

Université de Montréal

Le glucagon-like peptide-1 : un facteur de croissance et une hormone anti-apoptotique pour la cellule pancréatique β . Étude de la transduction du signal

Par

Jean Buteau

Département de Biochimie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat ès Sciences (Ph.D.)
en biochimie

Novembre, 2003

Copyright, Jean Buteau, 2003



W
4
U58
2004
v.011

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Le glucagon-like peptide-1 : un facteur de croissance et une hormone anti-apoptotique pour la cellule pancréatique β . Étude de la transduction du signal

Présentée par :

Jean Buteau

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Tony Antakly - Président-rapporteur

Dr Marc Prentki - Directeur de recherche

Dr Christine Des Rosiers - Membre du jury

Dr Daniel J Drucker - Examineur externe

Dr Yves Langelier – Représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ :

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique, souvent associée à l'obésité, qui touche près de 10 % des Nord-Américains. Cette maladie prend actuellement des allures épidémiques et représente un problème socio-économique majeur. Beaucoup d'efforts sont dirigés vers la découverte de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement du diabète et quelques hormones peptidiques suscitent beaucoup d'intérêt.

Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), une hormone peptidique sécrétée par les cellules L de l'intestin suite à un repas riche en graisses ou en hydrates de carbones, est un agent thérapeutique potentiel très prometteur dans le traitement du diabète. Le GLP-1 améliore la sécrétion d'insuline chez les patients atteints d'intolérance au glucose et de diabète (action gluco-incrétime). De plus, le GLP-1 induit l'expression du gène de l'insuline et augmente la biosynthèse d'insuline (action insulinothropique). Une récente étude par notre groupe de recherche a démontré que le GLP-1 et le glucose agissent en synergie pour augmenter l'expression de certains gènes à réponse précoce pouvant être impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (*c-fos*, *c-jun* et *junB*). Bien que ses activités gluco-incrétime et insulinothropiques soient largement étudiées, l'hypothèse selon laquelle l'effet anti-diabétogénique du GLP-1 dépendrait en partie de ses actions proliférative et anti-apoptotique est une perspective attrayante qui n'avait pas été investiguée avant nos études.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet prolifératif du GLP-1 en utilisant la lignée cellulaire pancréatique β INS-1 et des îlots de Langerhans de rats isolés. Nous avons par la suite tenté d'identifier les voies de signalisation participant à la transduction du signal prolifératif induit par le GLP-1 dans la cellule β . La voie de signalisation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) était un candidat de choix puisqu'elle participe à la transduction de signaux mitogéniques dans plusieurs systèmes cellulaires. Nous avons ensuite étudié l'implication potentielle de différentes kinases situées en aval de la PI-3K, soit la protéine kinase B (PKB), les *extra-cellular signal-related kinase 1* et 2 (ERK1/2), la *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK) et la protéine kinase C ζ (PKC ζ), dans l'effet prolifératif du GLP-1. Nous avons aussi tenté de définir précisément le mécanisme moléculaire par lequel le GLP-1 active la PI-3K

pour promouvoir la prolifération. Par la suite, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le GLP-1 pourrait protéger la cellule β contre l'effet cytotoxique des hauts niveaux de glucose et d'acides gras (glucolipototoxicité) dans des îlots humains et la lignée cellulaire INS832/13. Enfin, nous avons testé l'implication potentielle de la PKB et de *nuclear factor-kB* (NF-kB) dans l'effet anti-apoptotique du GLP-1.

Les résultats indiquent que le GLP-1 agit comme un facteur de croissance pour la cellule β . En effet, le GLP-1 augmente la prolifération de la cellule β d'une manière dose-dépendante et non-additive au glucose. L'effet prolifératif du GLP-1 implique l'activation de la voie de signalisation de la PI-3K. De plus, l'activation de la voie de la PI-3K par le GLP-1 mène à une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 qui est associée à une augmentation de l'expression de PDX-1, du gène de l'insuline, du transporteur du glucose GLUT2 et de la glucokinase, l'enzyme limitante pour la glycolyse. Le GLP-1 augmente aussi l'activité de PKB, ERK1/2, p38 MAPK et PKC ζ . Notre étude indique que la PKC ζ participe à la transduction du signal prolifératif induit par le GLP-1. L'activation de la PI-3K par le GLP-1 requiert la transactivation du récepteur à l'EGF par un mécanisme impliquant c-Src et le clivage de la betacelluline. Enfin, le GLP-1 prévient la glucolipototoxicité de la cellule β de par son action anti-apoptotique. Le GLP-1 augmente la survie de la cellule β via l'activation de PKB et de sa cible en aval, NF-kB.

En conclusion, notre étude indique que le GLP-1, en plus de ses actions glucocrépine et insulinothropique, joue un rôle important dans la régulation de la masse de cellules β en augmentant la prolifération et en prévenant la glucolipototoxicité. Nos résultats ajoutent beaucoup d'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans une thérapie du diabète de type 1 et de type 2.

Mots clés : Epidermal growth factor receptor, Betacelluline, Phosphatidylinositol-3 kinase, Protéine kinase B, Protéine kinase C, NF-kB, PDX-1, Insuline, Glucolipototoxicité.

ABSTRACT :

Type 2 diabetes is a metabolic disorder disease, often associated with obesity, that affects about 10 % of North-Americans. The striking prevalence of type 2 diabetes suggests that it is now taking epidemic proportions and constitutes a significant socio-economic problem. A lot of work is currently dedicated to the discovery of new therapeutical agents for the treatment of type 2 diabetes and a few polypeptide hormones are showing great potential.

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), a polypeptide hormone secreted by intestinal L cells in response to carbohydrates or fat meals, is a potent and promising therapeutical agent in the treatment of diabetes. GLP-1 enhances insulin secretion in both patients with glucose intolerance and type 2 diabetes (glucoincretin action). GLP-1 also increases insulin gene expression and insulin biosynthesis (insulinotropic action). A recent study by our group showed that GLP-1 and glucose synergize to increase the expression level of some immediate early response genes that are known to participate in proliferative as well as apoptotic events (*c-fos*, *c-jun* et *junB*). While its glucoincretin and insulinotropic actions are established and widely studied, the hypothesis that GLP-1 anti-diabetogenic action could involve, at least in part, an effect on β -cell proliferation and apoptosis remains an attractive possibility that had not been investigated prior to our studies.

We aimed at investigating a possible proliferative effect of GLP-1 using the insulin secreting cell-line INS-1 and isolated rat islets. In an attempt to identify the precise signaling pathway by which GLP-1 increases β -cell proliferation, we have studied a possible implication of the PI-3K signaling pathway. This pathway was a good candidate since it is know to be activated by a variety of mitogenic stimuli in many cell systems. We have also studied the possible implication of the downstream targets of PI-3K, protein kinase B (PKB), extra-cellular signal-related kinase 1 and 2 (ERK1/2), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and protein kinase C ζ (PKC ζ), in GLP-1-induced β -cell proliferation. We next aimed at identifying the precise molecular mechanism by which GLP-1 activates PI-3K. We also tested the hypothesis that GLP-1 prevents the cytotoxic effect of elevated concentrations of glucose and free fatty acids (glucolipotoxicity) on the β -cell. Finally, we have investigated the possible implication of

PKB and its downstream target nuclear-factor κ B (NF- κ B) in the anti-apoptotic action of GLP-1.

Our results show that GLP-1 acts as a growth factor for the pancreatic β -cell. Indeed, GLP-1 increases β -cell proliferation non-additively with glucose in a dose-dependent manner. GLP-1 promotes β -cell growth via the activation of the PI-3K signaling pathway. GLP-1-induced PI-3K activation leads to the subsequent activation of the transcription factor PDX-1 that is associated with enhanced insulin gene expression as well as increased expression level of PDX-1, the glucose transporter GLUT2, and glucokinase, the rate-limiting enzyme of glycolysis. GLP-1 also activates PKB, ERK1/2, p38 MAPK and PKC ζ . Our study shows that PKC ζ activation contributes to the proliferative action of GLP-1. GLP-1-induced PI-3K activation requires EGF receptor transactivation by a mechanism that implicates c-Src and membrane-bound betacellulin processing. Finally, GLP-1 prevents β -cell glucolipototoxicity by an anti-apoptotic action via PKB activation and its downstream target NF- κ B.

In summary, our study shows that GLP-1, in addition to its glucoincretin and insulinotropic actions, play an important role in the regulation of β -cell mass by enhancing proliferation as well as preventing cell death in a context of glucolipototoxicity. Our results increase the interest in the use of GLP-1 as a therapeutical agent in the treatment of type 1 and type 2 diabetes.

Keywords : Epidermal growth factor receptor, Betacellulin, Phosphatidylinositol-3 kinase, Protein kinase B, Protein kinase C, NF- κ B, PDX-1, Insulin, Glucolipototoxicity.

TABLE DES MATIÈRES:

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvii
Dédicace.....	xviii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1. Le diabète.....	1
1.1. Épidémiologie.....	1
1.2. Le diabète de type 1.....	2
1.3. Le diabète de type 2.....	2
1.4. Les gènes du diabète ou diabétogènes.....	4
2. L'homéostasie du glucose.....	7
2.1. Du pancréas à l'insuline.....	7
2.2. L'action de l'insuline.....	10
2.3. Le récepteur à l'insuline et les insulin-receptor substrates 1-2.....	12
2.4. Une signalisation auto- ou paracrine de l'insuline sur la cellule pancréatique β	14
3. La cellule pancréatique β	15
3.1. La sécrétion d'insuline.....	15
3.1.1. Les sécrétagogues de la cellule β	15
3.1.2. Les mécanismes de la sécrétion d'insuline.....	16
3.2. La biosynthèse d'insuline.....	18
3.3. La prolifération de la cellule β	22

3.3.1. La différenciation de la cellule β	23
3.3.2. La réplication de la cellule β	24
3.3.3. Les cellules souches au cœur d'une stratégie thérapeutique pour le diabète.....	26
3.4 L'apoptose de la cellule β	28
3.4.1 La glucotoxicité.....	29
3.4.2 La lipotoxicité.....	30
3.4.3 La glucolipotoxicité.....	38
3.5 Les lignées cellulaires pancréatiques β	40
4. Les agents thérapeutiques pour le traitement du diabète de type 2.....	41
4.1. Les agents hypoglycémiants.....	42
4.2. Les agents anti-hyperglycémiants.....	42
4.3. Autres agents thérapeutiques.....	43
5. Le glucagon-like peptide-1.....	44
5.1. Une hormone polypeptidique.....	44
5.2. Un agent thérapeutique prometteur dans le traitement du diabète de type 2.....	46
5.3. Le récepteur au GLP-1.....	47
5.4. Une hormone gluco-incréatine.....	48
5.5. Un activateur de la biosynthèse d'insuline.....	49
5.6. Le GLP-1 et la masse des cellules β	50
5.7. Stratégies thérapeutiques concernant le GLP-1.....	51
6. Les systèmes de transduction de signaux activés par le GLP-1.....	53
6.1. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	53
6.2. Le récepteur à l'EGF.....	55
6.2.1 Une famille de récepteurs.....	55
6.2.2 La transactivation du récepteur à l'EGF.....	56
6.2.3 La betacelluline : un ligand du récepteur à l'EGF important pour la cellule β	57

6.3. La phosphatidylinositol-3 kinase.....	58
6.4. La protéine kinase B.....	59
6.5. La protéine kinase C ζ : une PKC atypique.....	61
6.6. Les facteurs de transcription PDX-1, AP-1 et NF-kB dans la cellule β	61
6.6.1 PDX-1.....	62
6.6.2 AP-1.....	64
6.6.3 NF-kB.....	66
7. Thématique et but du travail.....	67
Chapitre 2 : Résultats.....	73
Article 1 : Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. <i>Diabetologia</i> 1999 42 (7): 856-64.....	73
Article 2 : Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. <i>Diabetes</i> 2001 50 (10): 2237-43.....	100
Article 3 : Glucagon-like peptide-1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. <i>Diabetes</i> 2003 52 (1): 124-32.....	129
Article 4 : Glucagon-like peptide-1 prevents β -cell glucolipotoxicity via protein kinase B/Akt Soumis pour publication à <i>Endocrinology</i>	165
Chapitre 3 : Discussion.....	195

Chapitre 4 : Perspectives du projet.....207

Bibliographie/Cyber-bibliographie.....215

Liste des figures :

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : La pathogénèse du diabète de type 2.....	3
Figure 2 : Modèle nutritionnel de la pathogénèse du diabète de type 2.....	6
Figure 3 : Le pancréas : une glande endocrine et exocrine.....	8
Figure 4 : Du pancréas à l'insuline.....	9
Figure 5 : L'action de l'insuline sur la cellule β et les tissus périphériques.....	11
Figure 6 : Principaux stimulateurs et inhibiteurs de la cellule β pour la sécrétion d'insuline.....	16
Figure 7 : Modèle illustrant les deux voies métaboliques activées par le glucose dans la cellule β pour la sécrétion d'insuline.....	17
Figure 8 : Schéma organisationnel des promoteurs du gène de l'insuline de rat I, de rat II et de l'humain.....	19
Figure 9 : Modèle moléculaire de la glucolipotoxicité.....	39
Figure 10 : Représentation schématique du proglucagon et des peptides dérivés dans l'intestin et le pancréas.....	45
Figure 11 : Représentation schématique des actions physiologiques du glucagon-like peptide-1.....	46
Figure 12 : Le double rôle des arrestines.....	55

Chapitre 2 : Résultats

Article 1 : Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells.

