*. Diabetes. 1989 Jan;38(1):49-53.
63. Alonso L et al., *Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication*. Diabetes. 2007 Jul;56(7):1792-801.

64. Pascoe J., *Free fatty acids block glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18*. Diabetes. 2012 Mar;61(3):632-41.
65. Swenne I. *The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells*. Diabetes. 1982 Sep;31(9):754-60.
66. Chick WL. *Beta cell replication in rat pancreatic monolayer cultures. Effects of glucose, tolbutamide, glucocorticoid, growth hormone and glucagon*. Diabetes. 1973 Sep;22(9):687-93.
67. Paris M et al., *Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats*. Endocrinology. 2003 Jun;144(6):2717-27.
68. Bernard C et al., *Neogenesis vs. apoptosis As main components of pancreatic beta cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats*. FASEB J. 1999 Jul;13(10):1195-205.
69. Nakashima K et al., *MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones*. Endocr J. 2009;56(1):45-53.
70. Skelin M et al., *Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research*. ALTEX. 2010;27(2):105-13.
71. Kim H et al., *Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy*. Nat Med. 2010 Jul;16(7):804-8.
72. Annes JP et al., *Adenosine kinase inhibition selectively promotes rodent and porcine islet  $\beta$ -cell replication*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Mar 6;109(10):3915-20.
73. Davis DB, et al. *FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation*. Mol Endocrinol 2010;24:1822-1834
74. Hakonen, E. et al. *Epidermal growth factor (EGF)-receptor signalling is needed for murine beta cell mass expansion in response to high-fat diet and pregnancy but not after pancreatic duct ligation*. Diabetologia 2011 Jul;54(7):1735-43
75. Weng, J. et al. *Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial*. Lancet. 2008;371:1753–1760
76. Larsen, CM. et al. *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med. 2007;356:1517–1526
77. Bunck, MC. et al. *One-year treatment with exenatide improves beta-cell function, compared with insulin glargine, in metformin-treated type 2 diabetic patients: a randomized, controlled trial*. Diabetes Care. 2009;32:762–768
78. Halban, P. et al.  *$\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2014 Apr; Volume 99, Issue 6