Figure 1 : Effects of GLP-1 and glucose on DNA synthesis in INS-1-cells.....	93
Figure 2 : GLP-1 and glucose stimulate PI3K activity in INS-1 cells in a non-additive manner.....	94

Figure 3 : LY 294002 and wortmannin inhibit the DNA synthesis in INS-1 cells which have been induced by GLP-1 and glucose.....	95
Figure 4 : Effects of GLP-1 and glucose on PDX-1 and AP-1 DNA binding activity....	96
Figure 5 : The PI3K inhibitor, LY 294002, inhibits GLP-1 modulation of PDX-1 DNA binding activity in INS-1 cells.....	97
Figure 6 : Effect of GLP-1 on the expression of PDX-1 and insulin mRNAs.....	98
Figure 7 : Effects of GLP-1 and growth hormone on isolated rat pancreatic islets tritiated thymidine incorporation.....	99

Article 2 : Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation.

Figure 1 : Effects of GLP-1 and glucose on ERK1/2, p38 MAPK, PKB, and DNA synthesis in INS(832/13) cells.....	124
Figure 2 : GLP-1 causes nuclear translocation of PKC ζ in INS(832/13) and dissociated normal rat β -cells.....	125
Figure 3 : Time-dependent increase in PKC ζ immunoreactivity in nuclear fractions of INS-cells.....	126
Figure 4 : PKC ζ and p38 MAPK inhibitors suppress GLP-1-induced DNA synthesis in INS(832/13) cells.....	127
Figure 5 : Effects of adenoviral overexpression of various PKC ζ constructs on GLP-1-induced proliferation in INS(832/13) cells.....	128

Article 3 : Glucagon-like peptide-1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor.

Figure 1: c-Src and EGFR inhibitors suppress GLP-1-induced DNA synthesis in INS(832/13) cells.....	154
Figure 2: GLP-1- and betacellulin-induced INS(832/13)-cell proliferation are not additive.....	155
Figure 3: Effects of c-Src and EGFR inhibitors on GLP-1-induced proliferation in isolated rat pancreatic islets.....	156

Figure 4: GLP-1 induces transient EGFR tyrosine phosphorylation in INS(832/13) cells.....	157
Figure 5: GLP-1 induces EGFR transactivation via a c-Src-dependent mechanism.....	158
Figure 6: Effects of c-Src and EGFR inhibitors on GLP-1- and betacellulin-induced PI-3K activation.....	159
Figure 7: Effects of retroviral overexpression of a dominant negative EGFR on GLP-1-induced proliferation in INS(832/13) cells.....	160
Figure 8: Flow cytometric analysis of cell-surface associated betacellulin.....	161
Figure 9: An anti-BTC neutralizing antibody and a metalloproteinase inhibitor suppress GLP-1-induced DNA synthesis in INS(832/13) cells.....	162
Figure 10 : GLP-1 increases the proliferation of the prostatic cancer cell-line LNCaP when co-cultured with INS(832/13) cells.....	163
Figure 11: Model illustrating the mode of action of GLP-1 on PI-3K signaling and β -cell proliferation.....	164

Article 4 : Glucagon-Like Peptide-1 Prevents β -Cell Glucolipototoxicity Via Protein Kinase B/Akt

Figure 1: GLP-1 prevents gluco-, lipo- and glucolipototoxicity in human pancreatic β -cells and INS832/13 cells.....	189
Figure 2: Adenoviral overexpression of a dominant-negative PKB suppresses the anti-apoptotic action of GLP-1.....	191
Figure 3 : GLP-1 increases NF-kB DNA binding activity.....	192
Figure 4: NF-kB inhibition suppresses the anti-apoptotic action of GLP-1.....	193
Figure 5: GLP-1 increases the expression level of IAP-2 and Bcl-2.....	194

Chapitre 4: Perspectives du projet

Figure 13: Illustration des principales hypothèses de travail concernant l'activation de voies de signalisation participant à l'effet prolifératif et anti-apoptotique du GLP-1 sur la cellule β	207
---	-----

Liste des abréviations :

ACC :	acétyl-CoA carboxylase
AMPK :	AMP-activated protein kinase
AP-1 :	activating protein-1
ATF :	activating transcription factor
bHLH :	basique hélice-boucle-hélice
BRET :	bioluminescence resonance energy transfer
BTC :	betacelluline
CaMKII :	calmodulin-dependent protein kinase II
CBP :	CREB binding protein
CCK :	cholécystokinine
CPT-1 :	carnitine-palmitoyl transférase-1
CRE :	élément de réponse à l'AMPc
CREB :	CRE binding protein
DAG :	diacylglycérol
DPIV :	dipeptidyl peptidase IV
EGF :	epidermal growth factor
ERK :	extra-cellular signal related kinase
FAS :	fatty acid synthase
Fox01 :	forkhead homéobox protéine 1
GFP :	green fluorescent protein
GIP :	glucose-dependent insulintropique polypeptide
GLP-1 :	glucagon-like peptide-1
GLP-1R :	récepteur au GLP-1
GRK :	G protein-coupled receptors kinase
GSK3 :	glycogène synthétase kinase-3
HB-EGF :	heparin-binding EGF-like protein
HMG-CoA :	hydroxy- β -méthylglutaryl-CoA
HNF :	hepatocyte nuclear factor
HSL :	hormone-sensitive lipase

IBMX :	isobutyl-1-méthylxanthine
IDDM :	insulin-dependent diabetes mellitus
IDX-1 :	islets and duodenum homeobox protein-1
IFN γ :	interféron- γ
IGF :	insulin-like growth factor
IL-1 β :	interleukin-1 β
INGAP:	islet neogenesis-activating protein
iNOS :	inducible nitric oxide synthase
IR :	récepteur à l'insuline
IRS :	insulin receptor substrate
JAB1 :	jun activation domain binding protein 1
JAK :	janus kinase
JNK :	c-Jun N-terminal domain kinase
LPA :	acide lysophosphatidique
L-PK :	pyruvate kinase de type L (foie)
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MODY :	maturity onset diabetes of the young
NFAT :	nuclear factor of activated T-cells
NF-kB :	nuclear factor- κ B
NIDDM :	non-insulin-dependent diabetes mellitus
NO :	oxyde nitrique
NOD :	non-obese diabetic
PACAP :	pituitary adenylate cyclase-activated protein
PDH :	pyruvate déhydrogénase
PDK :	phosphoinositol-dependent protein kinase
PDX-1 :	pancreatic and duodenum homeobox protein-1
PFK :	phosphofructokinase
PH :	homologie aux pleckstrines
PI :	phosphatidylinositol
PI-3K :	phosphatidylinositol-3 kinase
PKA :	protéine kinase A

PKB :	protéine kinase B
PKC :	protéine kinase C
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acétate
PPAR :	peroxisome proliferator activated receptor
PPRE :	élément de réponse aux PPARs
PTEN :	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PTP-1B :	protéine tyrosine phosphatase-1B
RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
RXR :	récepteur X à l'acide rétinoïque
SH :	homologie à Src
SPT :	sérine palmitoyltransférase
SRE :	élément de réponse au sérum
SREBP :	sterol responsive element binding protein
SRF :	serum-response factor
STAT :	signal transducer and activator of transcription
TCF :	ternary complex factors
TGF α :	transforming growth factor α
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
TOR :	mammalian target of rapamycin
TPA :	12-O-tetradécanyolphorbol-13-acétate
TRE :	élément de réponse au TPA
UCP :	protéine découplante
VIP :	vasoactive intestinal peptide
ZDF :	Zucker diabetic fatty

Pour leur amour et leur précieux support tout au cours de ces années, je dédie cette thèse de doctorat à tous les membres de ma famille (Odette, Caroline, Stéphane et Diane) et en particulier à Léopold, mon petit papa adoré, qui nous a quitté cet hiver mais qui demeure présent en nous.

Remerciements

Je suis extrêmement reconnaissant envers tous les gens du laboratoire que j'ai côtoyés au cours de mes études. J'ai vu plusieurs copains arriver, plusieurs partir et cette fois, c'est à mon tour de quitter en laissant une merveilleuse équipe derrière moi.

Je remercie plus particulièrement mon directeur de recherche, le Dr Marc Prentki, pour son aide, toutes ces passionnantes conversations (à propos de la science ou non!) et son dévouement. Marc sera irremplaçable.

Enfin, je tiens à remercier mes amis proches, en particulier Sylvain, mon complice de toujours. Vos encouragements et votre présence est importante.

INTRODUCTION

1 - LE DIABÈTE

Le diabète est un désordre métabolique connu depuis des centaines d'années qui prédispose à une mort prématurée. Bien qu'il fasse l'objet de recherches intensives, la nature même de la maladie n'est pas entièrement connue. On considère toutefois que le diabète est provoqué par l'absence (partielle ou totale) ou l'inefficacité de l'insuline (DeFronzo, R. A. 1988; DeFronzo, R. A. 1997). Suite à cette déficience en insuline, la concentration de glucose circulant se trouve élevée chez le patient diabétique et mène au développement de plusieurs complications. Parmi celles-ci, on note des problèmes microvasculaires, la cécité, la néphropathie, la neuropathie et une incapacité à cicatriser les blessures. Selon plusieurs critères (voir plus loin), on définit deux types de diabète que l'on nomme diabète de type 1 et 2.

1.1 - ÉPIDÉMIOLOGIE

Le diabète (en particulier le diabète de type 2) prend maintenant des proportions épidémiques dans les pays industrialisés (Zimmet, P. Z. 1995; Zimmet, P. *et al.* 2001) et touche de plus en plus de nationalités partout à travers le monde (O'Dea, K. 1991; King, H. 1993). Alors que l'incidence de la maladie ne cesse de croître, on rapporte qu'elle atteint de plus en plus de personnes en bas âge. On compte actuellement plus de 120 millions de diabétiques dans le monde (type 1 et type 2 confondus) dont 500 000 au Québec, ce qui représente environ 7% de la population québécoise (selon l'Association du Diabète du Québec, voir cyber-bibliographie). De plus, on estime que ce nombre doublera d'ici 10 ans (de Courten, M. and Zimmet, P. 1997). Le traitement du diabète et de ses complications se fait à un coût extrêmement élevé, représentant plus de 10% du budget des soins de la santé en Amérique du Nord (Songer, T. J. and Zimmet, P. Z. 1995). À cause des nombreuses complications liées au diabète, on prétend qu'un lit sur 5 en hôpital est occupé par un patient diabétique.

Le diabète a donc un impact socio-économique très important (Association du Diabète du Québec).

1.2 - LE DIABÈTE DE TYPE 1

Tel que mentionné ci-dessus, on définit le diabète en deux catégories, soit le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le diabète de type 1 ne représente qu'environ 5% des cas de diabète à travers le monde. Il est causé par une destruction des cellules pancréatiques β , qui ont pour rôle la sécrétion d'insuline suite à une élévation de la glycémie. C'est pourquoi on le nommait IDDM (*insulino-dependent diabetes mellitus*) (Kloppel, G. *et al.* 1985). C'est-à-dire qu'il peut être corrigé par des injections d'insuline et le patient en est dépendant tout au cours de sa vie. La destruction des cellules β peut être attribuable à une réaction auto-immune ou à différents agents toxiques (toxines, virus, etc.) pour la cellule β (Mandrup-Poulsen, T. 1990; Mandrup-Poulsen, T. 2001). Le diabète de type 1 apparaît généralement en bas âge et se caractérise par un syndrome agressif en raison de l'absence d'insuline.

1.3 - LE DIABÈTE DE TYPE 2

Le diabète de type 2 (ou NIDDM pour *non-insulino-dependent diabetes mellitus*) ne peut être corrigé par une simple injection d'insuline. Il apparaît généralement chez les patients plus âgés (40 ans et plus) ou obèses. La pathogénèse du diabète de type 2 (voir la figure 1) se caractérise initialement par une résistance à l'insuline qui est compensée par une hyperinsulinémie (Weir, G. C. *et al.* 2001; (Kahn, S. E. 2003). Ainsi, on peut définir cet état comme étant « pré-diabétique » puisque la glycémie demeure normale sous l'effet compensatoire de la cellule β qui sécrète des niveaux accrus d'insuline. Par la suite, des désordres dans la sécrétion d'insuline et une destruction des cellules β empêchent l'effet compensatoire de ces dernières. On parle alors de la « phase de décompensation ». À ce stade, la cellule β ne répond plus normalement au glucose et aux autres sécrétagogues pour la sécrétion d'insuline. De plus, les cellules β sont alors dégranulées (donc vidées de leur contenu en insuline) et

dédifférenciées (Jonas, J. C. *et al.* 2001; Laybutt, R. *et al.* 2001; Weir, G. C. *et al.* 2001). Elles présentent aussi des dommages structuraux. Dès lors, le patient diabétique éprouve des excursions hyperglycémiques post-prandiales et les nombreuses complications du diabète apparaissent.

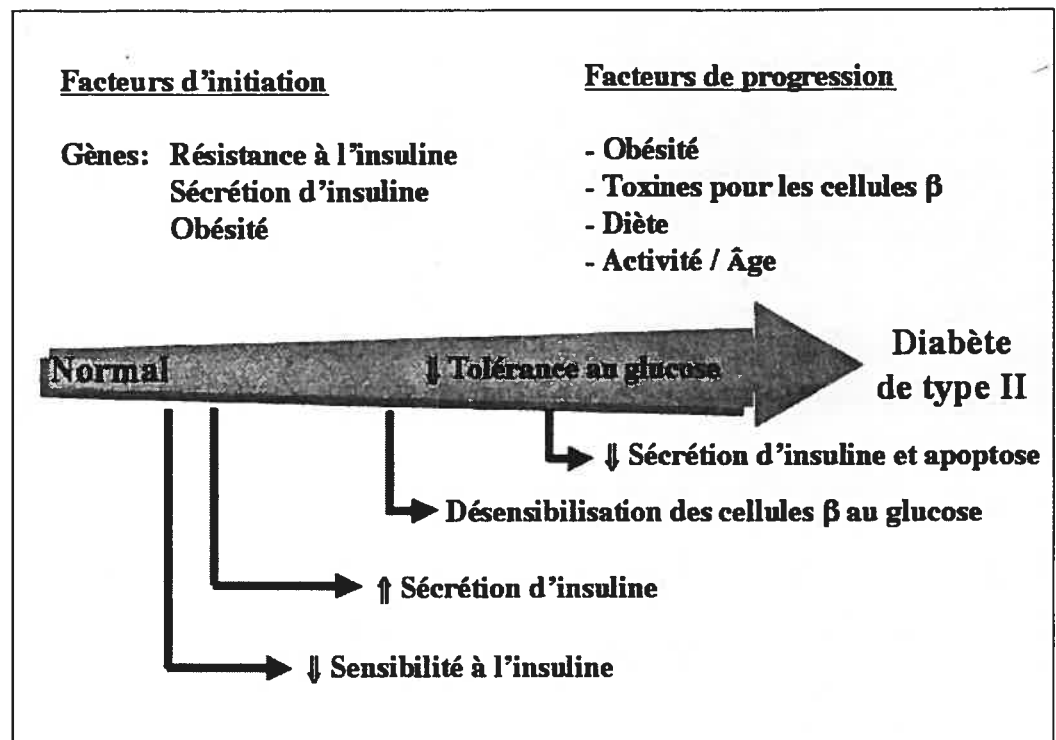


Figure 1 : La pathogénèse du diabète de type 2. La figure illustre les principales étapes du développement de la pathologie. Selon un modèle généralement admis, un individu présentant divers facteurs d'initiation du diabète de type 2 est initialement résistant à l'insuline. Cet état est toutefois compensé par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Après un certain temps, les cellules β deviennent insensibles au glucose en terme de sécrétion d'insuline et la glycémie post-prandiale est élevée. Une glycémie post-prandiale au-dessus de 7 mM définit généralement un état diabétique.

Outre l'hérédité, on dénombre de nombreux facteurs qui prédisposent au diabète de type 2 dont l'obésité auquel cette forme de diabète est étroitement liée. Près de 80% des individus atteints de diabète de type 2 sont obèses (Zimmet, P. *et al.* 2001). Les facteurs de progression de la maladie sont tout aussi variés (sédentarité, diète, etc.) et on s'entend généralement pour dire que le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle au même titre que le cancer (DeFronzo, R. A. 1997).

1.4 - LES GÈNES DU DIABÈTE OU DIABÉTOGÈNES

On a toutefois identifié, chez certains individus, des défauts génétiques uniques menant à l'apparition du diabète. Ces gènes, dont la mutation est suffisante pour causer le diabète, sont appelés « diabétogènes ». Parmi les diabétogènes, on retrouve une classe de gènes essentiels à la fonction de la cellule β et pouvant à eux seuls causer un diabète précoce que l'on nomme MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) (Habener, J. F. and Stoffers, D. A. 1998). Sur les six formes de diabète MODY reconnues à l'heure actuelle, cinq impliquent un gène codant pour un facteur de transcription. En effet, une mutation causant l'inactivation du facteur de transcription *hepatocyte nuclear factor-4 α* (HNF-4 α) cause le diabète de type MODY1 (Yamagata, K. *et al.* 1996a); de HNF1 α , le type MODY3 (Yamagata, K. *et al.* 1996b); de *pancreatic and duodenal homeobox protein-1* (PDX-1), le type MODY4 (Stoffers, D. A. *et al.* 1997); de HNF1 β , le type MODY5 (Horikawa, Y. *et al.* 1997) et de NeuroD1, le type MODY6 (Malecki, M. T. *et al.* 1999; Kristinsson, S. Y. *et al.* 2001). Le cinquième gène code pour la glucokinase, l'enzyme limitante pour la glycolyse dans la cellule β et le foie (Froguel, P. *et al.* 1992). De récentes publications démontrent que chacun de ces facteurs de transcription MODY régulent l'expression de plusieurs autres facteurs de transcription de type MODY pour créer un schéma organisationnel complexe (Boj, S. F. *et al.* 2001; Hansen, S. K. *et al.* 2002). Les facteurs de transcription MODY jouent un rôle clé dans le développement du pancréas et l'expression du gène de l'insuline (Habener, J. F. and Stoffers, D. A. 1998).

L'identification et la caractérisation de nouveaux diabétogènes permettent une meilleure compréhension des mécanismes participant à l'étiologie du diabète de type 2. Généralement, ce sont les études génétiques chez des populations atteintes de diabète et celles portant sur l'inactivation (*knock-out*) de certains gènes qui permettent l'identification de nouveaux diabétogènes.

Par exemple, l'étude de souris *knock-out* a permis de mettre en évidence l'importance de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline (IR) dans la cellule β (Accili, D. 2001; Accili, D. *et al.* 2001). Des souris déficientes en *insulin receptor substrate-2* (IRS-2) ont présenté une résistance à l'insuline, une masse de cellules β réduite, un mauvais fonctionnement de la cellule β et une détérioration de l'homéostasie du glucose (Withers, D. J. *et al.* 1998). Ces défauts sont similaires à ceux rencontrés dans le diabète de type 2 et les résultats suggèrent qu'un mauvais fonctionnement de la voie IR/IRS/phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) pourrait contribuer à l'apparition ou à la progression de la pathologie du diabète de type 2. Plusieurs études ont ciblé cette voie depuis la publication de cette première étude afin d'expliquer les nombreuses altérations métaboliques associées au diabète de type 2 (Elchebly, M. *et al.* 1999; Kulkarni, R. N. *et al.* 1999a; Kulkarni, R. N. *et al.* 1999b; Withers, D. J. *et al.* 1999; Bernal-Mizrachi, E. *et al.* 2001; Tuttle, R. L. *et al.* 2001).

Les études génétiques effectuées chez des patients diabétiques permettent aussi l'identification de diabétogènes. L'une d'elles a identifié un polymorphisme (Pro12Ala) associé au diabète de type 2 par la découverte d'une mutation dans le gène codant pour un membre de la famille des *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), PPAR γ (Altshuler, D. *et al.* 2000). Les personnes présentant une telle mutation développent une résistance à l'insuline et un risque accru de développer la pathologie. Puisque d'autres études ont lié étroitement les PPARs au métabolisme des acides gras dans les tissus périphériques et la cellule β (Lemberger, T. *et al.* 1996; Schoonjans, K. *et al.* 1996; Desvergne, B. *et al.* 1998; Roduit, R. *et al.* 2000; Guerre-Millo, M. *et al.* 2001; Eto, K. *et al.* 2002), ce résultat est compatible

avec le modèle nutritionnel proposé à la figure 2. Selon ce modèle, un apport excessif de calories et de hauts niveaux d'acides gras circulants seraient associés au développement du diabète de type 2.

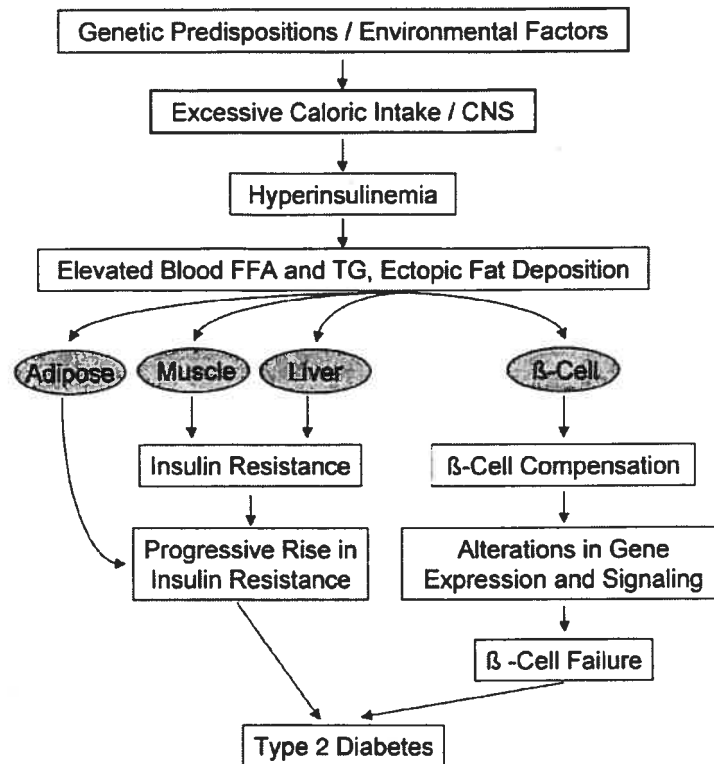


Figure 2 : Modèle nutritionnel de la pathogénèse du diabète de type 2. Une relation possible existante entre le diabète et l'obésité est illustrée. Selon une hypothèse généralement admise, les hauts niveaux d'acides gras circulants (FFA) et de triglycérides (TG), associés à des épisodes hyperglycémiques, pourraient modifier le système de transduction métabolique de la cellule pancréatique β et participer au développement du diabète de type 2 (tiré de Prentki M., *Diabetes* 2002 51 Suppl 3 :S405-413).

Les gènes *ABCC8* et *KCNJ11*, encodent respectivement le récepteur aux sulfonyles SUR1 et le canal potassique Kir6.2. Ensemble, ces deux protéines composent le canal potassique ATP-sensible (KATP) qui contrôle la sécrétion d'insuline dans la cellule β (Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. 1999; Schwanstecher, M. *et al.* 1999). Récemment, des polymorphismes répandus dans la population ont été découverts pour ces deux gènes (une mutation 3T/C dans l'exon 16 pour *ABCC8* et une mutation E23K pour *KCNJ11*) et ont été associés à un risque accru de développer le diabète de type 2 (Schwanstecher, C. *et al.* 2002a; Schwanstecher, C. *et al.* 2002b; Gloyn, A. L. *et al.* 2003). Ces mutations ont pour effet de modifier la réponse physiologique du canal KATP aux variations de concentration des nucléotides intra-cellulaires. Il en résulte une hyperactivité du canal KATP et une inhibition de la sécrétion d'insuline, prédisposant donc le porteur de la mutation à développer un diabète de type 2.

2 - L'HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE

L'homéostasie du glucose peut être défini par le maintien d'une glycémie relativement stable dans une zone physiologique allant de 3.6 mM à 6.1 mM de glucose. Elle résulte d'un équilibre entre : 1) l'ingestion de glucose et la production hépatique de glucose, d'un côté, et 2) l'utilisation du glucose par les tissus périphériques (foie, muscles, adipocytes), de l'autre (voir figure 2). Elle est principalement contrôlée par l'action de deux hormones pancréatiques, soit l'insuline qui représente un signal d'abondance hypoglycémiant et le glucagon, un agent hyperglycémiant (Ashcroft, F. M., Ashcroft, S.J.H. 1992; Guyton, A. C., and Hall, J.E. 1996). Le pancréas joue donc un rôle clé dans l'homéostasie du glucose.

2.1 - DU PANCRÉAS À L'INSULINE

Le pancréas est à la fois une glande exocrine et endocrine. Alors que les cellules exocrines comptent pour plus de 90% du pancréas, les cellules endocrines sont regroupées en structures sphériques appelées îlots de Langerhans (en hommage au découvreur) (figures 3 et 4). Chaque îlot est constitué d'environ 3000 cellules qui

appartiennent à une variété d'au moins 4 types cellulaires distincts. Les plus nombreuses sont les cellules β qui comptent pour 75 % de la masse cellulaire des îlots et qui sont responsables de la sécrétion d'insuline. L'autre 25 % comprend les cellules α qui sécrètent le glucagon, les cellules δ qui sécrètent la somatostatine et des cellules PP qui sécrètent le polypeptide pancréatique (Greenspan, F. S. 1991). Chaque cellule β contient environ 10 000 granules de sécrétion où est emmagasinée l'insuline sous forme de cristaux. L'insuline est une hormone composée de deux chaînes polypeptidiques liées par deux ponts disulfures. Elle est synthétisée sous la forme d'une pré-prohormone et elle subit une série de modifications dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi avant d'être emmagasinée dans les granules de sécrétion sous forme d'hexamères, coordonnée à des atomes de zinc (Greenspan, F. S. 1991; Ashcroft, F. M., Ashcroft, S.J.H. 1992).

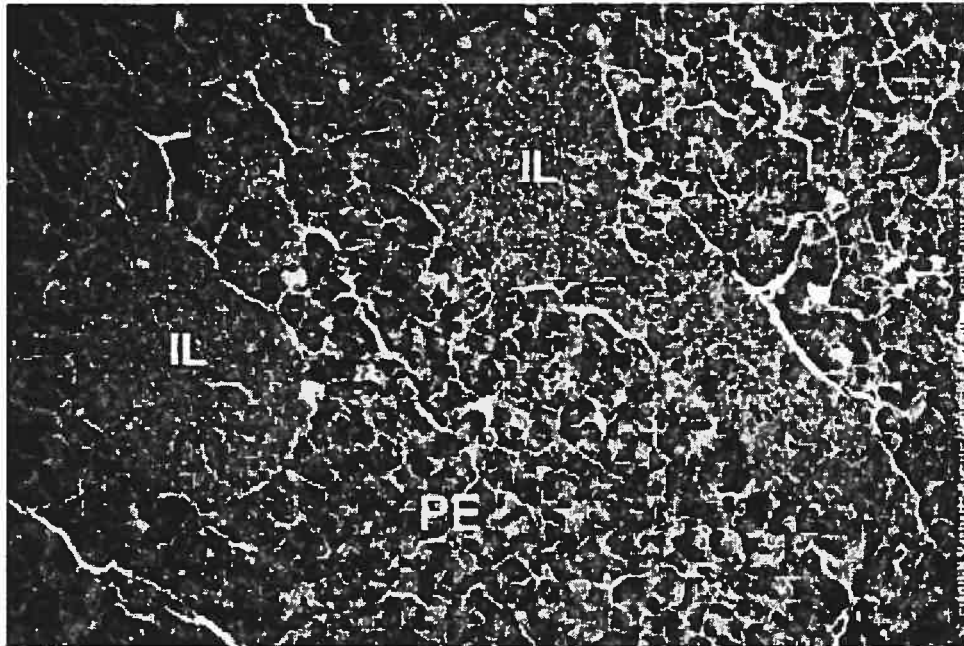


Figure 3 : Le pancréas : une glande endocrine et exocrine. La figure montre le parenchyme exocrine (PE) formé d'acini et deux volumineux îlots endocrines ou îlots de Langerhans (IL). Tiré du site internet de l'Université de Lyon : L'appareil digestif (voir cyber-bibliographie).

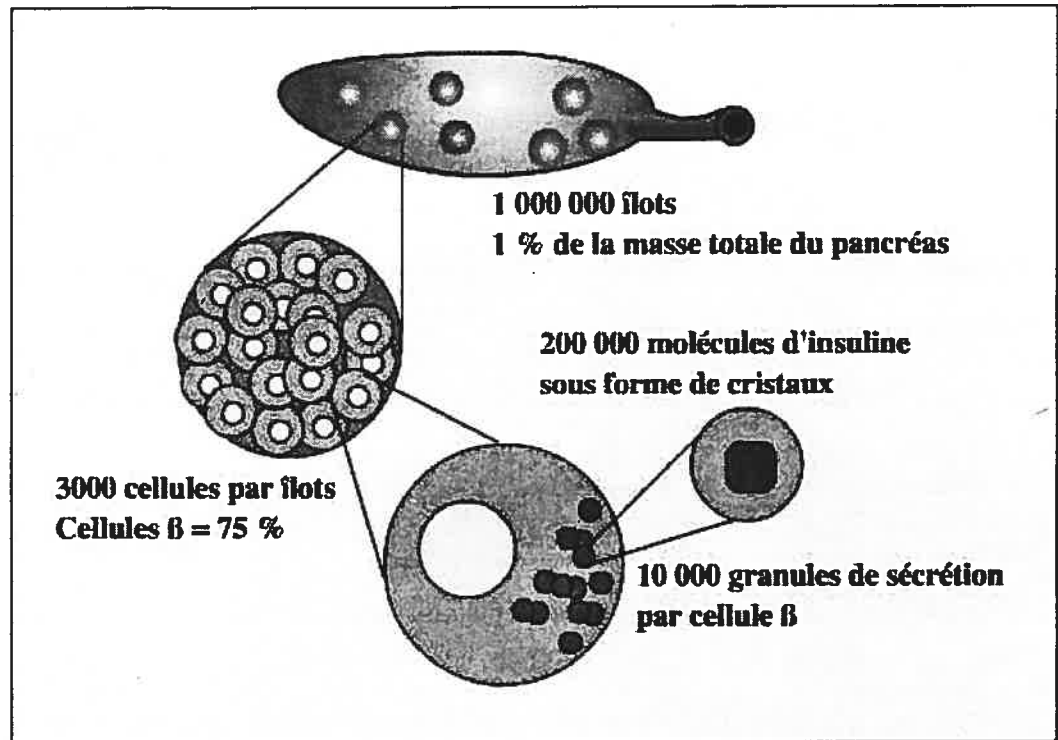


Figure 4 : Du pancréas à l'insuline. Représentation schématique du pancréas, d'un îlot de Langerhans et d'une cellule β contenant des granules pour la sécrétion d'insuline. Voir le texte pour une description.

L'insuline, une fois sécrétée, agit sur les tissus cibles en se liant à son récepteur qui possède une activité tyrosine-kinase. L'insuline constitue un signal d'abondance en glucose pour l'organisme et possède une action hypoglycémiante. L'insuline a de nombreux effets biologiques (figure 5). De nombreuses études ont montré ses effets sur la capture et l'utilisation du glucose, le métabolisme des acides gras, la synthèse de protéines, l'expression génique, la différenciation, la prolifération (Rabinovitch, A. *et al.* 1982; Romanus, J. A. *et al.* 1985) et la survie de plusieurs types cellulaires par son action anti-apoptotique (Yenush, L. *et al.* 1998). La prochaine section

discutera des mécanismes moléculaires par lesquels l'insuline exerce ses principales fonctions.

2.2 - L'ACTION DE L'INSULINE

Tel que mentionné ci-dessus, le contrôle précis de la glycémie fait surtout intervenir l'insuline et le glucagon, deux hormones pancréatiques. L'insuline, constituant un signal d'abondance en nutriments, favorise le stockage du glucose, des graisses et des acides aminés tout en empêchant la dégradation/utilisation des réserves. Ainsi, l'insuline stimule la capture du glucose par les tissus périphériques sensibles à l'insuline tels que le muscle et le tissu adipeux. Elle augmente l'emmagasinage du glucose sous forme de glycogène et des acides aminés sous forme de protéines.

L'augmentation de la capture du glucose est l'un des effets de l'insuline les plus étudiés. Jusqu'à 75% de l'effet de l'insuline sur la prise du glucose se produit au niveau du muscle alors que le tissu adipeux ne compte que pour une petite fraction de l'utilisation du glucose (Klip, A. *et al.* 1990). L'insuline augmente la capture du glucose en induisant la translocation du transporteur du glucose GLUT4 de l'intérieur de la cellule à la membrane plasmique. Le mécanisme précis par lequel l'insuline stimule la translocation de GLUT4 n'est pas entièrement élucidé. On sait toutefois qu'il fait intervenir la voie de signalisation de la PI-3K (Kanai, F. *et al.* 1993) et ses effecteurs en aval, la protéine kinase B (PKB) (Wang, Q. *et al.* 1999) et la protéine kinase C (PKC) ζ (Bandyopadhyay, G. *et al.* 1997; Standaert, M. L. *et al.* 1997).

L'insuline influence directement l'emmagasinage du glucose et des acides gras à court terme en modifiant l'activité de certaines enzymes du métabolisme. Ainsi, l'insuline diminue les niveaux d'AMPc et induit la phosphorylation d'enzymes du métabolisme pour moduler leur activité (Pilkis, S. J. and Granner, D. K. 1992; Kahn, C. R. 1994; Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. 2001). Aussi, le glucose lui-même, une fois capté, peut modifier l'activité de certaines enzymes de manière allostérique. Ainsi, l'insuline favorise la synthèse du glycogène en activant la glycogène synthase

et en inhibant la glycogène phosphorylase. Elle inhibe la glycolyse et la gluconéogenèse en induisant la phosphorylation de la phosphofructokinase-2 (PFK-2) et en inhibant la phosphoénolpyruvate carboxykinase. L'insuline augmente aussi la lipogénèse en activant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et en inhibant l'hormone-sensible lipase (HSL). L'insuline induit aussi la phosphorylation de l'hydroxy- β -méthylglutaryl (HMG)-CoA réductase pour favoriser la synthèse du cholestérol. Les effets à court terme de l'insuline varient toutefois selon les tissus.

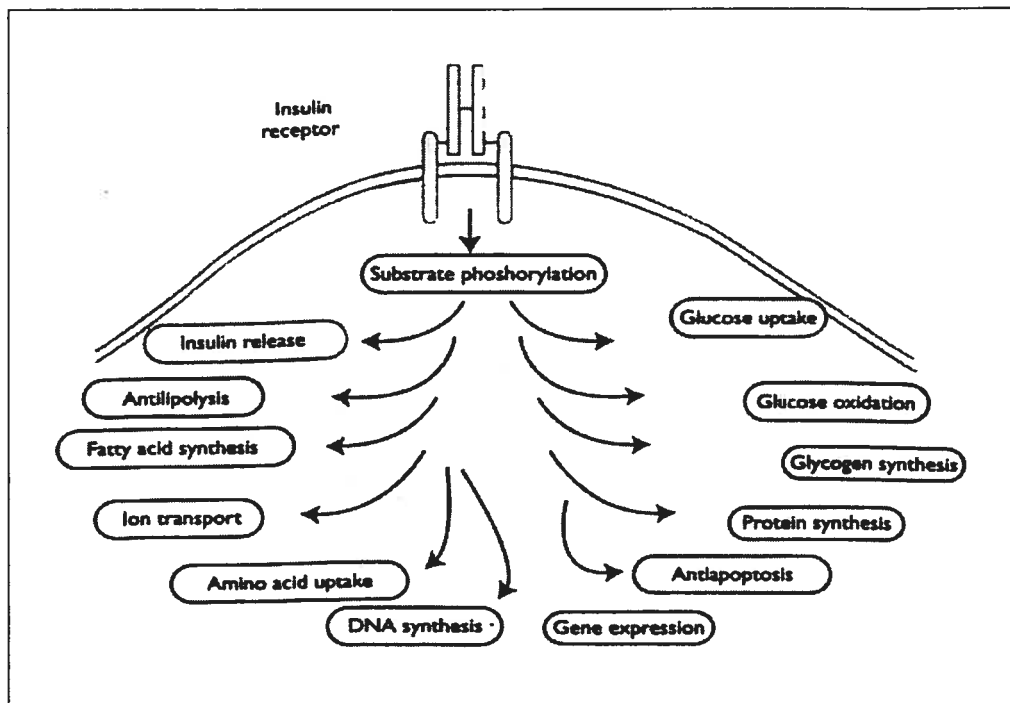


Figure 5 : L'action de l'insuline sur la cellule β et les tissus périphériques. Les principaux effets de l'insuline sont illustrés. Voir discussion dans le texte (tiré de Atlas of Diabetes, Science Press, 2000).

L'insuline ne stimule pas la capture du glucose au niveau du foie mais elle agit plutôt sur ce dernier en bloquant la glycogénolyse et la gluconéogenèse, d'une part, et en augmentant la synthèse de glycogène, d'autre part (Kulkarni, R. N. *et al.* 1999b)

(Bruning, J. C. *et al.* 1998). L'effet de l'insuline sur la gluconéogenèse peut s'expliquer par l'inhibition de la transcription du gène codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase, l'enzyme limitante pour la gluconéogenèse. L'insuline diminue aussi l'expression des gènes codant pour la fructose-1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase. De plus, l'insuline augmente la transcription des enzymes clés pour la glycolyse telles que la glucokinase, l'enzyme limitante pour la glycolyse, et la pyruvate kinase (L-PK). Ainsi, l'insuline augmente le métabolisme du glucose via une augmentation du flux glycolytique et une diminution de la gluconéogenèse (Pilkis, S. J. and Granner, D. K. 1992).

L'insuline agit aussi sur les tissus cibles en augmentant le stockage des substrats calorigéniques sous forme de graisses et en diminuant l'hydrolyse des graisses. Ainsi, l'insuline augmente l'expression de l'acide gras synthétase (FAS) et de l'ACC pour accroître la synthèse des acides gras (Wang, D. and Sul, H. S. 1998).

De nombreuses études ont démontré l'effet de l'insuline sur la différenciation cellulaire (Jiang, F. X. and Harrison, L. C. 2002) ainsi que sur la prolifération (Rabinovitch, A. *et al.* 1982; Romanus, J. A. *et al.* 1985) et la survie de plusieurs types cellulaires via son action anti-apoptotique (Yenush, L. *et al.* 1998).

2.3 - LE RÉCEPTEUR À L'INSULINE ET LES INSULIN-RECEPTOR SUBSTRATES 1-2

Le récepteur à l'insuline (IR), un récepteur à activité tyrosine-kinase, est une glycoprotéine hétérotétramérique composée de deux chaînes α extracellulaires et de deux chaînes β transmembranaires. Chaque chaîne α et β sont reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne α est responsable de l'interaction avec le ligand. L'insuline s'y lie dans une région riche en cystéines, ce qui cause une autophosphorylation en trans des chaînes β sur plusieurs résidus tyrosines. Cette autophosphorylation est nécessaire à l'activation de la voie de transduction du signal en réponse à l'insuline (Cheatham, B. and Kahn, C. R. 1995). L'inactivation du récepteur à l'insuline

implique sa déphosphorylation par la protéine tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) (Elchebly, M. *et al.* 1999). Une récente étude sur des animaux déficients en PTP-1B a d'ailleurs démontré que cette protéine est impliquée dans la modulation de la sensibilité à l'insuline et dans le métabolisme énergétique (Elchebly, M. *et al.* 1999). Les souris *knock-out* pour le gène de PTP-1B étant beaucoup plus sensibles à l'insuline que les souris témoins, elles présentaient une glycémie légèrement diminuée et des niveaux d'insuline réduits de moitié. Aussi, suite à un test de tolérance à l'insuline, les animaux déficients en PTP-1B ont démontré une phosphorylation accrue du récepteur à l'insuline. Enfin, les souris *knock-out* pour PTP-1B étaient résistantes à une diète riche en graisses alors que les souris témoins ont développé une résistance à l'insuline et un diabète associé à l'obésité. Cette étude suggère donc que PTP-1B pourrait être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du diabète de type 2 et de l'obésité en vertu de son rôle dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et dans le métabolisme des graisses.

La transduction du signal suite à la liaison de l'insuline à son récepteur s'effectue par une cascade de phosphorylations. En aval du récepteur à l'insuline, on retrouve premièrement les molécules IRS dont les membres IRS-1 et IRS-2 sont les plus étudiés. Les molécules IRS possèdent de nombreux sites de phosphorylation et peuvent servir de substrats pour diverses tyrosines kinases et sérine/thréonine kinases, telles que la protéine kinase A (PKA) et la PKC. La phosphorylation des molécules IRS provoque leur association à diverses protéines adaptatrices possédant des domaines d'homologie à Src 2 (SH2). Ces protéines adaptatrices (*docking proteins*, en anglais) recrutent d'autres protéines signalétiques tels que la PI-3K et ras par leur domaine SH3 (Sun, X. J. *et al.* 1991; Keller, S. R. *et al.* 1993).

Alors que IRS-1 et IRS-2 participent tous deux à la transduction de signaux en réponse aux facteurs de croissance, IRS-1 jouerait un rôle prédominant dans la transduction des signaux menant à la croissance embryonnaire et post-natale. Quant à IRS-2, il jouerait plutôt un rôle crucial au niveau de la transduction de signaux métaboliques (Withers, D. J. *et al.* 1999). Une récente publication portant sur des

animaux déficients pour le récepteur à l'insuline, IRS-1 et IRS-2, sous différentes combinaisons, suggère que IRS-1 jouerait un rôle plus important au niveau du muscle alors que IRS-2 serait important au niveau du foie (Kido, Y. *et al.* 2000).

2.4 - UNE SIGNALISATION AUTO- OU PARACRINE DE L'INSULINE SUR LA CELLULE PANCRÉATIQUE β

De nombreux groupes ont démontré au cours des dernières années la présence et l'importance d'une signalisation auto- ou paracrine de l'insuline sur la cellule pancréatique β . Ainsi, Velloso *et al.* ont démontré que l'insuline induit l'activation de son récepteur, la phosphorylation des molécules IRS-1/2, de même que leur association à la PI-3K dans la cellule pancréatique β (Velloso, L. A. *et al.* 1995). Cette activation de la voie signalétique par l'insuline de manière auto- ou paracrine pourrait mener à l'expression du gène de l'insuline et à une augmentation du contenu en insuline dans la cellule pancréatique β (Xu, G. G. and Rothenberg, P. L. 1998). En outre, l'inactivation spécifique du récepteur à l'insuline au niveau du pancréas endocrine (cellules β) chez la souris a créé un défaut de la sécrétion d'insuline similaire à celui rencontré dans le diabète de type 2 (Kulkarni, R. N. *et al.* 1999a). En effet, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose était altérée chez les animaux *knock-out* pour le récepteur à l'insuline spécifique à la cellule β .

Le rôle exact des IRS dans la cellule β fait l'objet d'un débat dans la littérature. Une première étude rapporte que des îlots de souris *knock-out* pour IRS-1 ne répondent pas correctement au glucose pour la sécrétion d'insuline (Kulkarni, R. N. *et al.* 1999b). Aussi, l'expression de l'insuline est réduite de moitié dans ces îlots en comparaison avec des îlots isolés d'animaux de type sauvage. Ces résultats suggèrent que IRS-1 joue un rôle crucial pour la cellule β et que sa seule mutation est nécessaire à induire des défauts sévères au niveau de la sécrétion d'insuline. Toutefois, une autre étude portant sur des animaux déficients pour IRS-2 a permis de conclure que IRS-2 jouait un rôle majeur dans le développement et la fonction de la cellule pancréatique β (Withers, D. J. *et al.* 1998). En effet, les souris déficientes pour

IRS-2 ont développé un diabète de type 2 suite à l'incapacité de la cellule β à compenser pour une résistance à l'insuline. Bien qu'elles ne soient pas contradictoires, ces deux études suggèrent que la perte d'un seul IRS est suffisante à induire le diabète. Elles mettent une fois de plus en évidence l'importance de la voie de transduction du signal en réponse à l'insuline dans la cellule pancréatique β .

3 - LA CELLULE PANCRÉATIQUE β

3.1 - LA SÉCRÉTION D'INSULINE

3.1.1 - LES SÉCRÉTAGOGUES DE LA CELLULE β

La cellule β est considérée comme un « senseur de glucose ». Elle régule activement la glycémie par la sécrétion d'insuline. La sécrétion d'insuline peut être provoquée par deux catégories d'agents, soit les nutriments calorigéniques et les agents neurohormonaux (figure 6).

Parmi les nutriments calorigéniques pouvant agir en tant que sécrétagogues, on retrouve bien entendu le glucose mais aussi les acides gras (tels que l'oléate et le palmitate, deux acides gras abondants dans la nutrition) et les acides aminés (tels que l'arginine, la leucine et la glutamine). L'usage d'analogues non-métabolisables (comme le 3-O-méthylglucose et le bromo-palmitate par exemple) a démontré que l'action des nutriments calorigéniques sur la sécrétion d'insuline nécessite obligatoirement qu'ils soient métabolisés.

Dans la catégorie des agents neurohormonaux on retrouve majoritairement des hormones polypeptidiques du tractus gastro-intestinal tels que le glucagon, le *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (GIP), le *vasoactive intestinal peptide* (VIP), la cholécystokinine (CCK) et le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1). L'effet des hormones gluco-incrétines sur la sécrétion d'insuline nécessite la liaison d'un récepteur spécifique et l'activation de voies de transduction de signaux.

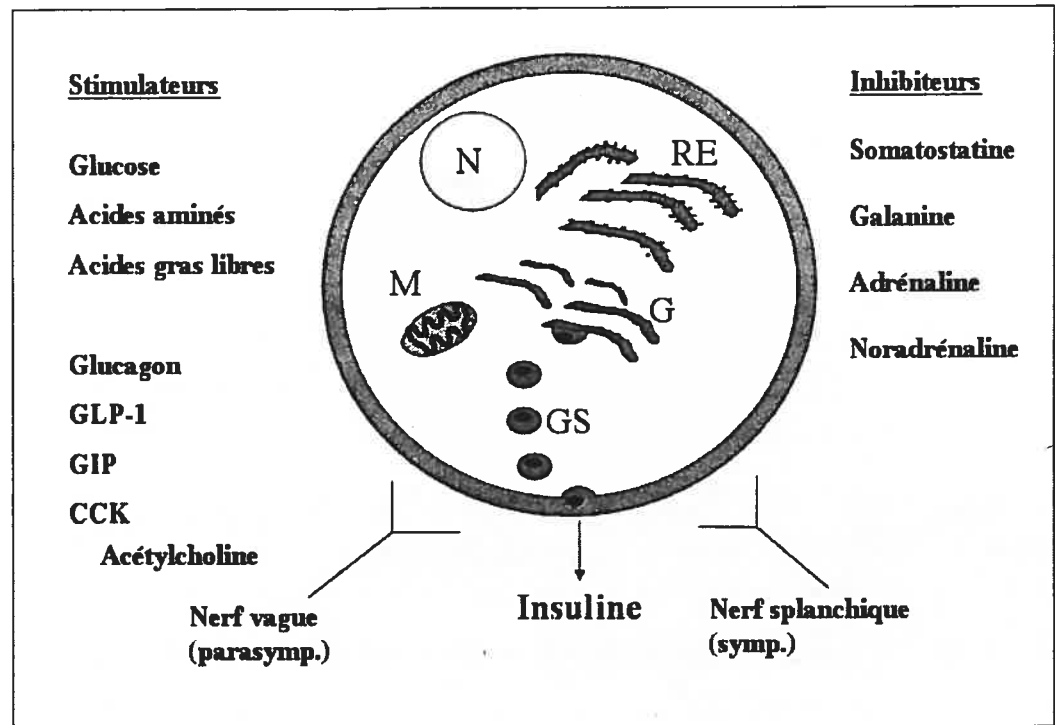


Figure 6 : Principaux stimulateurs et inhibiteurs de la cellule β pour la sécrétion d'insuline. CCK, cholécystokinine; G, appareil de Golgi; GIP, glucose-dependent insulintropic polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GS, granule de sécrétion; M, mitochondrie; N, noyau; RE, réticulum endoplasmique.

3.1.2 - LES MÉCANISMES DE LA SÉCRÉTION D'INSULINE

Malgré les nombreuses études et les efforts déployés par plusieurs groupes de recherche, le mécanisme précis par lequel le glucose stimule la sécrétion d'insuline n'a pas été entièrement élucidé. Un modèle largement admis lie étroitement la sécrétion d'insuline induite par le glucose à la glycolyse et à l'élévation des concentrations d'ATP et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaires (figure 7).

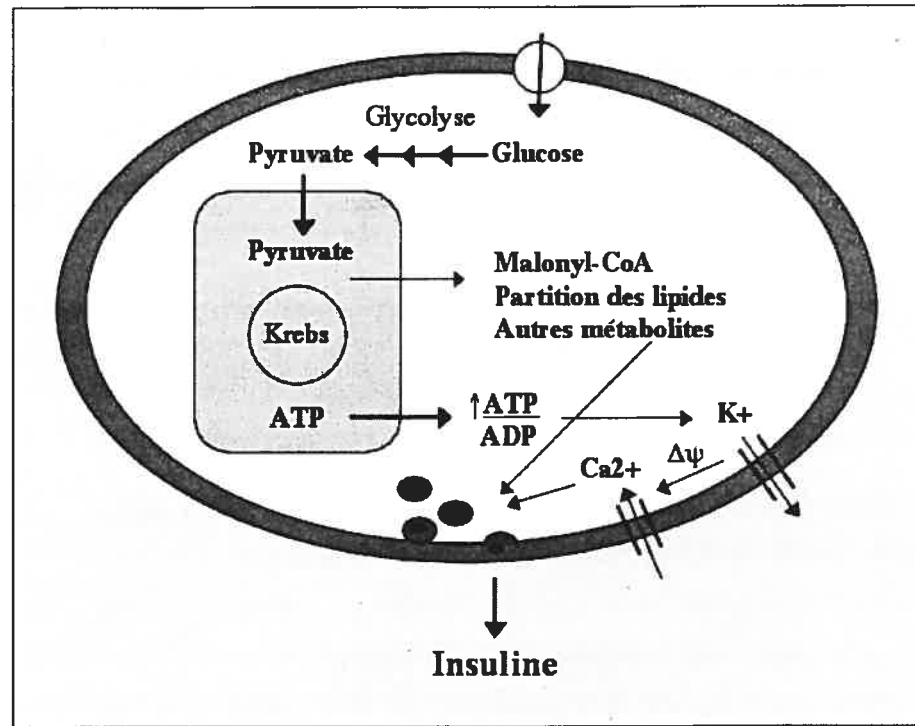


Figure 7 : Modèle illustrant les deux voies métaboliques activées par le glucose dans la cellule β pour la sécrétion d'insuline. Voir description dans le texte.

Selon ce modèle, le glucose est transporté à l'intérieur de la cellule par la protéine membranaire GLUT2. Il est ensuite phosphorylé par la glucokinase, enzyme limitante de la glycolyse, ce qui provoque son oxydation dans la voie glycolytique. Pour chaque molécule de glucose, deux molécules de pyruvate sont alors formées, lesquelles entrent dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-CoA pour générer de l'ATP. La hausse du rapport ATP/ADP a pour effet d'induire la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP, la dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de calcium dans le cytoplasme de la cellule β déclenche alors l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline (Prentki, M. 1996; Deeney, J. T. *et al.* 2000b; Prentki, M. *et al.* 2002).

Des études ultérieures ont toutefois démontré que le glucose pouvait induire la sécrétion d'insuline d'une manière dose-dépendante en présence de diazoxide (un agent pharmacologique qui empêche la fermeture des canaux potassiques) et d'une concentration cytosolique de Ca^{2+} élevée (Gembal, M. *et al.* 1992). La sécrétion d'insuline induite par le glucose fait donc appel à un mécanisme alternatif qui serait indépendant de son action sur les canaux potassiques et calciques. Ce mécanisme demeure encore inconnu à ce jour bien qu'une majorité de groupes de recherche se rallient à l'hypothèse selon laquelle l'anaplérose, une sortie des intermédiaires du cycle de Krebs, pourrait être impliquées dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Brun, T. *et al.* 1996; Prentki, M. and Corkey, B. E. 1996; Antinozzi, P. A. *et al.* 1998; Farfari, S. *et al.* 2000). De récentes études ont permis une avancée des connaissances dans ce domaine. Une hypothèse intéressante suggère que le citrate, suite à son accumulation, générerait un dérivé lipidique (comme le malonyl-CoA) jouant un rôle clé dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Brun, T. *et al.* 1996; Prentki, M. 1996; Prentki, M. and Corkey, B. E. 1996; Prentki, M. *et al.* 1997; Corkey, B. E. *et al.* 2000; Deeney, J. T. *et al.* 2000a; Alarcon, C. *et al.* 2002; Masiello, P. *et al.* 2002). Les niveaux accrus de malonyl-CoA en réponse au glucose inhiberaient la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-1) qui catalyse l'étape limitante de l'oxydation des graisses. L'inhibition de l'oxydation des acides gras pourrait causer une hausse des niveaux d'acyls-CoA intracellulaires et une augmentation de l'estérification des graisses. Ainsi, l'accumulation d'intermédiaires du cycle de Krebs (tel que le citrate) participerait à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en modifiant la partition (oxydation/estérification) des lipides.

3.2 - LA BIOSYNTHÈSE D'INSULINE

Chez la plupart des espèces, la prépro-insuline provient d'un seul gène, sauf chez la souris et le rat où deux gènes non-alléliques sont présents (Melloul, D. *et al.* 2002a). Chez l'humain, des cellules positives pour l'insuline sont détectées à la 8^e semaine du

développement embryonnaire dans une région du tractus gastro-intestinal d'où le pancréas se développera (Polak, M. *et al.* 2000).

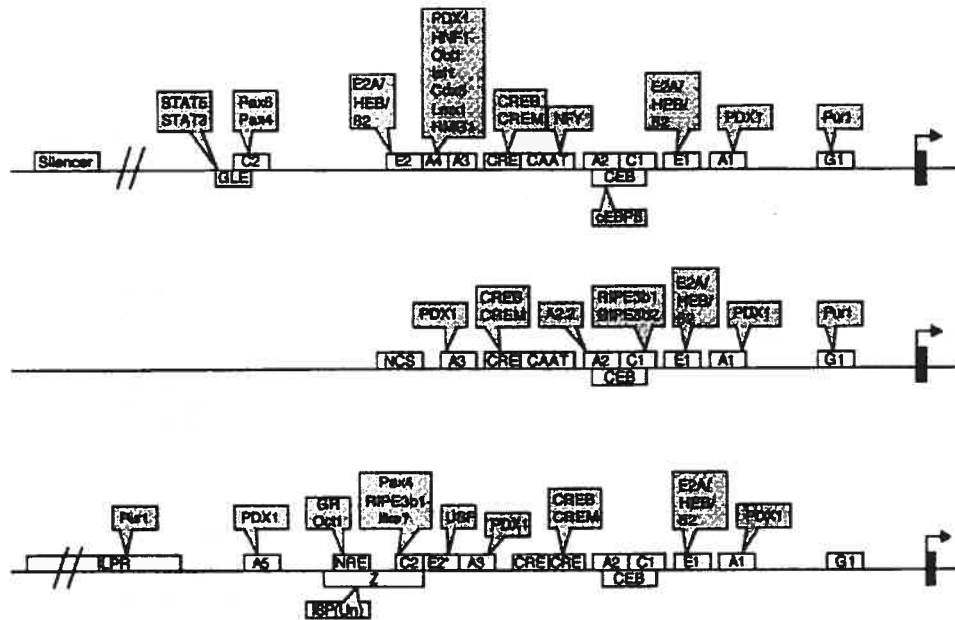


Figure 8 : Schéma organisationnel des promoteurs du gène de l'insuline de rat I, de rat II et de l'humain. Les promoteurs des gènes de l'insuline de rat I (en haut), de rat II (au milieu) et de l'humain (en bas) sont illustrés. Divers éléments de réponse pour la liaison de facteurs de transcription agissant en cis sont également représentés (tiré de Melloul D., *Diabetologia* 2002 45 : 309-326).

Des études de délétion et de mutation du promoteur de l'insuline ont permis de démontrer que la biosynthèse d'insuline est régulée par une variété de facteurs de transcription ubiquitaires ou spécifiques à la cellule β (figure 8). Ces facteurs de transcription forment un réseau complexe et agissent de concert pour stimuler l'expression du gène de l'insuline (Boj, S. F. *et al.* 2001; Hansen, S. K. *et al.* 2002).

Le promoteur du gène de l'insuline comprend entre autres des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1, NeuroD/Beta2, E2A, HNF-1 α , PDX-1, et *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) qui sont tous des régulateurs positifs de l'expression du gène de l'insuline (Melloul, D. *et al.* 2002a). Deux publications récentes ont permis l'identification de nouveaux facteurs de transcription pouvant participer à l'expression du gène de l'insuline en se liant directement à son promoteur, soit les facteurs de transcription HNF-4 α (Bartoov-Shifman, R. *et al.* 2002) et MafA (aussi appelé RIPE3b) (Olbrot, M. *et al.* 2002) (Kataoka, K. *et al.* 2002). Ainsi, plusieurs voies de transduction de signaux sont reconnues pour augmenter l'expression du gène de l'insuline. Parmi les plus étudiées, on note la voie AMPc/PKA qui active l'activité transcriptionnelle de CREB pour mener à une augmentation de l'expression du gène de l'insuline (Skoglund, G. *et al.* 2000).

L'expression du gène de l'insuline est influencée par les nutriments calorigéniques (glucose, acides gras libres et acides aminés) de même que par une variété d'hormones polypeptidiques. Bien entendu, le glucose est l'agent insulino-tropique le plus étudié mais, depuis quelques années, l'action de l'hormone gluco-incréatine GLP-1 suscite beaucoup d'intérêt (Melloul, D. *et al.* 2002a).

Bien que l'effet du glucose sur la biosynthèse d'insuline fut rapporté pour la première fois il y a plus de 30 ans (Jarrett, R. J. and Cohen, N. M. 1967), nous commençons à peine à comprendre le mécanisme moléculaire par lequel le glucose peut exercer son action. Les premières études ont démontré que le glucose contrôle les niveaux d'ARNm de l'insuline en augmentant son expression et sa stabilité (Permutt, M. A. and Kipnis, D. M. 1972b; Permutt, M. A. and Kipnis, D. M. 1972a; Docherty, K. and Clark, A. R. 1994). On sait aujourd'hui que le glucose augmente l'expression du gène de l'insuline par un mécanisme qui implique une hausse du calcium intracellulaire (German, M. S. *et al.* 1990; Efrat, S. *et al.* 1991; Leibiger, B. *et al.* 1998) et l'activation de la voie *calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII), d'une part, et l'activation de la PI-3K, d'autre part (Macfarlane, W. M. *et al.* 1994; Macfarlane, W. M. *et al.* 1997), ce qui mène à l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du

facteur de transcription PDX-1. Cette activation de PDX-1 par le glucose pourrait faire intervenir la voie de signalisation p38 en tant que cible en aval de la PI-3K (Macfarlane, W. M. *et al.* 1997) bien que ce résultat fut contredit par un autre groupe (Rafiq, I. *et al.* 2000). Une récente étude a enfin démontré que le glucose augmente l'expression et l'activité du facteur de transcription MafA pour promouvoir l'expression du gène de l'insuline (Kataoka, K. *et al.* 2002).

Il a été démontré que l'exposition prolongée des cellules β aux acides gras diminue la biosynthèse d'insuline (Yoshikawa, H. *et al.* 2001) (Bjorklund, A. and Grill, V. 1999; Furukawa, H. *et al.* 1999). Ainsi, une étude a démontré que le palmitate cause une diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription PDX-1 (Gremlich, S. *et al.* 1997) pour réduire l'expression du gène de l'insuline induite par le glucose. Toutefois, on ne sait toujours pas si cet effet du palmitate lui est propre ou s'il est partagé par les acides gras en général. Des résultats préliminaires obtenus au cours de mes travaux de maîtrise suggèrent que l'oléate, contrairement au palmitate, augmenterait l'activité de la PI-3K et la liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1. Une autre étude a démontré qu'une exposition prolongée des cellules β aux acides gras (oléate :palmitate dans un ratio 2 :1) augmente le niveau de pro-insuline mais diminue les concentrations intracellulaires d'insuline via une inhibition de la conversion de la pro-insuline en insuline (Furukawa, H. *et al.* 1999). Il en résulte une élévation du rapport pro-insuline/insuline intracellulaire. Selon cette étude, les acides gras diminuerait les niveaux des prohormones convertases PC2 et PC3, de même que celui d'une protéine activatrice de PC2, 7B2 (Furukawa, H. *et al.* 1999), ce qui pourrait expliquer la diminution de la conversion de la pro-insuline en insuline. Toutefois, il faut noter qu'au cours de cette étude, les auteurs ont employé une dose supra-physiologique d'acides gras libres (0.5 mM total pour 0.37 mM d'acides gras libres) dû à une concentration d'albumine trop faible. Enfin, une autre étude a démontré que le palmitate combiné à de hautes concentrations en glucose diminue les niveaux de pro-insuline et d'insuline, en plus d'augmenter de près de 5 fois le rapport pro-insuline/insuline dans les îlots (Bjorklund, A. and Grill, V. 1999).

Le GLP-1, une hormone gluco-incréatine, augmente aussi l'expression du gène de l'insuline. Son action insulino-tropique, ajoutée à son effet sur la sécrétion d'insuline, fait du GLP-1 un agent thérapeutique potentiel et prometteur dans le traitement du diabète de type 2. De nombreux groupes de recherche tentent aujourd'hui de définir les mécanismes précis par lequel le GLP-1 augmente l'expression du gène de l'insuline. Il a été démontré que le GLP-1 augmente l'expression du gène de l'insuline via l'activation de CREB (Bjorklund, A. and Grill, V. 1999) d'une manière indépendante de la PKA mais dépendante des *cAMP-regulated guanine exchange factors* (Epac) (Kang, G. *et al.* 2001). Le GLP-1 augmente aussi l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 (Buteau, J. *et al.* 1999; Hussain, M. A. and Habener, J. F. 2000; Stoffers, D. A. *et al.* 2000) via la voie de signalisation de la PI-3K (Buteau, J. *et al.* 1999). L'action du GLP-1 sur la biosynthèse d'insuline sera discutée en détail dans la section 5.5 intitulée « Un activateur de la biosynthèse d'insuline ».

3.3 - LA PROLIFERATION DE LA CELLULE β

Tel que décrit plus haut, le diabète de type 2 est caractérisé par une incapacité à produire suffisamment d'insuline pour répondre aux exigences de l'organisme. Cette décompensation de la cellule β peut s'expliquer en partie par une diminution de sa réplication (Hellerstrom, C., Andersson, A., Swenne, I., Welsh, N. and Sjöholm, A. 1988) et par un dérèglement de la balance réplication/apoptose (Sjöholm, A. 1996; Tanigawa, K. *et al.* 1996a; Tanigawa, K. *et al.* 1996b). Une capacité limitée à la régénération prédisposerait donc à la maladie (Swenne, I. 1992). D'ailleurs, on a observé que la masse de cellules β est réduite chez les patients diabétiques de type 2 par rapport aux sujets sains de même poids (Kloppel, G. *et al.* 1985). Pour ces raisons, les agents augmentant la prolifération de la cellule β et les mécanismes impliqués dans sa réplication font l'objet de nombreuses études.

L'augmentation de la masse de cellules β s'effectue par deux mécanismes distincts, soit 1) par la différenciation de cellules β immatures en cellules β matures; et 2) par la

réplication des cellules β déjà existantes (Scharfmann, R. and Czernichow, P. 1996; Bonner-Weir, S. 2000a; Bonner-Weir, S. 2000b; Bonner-Weir, S. and Sharma, A. 2002).

3.3.1 - LA DIFFÉRENCIATION DE LA CELLULE β

Certains groupes ont suggéré que la régénération de la masse de cellules β proviendrait majoritairement de la différenciation de cellules précurseurs par un processus de néogénèse puisque la réplication des cellules β existantes est très faible. Deux hypothèses différentes divisent les groupes de recherche travaillant dans le domaine de la néogénèse de la cellule β , bien qu'elles ne soient pas forcément contradictoires.

Selon une première hypothèse, on pourrait retrouver une quantité de cellules souches toujours disponibles pour la différenciation dans le pancréas. Il est généralement admis que des cellules souches demeurent dans le canal pancréatique (Bonner-Weir, S. *et al.* 1993) et dans le tissu exocrine (Pour, P. M. 1994). Certains diront que la preuve que ces cellules peuvent se différencier en cellules β fonctionnelles n'a pas été démontrée hors de tout doute (Bouwens, L. 1998; Bonner-Weir, S. and Sharma, A. 2002). Pour cela, il faudrait suivre une cellule souche individuelle et provoquer sa différenciation en une cellule β mature fonctionnelle exprimant les marqueurs moléculaires propres à la cellule β ce qui n'a pas été fait à ce jour.

Selon une deuxième hypothèse, la régénération de la cellule β impliquerait plutôt un mécanisme de transdifférenciation, c'est-à-dire que des cellules différenciées du pancréas endocrine ou exocrine auraient la possibilité de « revenir en arrière » vers un état moins différencié leur permettant alors de se convertir en cellules β fonctionnelles. Le travail de Wang au cours duquel on a suivi la transdifférenciation d'une cellule du canal pancréatique jusqu'à l'apparition de marqueurs moléculaires spécifiques à la cellule β (tel que le transporteur de glucose GLUT2) supporte cette hypothèse (Wang, R. N. *et al.* 1995).

3.3.2 - LA RÉPLICATION DE LA CELLULE β

On estime que la production de nouvelles cellules β par réplication équivaut à 3% par jour et décline avec l'âge. En fait, seulement 10% de la population de cellules β garderait sa capacité à se diviser, les autres entrant dans une phase G₀ infinie pour devenir sénescente (Swenne, I. 1983).

Le glucose est un stimulateur reconnu de la prolifération des cellules β tant adultes que fœtales (Sjoholm, A. 1992) et son effet est bien documenté. Son métabolisme semble essentiel à ce processus puisque le 3-O-méthylglucose, un analogue non métabolisable du glucose, est sans effet sur la prolifération de la cellule β (King, D. L. and Chick, W. L. 1976; King, D. L. *et al.* 1978; Swenne, I. *et al.* 1980). La mitogénèse des îlots de rats en réponse au glucose semble impliquer aussi l'activation de la voie de transduction de signaux de la PKC et des petites protéines G (Sjoholm, A. 1997). Parmi les autres nutriments calorigéniques ayant un effet prolifératif sur la cellule pancréatique β on retrouve les acides aminés (Swenne, I. *et al.* 1980) et certains acides gras libres (Roche, E. *et al.* 1999) (Maedler, K. *et al.* 2001) (Schrezenmeir, J. a. L., C. 1997). En effet, les acides gras acide oléique et α -linoléique induisent la prolifération des îlots néo-nataux d'une manière dose-dépendante contrairement aux acides palmitique, stéarique et linoléique qui n'ont aucun effet sur la prolifération de la cellule β (Schrezenmeir, J. a. L., C. 1997; Roche, E. *et al.* 1999; Maedler, K. *et al.* 2001).

Parmi les hormones prolifératives les plus étudiées, on retrouve l'hormone de croissance, la prolactine, l'IGF et l'insuline. Le GLP-1 s'est aussi vu accorder beaucoup d'intérêt au cours des dernières années en tant que facteur croissance pour la cellule β et son action sera discuté à la section 5.6 intitulée « Le GLP-1 augmente la masse de cellules β ». L'hormone de croissance et la prolactine augmentent toutes deux la prolifération de la cellule β par un mécanisme impliquant la voie Janus kinase 2 (JAK2)/*signal transducer and activator of transcription* (STAT) et plus

précisément STAT 1 et 3 (Sekine, N. *et al.* 1996) de même que STAT5 (Cousin, S. P. *et al.* 1999). L'insuline et l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1), qui sont deux hormones sécrétées par la cellule β , exercent aussi une action proliférative sur la cellule β par un mécanisme auto- ou paracrine (Rabinovitch, A. *et al.* 1982; Romanus, J. A. *et al.* 1985). Les travaux du groupe du Dr Rhodes ont permis de démontrer l'implication de la voie IRS/PI-3K dans l'action proliférative de l'IGF-1 sur la cellule pancréatique β (Hugl, S. R. *et al.* 1998; Schuppin, G. T. *et al.* 1998). L'action proliférative de l'IGF-1 est glucose dépendante (Hugl, S. R. *et al.* 1998) puisque l'effet de l'IGF-1 sur la prolifération de la cellule β augmente avec la concentration en glucose.

Enfin, certaines hormones ont un effet inhibiteur sur la réplication de la cellule β et c'est le cas par exemple des agonistes α -adrénergiques qui causent non seulement une inhibition de la prolifération mais aussi une inhibition de la sécrétion d'insuline (Sjoholm, A. 1996). Certaines cytokines, entre autres l'interleukin-1 β (IL-1 β), le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) et l'interféron- γ (IFN γ) causent aussi une inhibition de la prolifération de la cellule β et augmentent l'apoptose (Southern, C. *et al.* 1990; Eizirik, D. L. *et al.* 1991).

Plusieurs études ont démontré que la réplication de la cellule β pouvait impliquer la synthèse d'AMPc et l'activation de la voie de transduction du signal AMPc/PKA. Toutefois, l'implication de l'AMPc demeure un sujet de discorde dans la littérature puisque certains défendent son action proliférative alors que d'autres rapportent un effet inhibiteur de l'AMPc sur la prolifération de la cellule β .

Ainsi, la forskoline (un agent activateur de l'adénylate cyclase) et le Sp-AMPc (un analogue de l'AMPc) augmentent tous deux la prolifération de cellules β néo-natales en culture (Sjoholm, A. 1991; Sjoholm, A. 1992). Par contre, la forskoline diminue la prolifération de la lignée cellulaire β TC1 (Lavergne, C. *et al.* 1992). Un autre analogue de l'AMPc, le 8-bromo-AMPc augmente la réplication de la cellule β néo-natale (Rabinovitch, A. *et al.* 1980). On a rapporté que le dibutyryl-AMPc augmente

(Rabinovitch, A. *et al.* 1980; Logothetopoulos, J. *et al.* 1983) et diminue (Swenne, I. 1982) la prolifération de la cellule β . La théophylline qui est un inhibiteur de la phosphodiesterase (enzyme responsable de la dégradation de l'AMPc) diminue la réplication de la cellule β en culture (Nielsen, J. H. 1985). Toutefois, l'usage d'un autre inhibiteur de la phosphodiesterase, soit l'isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) à de faibles doses, a augmenté la réplication (Rabinovitch, A. *et al.* 1980; Nielsen, J. H. 1985) alors qu'il l'a diminué à de hautes concentrations (Rabinovitch, A. *et al.* 1980).

On voit donc qu'il y a mésentente quant à l'effet de l'AMPc sur la prolifération de la cellule β . Toutefois, il faut être prudent lors de l'analyse de tout ces résultats car les agents employés ne sont pas tous spécifiques. Ainsi, l'emploi du dibutyryl-AMPc, par exemple, produit du butyrate qui est connu pour être un inhibiteur de la prolifération (Sjoholm, A. 1992). Le conflit peut donc provenir de plusieurs facteurs dont : 1) le type cellulaire utilisé (lignées cellulaires, îlots de rats adultes ou pré-nataux); 2) le choix des agents pharmacologiques; et 3) la concentration des agents utilisés.

Un constat très intéressant vient du fait que la réplication de la cellule β semble corrélérer avec la biosynthèse d'insuline. Bien que l'hypothèse selon laquelle ces deux processus pourraient être reliés ait été déjà énoncée (Sjoholm, A. 1992), elle n'a pas fait l'objet de recherches approfondies.

3.3.3 - LES CELLULES SOUCHES : AU CŒUR D'UNE STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE POUR LE DIABÈTE

La transplantation d'îlots pancréatiques est une stratégie prometteuse dans le traitement des diabètes de type 1 et 2. Cette approche thérapeutique suscite beaucoup d'intérêt suite à la publication d'une étude démontrant son efficacité à corriger la glycémie chez le patient diabétique dans un protocole d'immunosuppression sans glucocorticoïde (Shapiro, A. M. *et al.* 2000). Toutefois, ce type d'intervention est limité par le manque de donneurs d'organes et le faible taux d'îlots survivants aux

protocoles d'extraction/transplantation (Bonner-Weir, S. 2000b; Bonner-Weir, S. and Sharma, A. 2002). En effet, il faut en général plusieurs donneurs pour recueillir suffisamment d'îlots pour greffer un seul receveur (Bonner-Weir, S. 2000b). Il devient donc important de développer des stratégies pour remédier à la faible disponibilité d'îlots pancréatiques. D'un côté, certains groupes ont tenté de modifier génétiquement divers types cellulaires tels que les hépatocytes (Ferber, S. *et al.* 2000) ou les cellules intestinales K (Tang, S. C. and Sambanis, A. 2003) afin de leur rendre un phénotype proche de la cellule β . Toutefois, les cellules obtenues par *genetic engineering* ne sont pas aussi performantes que les cellules β normales puisque leur contenu en insuline est généralement très faible. De plus, il manque à ces « cellules β de remplacement » la machinerie métabolique et signalétique nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Il s'ensuit des défauts majeurs au niveau de la cinétique de sécrétion et de la sensibilité au glucose. De l'autre côté, la production de cellules sécrétrices d'insuline à partir de cellules souches embryonnaires a aussi fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années. Plusieurs études ont démontré la correction de la glycémie chez des animaux diabétiques par la transplantation d'îlots obtenus à partir de tissu embryonnaire (Soria, B. *et al.* 2002) ou du canal pancréatique qui contiendrait, même chez l'adulte, des cellules souches (Ramiya, V. K. *et al.* 2000). Le champ de recherche sur la transplantation d'îlots ajoute beaucoup d'importance quant à l'étude des mécanismes impliqués dans la différenciation de la cellule β et « l'expansion » de la masse de cellules β *in vitro*.

La nécessité de découvrir de nouveaux agents pouvant induire la différenciation et la réplification de la cellule β pour des fins de transplantation a permis une avancée spectaculaire des connaissances en ce domaine au cours des dernières années. Une découverte importante fut l'identification de l'*islet neogenesis associated protein* (INGAP), le composé actif de l'îlotropine (Rafaeloff, R. *et al.* 1997). L'îlotropine, obtenue à partir de pancréas de hamster enrobés de cellophane, est un extrait protéique augmentant la néogénèse d'îlots (Rafaeloff, R. *et al.* 1997). L'INGAP est exprimé tant au niveau du canal pancréatique, que du tissu exocrine et du tissu

endocrine dans le pancréas de hamster (Flores, L. E. *et al.* 2003). De récentes études ont démontré que INGAP participe à la régulation de la néogénèse d'îlots (Rafaeloff, R. *et al.* 1997; Gagliardino, J. J. *et al.* 2003) et suggéré que des cellules positives à la fois pour l'INGAP et PDX-1 constitueraient une sous-population de cellules souches (Gagliardino, J. J. *et al.* 2003).

3.4 – L'APOPTOSE DE LA CELLULE β

On sait depuis plusieurs années que le diabète de type 1 est caractérisé par une absence de cellules β , suite à leur destruction par un mécanisme qui implique généralement une réaction auto-immune. Or, il est admis depuis peu que le diabète de type 2 impliquerait une insuffisance relative de la masse de cellules β , résultant de l'apoptose des cellules β (Butler, 2002). Ainsi, on peut suggérer que les deux types de diabète, soit le diabète de type 1 et de type 2, comporteraient une composante commune, soit la destruction des cellules β menant respectivement à l'absence ou l'insuffisance relative de la masse de cellules β .

La destruction des cellules β dans le diabète de type 1 dépend de l'interaction entre les macrophages, les cellules CD4⁺ et CD8⁺ qui provoquent des lésions inflammatoires (Stassi, G. *et al.* 1997; Amrani, A. *et al.* 1999; Anderson, B. *et al.* 1999; Gonzalez, A. *et al.* 2001; Mathis, D. *et al.* 2001). Au cours de ce processus, la production de facteurs solubles tel que l'oxyde nitrique (NO) et des cytokines cause l'apoptose des cellules β . Le rôle des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IFN γ dans le diabète de type 1 a fait l'objet de publications de manière intensive (Mandrup-Poulsen, T. 1990; Mandrup-Poulsen, T. 1996; Mandrup-Poulsen, T. 2001; Mathis, D. *et al.* 2001).

Les nutriments calorigéniques sont les régulateurs principaux de la fonction de la cellule β . Alors que le glucose et les acides gras sont des stimulateurs de la sécrétion d'insuline à court terme, leurs effets à long termes sont paradoxalement néfastes pour la cellule β . Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que les régimes riches en

graisses ou en hydrates de carbones étaient associés à une dysfonction de la cellule β (Shang, W. *et al.* 2002). Cette dysfonction de la cellule β implique une augmentation de la mort des cellules β et pourrait jouer un rôle dans la phase de décompensation de la cellule β . C'est le cas par exemple chez la gerboise *Psammomys obesus* (Donath, M. Y. *et al.* 1999; Leibowitz, G. *et al.* 2001), un modèle animal nutritionnel du diabète de type 2. Chez ces animaux, une diète hyper-calorique riche en graisses et en hydrates de carbones, induit le diabète en partie via l'augmentation de l'apoptose de la cellule β . L'effet toxique du glucose (glucotoxicité) et des acides gras (lipotoxicité) seuls, ou combinés (glucolipotoxicité) sur la cellule β sera discuté au cours des prochaines sections.

3.4.1 – LA GLUCOTOXICITÉ

De récentes études ont démontré que l'hyperglycémie chronique constitue un stress pour la cellule β . La somme des effets néfastes du glucose est appelée « glucotoxicité » et il est généralement admis que la dédifférenciation de la cellule β provoquée par son exposition prolongée à de hautes concentrations de glucose pourrait contribuer au défaut de sécrétion d'insuline dans la pathologie du diabète (Briaud, I. *et al.* 1999; Kaiser, N. *et al.* 2003). En effet l'expression prolongée de la cellule β à de hautes concentrations de glucose provoque une désensibilisation au glucose en terme de sécrétion d'insuline (Ling, Z. *et al.* 1996; Roche, E. *et al.* 1998), une hypertrophie et une dédifférenciation de la cellule β (Jonas, J. C. *et al.* 1999; Jonas, J. C. *et al.* 2001). Cette dédifférenciation de la cellule β est accompagnée par une augmentation de l'expression de *c-myc* et les changements morphologiques corrént aussi avec une diminution de l'expression de certains facteurs de transcription et de gènes importants pour la sécrétion d'insuline (Jonas, J. C. *et al.* 1999; Jonas, J. C. *et al.* 2001). Une autre étude a rapporté que l'exposition prolongée de la cellule β à de hautes concentrations de glucose diminue les niveaux des facteurs de transcriptions PDX-1 (Leibowitz, G. *et al.* 2001; Melloul, D. *et al.* 2002c; Robertson, R. P. *et al.* 2003) et MafA (Sharma, A. *et al.* 1995). La baisse des niveaux

de ces deux facteurs de transcription importants pour la fonction de la cellule β contribuerait à la diminution de l'expression du gène de l'insuline.

De nombreuses publications ont documenté l'effet pro-apoptotique du glucose à fortes doses sur la cellule pancréatique β . Une première étude effectuée sur des îlots de rat isolés a démontré que l'exposition des cellules β à de hautes concentrations en glucose induit l'apoptose d'une manière dépendante de la hausse en calcium intracellulaire (Efanova, I. B. *et al.* 1998). Une autre étude a aussi démontré que le glucose induit l'apoptose mais cette fois en utilisant des cultures primaires d'îlots humains (Federici, M. *et al.* 2001). Les auteurs de cette dernière étude rapporte que l'apoptose corrèle avec une augmentation de l'expression des membres apoptotiques de la famille Bcl-2, soit Bid, Bik et Bad. Il a aussi été suggéré que la glucotoxicité de la cellule β ferait intervenir une production accrue de IL-1 β suite à une exposition prolongée à de hautes concentrations en glucose (Maedler, K. *et al.* 2002).

La gerboise *Psammomys obesus*, aussi appelé rat du désert, est un modèle animal nutritionnel du diabète de type 2 qui, une fois soumis à une diète riche en calories, développe une résistance à l'insuline et un diabète associé à l'obésité. Or, il a été récemment démontré que le développement du diabète chez *Psammomys obesus* fait intervenir la glucotoxicité (Donath, M. Y. *et al.* 1999; Leibowitz, G. *et al.* 2001). Cette glucotoxicité chez *Psammomys obesus* implique une diminution de l'expression de PDX-1 et une perte de la masse de cellules β caractérisée à la fois par une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose de la cellule β (Leibowitz, G. *et al.* 2001).

3.4.2 – LA LIPOTOXICITÉ

Les acides gras et l'étiologie du diabète de type 2

D'une manière similaire, l'exposition prolongée des cellules β à de hautes concentrations d'acides gras est aussi reconnue pour être toxique. On parle alors de « lipotoxicité »

(Unger, R. H. 1995). On sait que l'obésité représente un facteur de risque pour le développement du diabète de type 2 et il est généralement admis que l'hyperlipidémie observée chez les individus obèses pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse du diabète de type 2 (Unger, R. H. 1995) puisque les hauts niveaux d'acides gras libres altèrent, d'une part, la sensibilité à l'insuline des tissus cibles de l'hormone (Bergman, R. N. and Ader, M. 2000; Kraegen, E. W. *et al.* 2001) et, d'autre part, la réponse au glucose de la cellule pancréatique β (Lee, Y. *et al.* 1994; McGarry, J. D. and Dobbins, R. L. 1999). On sait qu'au cours du développement de la maladie, la résistance à l'insuline accompagne l'obésité mais qu'une glycémie normale est maintenue grâce à un effet compensatoire de la cellule β . D'ailleurs, la masse de cellules β est augmentée chez les patients obèses, ce qui contribue à la compensation de la cellule β . Cette dernière sécrète aussi plus d'insuline, jusqu'au point où elle n'arrive plus à compenser pour la demande accrue et à ce stade débute le diabète de type 2 (Rahier, J. *et al.* 1983; Kraegen, E. W. *et al.* 2001). Les patients obèses présentent donc généralement une insulinémie élevée à jeûn et une faible sécrétion d'insuline post-prandiale (Unger, R. H. 1995; Boden, G. 1997).

Acides gras et la sécrétion d'insuline

L'action des acides gras sur la fonction de la cellule β et en particulier sur la sécrétion d'insuline n'est pas totalement élucidée. *In vivo*, l'élévation chronique des niveaux d'acides gras, suite à une infusion d'une émulsion de lipides (mélanges de lipides infusés contenant en grande partie l'acide gras polyinsaturé α -linoléique (C18 :2)), augmente la sécrétion d'insuline (Boden, G. *et al.* 1995; Unger, R. H. 1995). Il a été proposé que l'effet des acides gras sur la sécrétion d'insuline pourrait être dû en partie à l'action de facteurs extrapancréatiques tels qu'une inhibition du système nerveux sympathique (Magnan, C. *et al.* 1999). Une autre publication a démontré qu'une infusion de l'acide gras monoinsaturé oléate diminue la réponse insulénique au glucose (Mason, T. M. *et al.* 1999). Ces résultats en apparence contradictoires peuvent être expliqués par le fait que des acides gras de types différents ont été infusés dans ces études.

In vitro l'effet des acides gras sur la sécrétion d'insuline par la cellule β dépend de la durée de l'incubation. À court terme, les acides gras augmentent la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Crespin, S. R. *et al.* 1973; Segall, L. *et al.* 1999; Deeney, J. T. *et al.* 2000a) alors qu'à long terme, une exposition des cellules β à de hautes concentrations d'acides gras a pour effet d'augmenter le niveau basal d'insuline sécrétée, de diminuer les niveaux d'insuline emmagasinée et de diminuer d'une manière dose-dépendante la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Sako, Y. and Grill, V. E. 1990; Brun, T. *et al.* 1996; Larsson, O. *et al.* 1996; Brun, T. *et al.* 1997; Bollheimer, L. C. *et al.* 1998; Segall, L. *et al.* 1999; Xiao, J. *et al.* 2002).

Comment expliquer cette diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose causée par les acides gras? Des études antérieures ont rapporté que les acides gras diminuent l'oxydation du glucose (Zhou, Y. P. and Grill, V. E. 1994; Hosokawa, H. *et al.* 1997; Liang, Y. *et al.* 1997). Il est ainsi tentant d'expliquer l'effet inhibiteur des acides gras sur la sécrétion d'insuline par la diminution du métabolisme du glucose. Toutefois, on a pu montrer récemment que cette légère diminution de l'oxydation du glucose n'est pas impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline par les acides gras (Liang, Y. *et al.* 1997; Segall, L. *et al.* 1999). On a aussi tenté d'expliquer l'effet des acides gras sur la sécrétion d'insuline par la présence d'un cycle de Randle (Randle, P. J. 1998). Le cycle de Randle prédit qu'une inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) causée par une augmentation des niveaux d'acétyl-CoA, et une inhibition de la PFK causée par de hauts niveaux de citrate, contribuent à la diminution du métabolisme du glucose (Randle, P. J. 1998). En effet, une oxydation accrue des acides gras devrait augmenter la production mitochondriale d'acétyl-CoA et favoriser la synthèse du citrate par la citrate synthétase. Deux publications récentes démontrent cependant qu'un tel cycle ne peut expliquer l'effet complexe des acides gras sur la sécrétion d'insuline (Liang, Y. *et al.* 1997; Segall, L. *et al.* 1999). Plusieurs autres hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'effet inhibiteur des acides gras sur la sécrétion d'insuline : 1) Une première hypothèse suggère une implication des triglycérides puisqu'une étude démontre que l'accumulation de triglycérides dans la cellule pancréatique β corrèle avec le défaut sécrétoire (Zhou, Y. P. *et al.* 1996; Eto, K. *et al.* 2002). 2) L'effet inhibiteur des acides gras sur la sécrétion

d'insuline pourrait aussi être dû à une diminution de l'activité de la PKC causée par une exposition à long terme aux acides gras (désensibilisation) comme c'est le cas avec l'ester de phorbol PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) (Thams, P. *et al.* 1990). En effet, tout comme le PMA, les acides gras à longues chaînes peuvent activer la PKC dans la cellule β à court terme (Alcazar, O. *et al.* 1997), mais désensibiliser cette voie à long terme. 3) Certains auteurs envisagent que la fermeture des canaux KATP par le glucose pourrait être inhibée par les acyl-CoA à longue chaîne carbonée qui sont réputés pour les ouvrir (Larsson, O. *et al.* 1996). 4) Il a été de plus démontré que l'induction de la protéine découplante uncoupling protein 2 (UCP2) par les acides gras résulte en une inhibition de l'augmentation de la production d'ATP en réponse au glucose (Lameloise, N. *et al.* 2001). 5) Les acides gras pourraient aussi exercer leur effet en diminuant le contenu en insuline de la cellule β . En effet, une exposition aux acides gras diminue la conversion de la pro-insuline en insuline et, par conséquent, réduit la quantité d'insuline emmagasinée (Bjorklund, A. and Grill, V. 1999; Furukawa, H. *et al.* 1999). 6) Enfin, certains auteurs favorisent l'hypothèse d'une cytotoxicité des acides gras sur la cellule pancréatique β . Il faut souligner que ces différents effets ne sont pas mutuellement exclusifs en raison de l'action pléiotropique des acides gras sur la cellule β .

Enfin, il est clairement établi que les acides gras jouent un rôle essentiel dans le mécanisme de sécrétion d'insuline induite par le glucose (et divers autres stimuli), car une diminution majeure de la lipolyse au moyen d'approches pharmacologiques et moléculaires supprime l'action à court terme de plusieurs sécrétagogues (Stein, D. T. *et al.* 1996; Dobbins, R. L. *et al.* 1998a; Dobbins, R. L. *et al.* 1998b; Roduit, R. *et al.* 2001; Masiello, P. *et al.* 2002).

Acides gras et expression génique

Le mécanisme par lequel les acides gras modulent l'expression de certains gènes commence à susciter l'intérêt de nombreux groupes de recherche. En effet, on sait maintenant que les acides gras modulent directement l'expression génique. Ils n'agissent pas seulement de manière indirecte (via des changements métaboliques et hormonaux)

comme on le pensait auparavant. L'activation de divers facteurs de transcription, tels que les PPARs (Lemberger, T. *et al.* 1996) et HNF-4 (Hertz, R. *et al.* 1998), par les acides gras a été rapportée mais bien peu d'études portent sur la cellule β . Les PPARs forment des complexes dimériques avec le récepteur X à l'acide rétinoïque (RXR) pour se lier à leur élément de réponse, le PPRE (élément de réponse aux PPARs). La famille des PPARs comprend les isoformes α , β (aussi appelée δ) et γ qui ont chacune des fonctions distinctes et une distribution tissulaire différente (Schoonjans, K. *et al.* 1996). PPAR α et PPAR γ sont impliqués dans le métabolisme des lipides, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la carcinogénèse et l'apoptose (Desvergne, B. *et al.* 1998). Alors qu'on ne connaissait que peu de choses sur le rôle physiologique de PPAR β , une récente étude vient de démontrer qu'il active l'utilisation des graisses pour prévenir l'obésité (Wang, Y. X. *et al.* 2003). On croit que les PPARs agiraient comme des senseurs des niveaux physiologiques d'acides gras afin de réguler le métabolisme des lipides (Forman, B. M. *et al.* 1997). Il est alors attrayant d'émettre l'hypothèse selon laquelle une modulation de l'activité de liaison à l'ADN des PPARs par les acides gras pourrait modifier l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme, de la prolifération et de l'apoptose pouvant ainsi expliquer l'effet pléiotropique des acides gras sur la cellule pancréatique β (Yoshikawa, H. *et al.* 2001).

Il a été montré en présence de glucose élevé que le palmitate diminue l'expression du gène de l'insuline, du transporteur du glucose GLUT2 et de la glucokinase dans la cellule pancréatique β via une diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription PDX-1 (Bonny, C. *et al.* 1997; Gremlich, S. *et al.* 1997; Yoshikawa, H. *et al.* 2001). Toutefois, on ne sait toujours pas si cet effet du palmitate lui est propre ou s'il est partagé par les acides gras en général. Les acides gras induisent considérablement, dans la cellule β (INS), le gène de la CPT-1 qui catalyse l'étape limitante de l'oxydation des graisses (Assimacopoulos-Jeannet, F. *et al.* 1997; Xiao, J. *et al.* 2002). De plus, les acides gras diminuent l'expression de l'ACC, l'enzyme qui synthétise le malonyl-CoA, un métabolite clé régulant l'oxydation des graisses via son action inhibitrice sur la CPT-1 (Brun, T. *et al.* 1997). Ces actions combinées pourraient contribuer à la sécrétion élevée

d'insuline à bas glucose (Segall, L. *et al.* 1999) en accroissant l'oxydation des acides gras et ainsi la production d'ATP, un facteur de couplage pour la cellule pancréatique β .

Une étude par notre groupe de recherche a démontré que les acides gras palmitate et oléate induisent l'expression des gènes à réponse précoce *c-fos* et *nur-77* dans la cellule β via l'activation de la PKC et une concentration cytosolique de calcium élevée (Roche, E. *et al.* 1999). Nous avons suggéré que l'augmentation de l'expression de *c-fos* et *nur-77* en réponse aux acides gras pourrait participer à l'effet cytotoxique des acides gras puisque ces gènes sont reconnus pour participer à des événements apoptotiques via l'expression de gènes tardifs. De plus, au cours d'une récente étude nous avons démontré que le palmitate augmente l'expression du gène à réponse précoce *activator of transcription factor-3* (ATF-3), un gène qui induit l'apoptose de la cellule β et qui semble être impliqué dans le développement du diabète de type 1 et de type 2 (Hartman M, soumis pour publication).

Acides gras et biosynthèse d'insuline

Une exposition prolongée des cellules β aux acides gras augmente le niveau de proinsuline mais diminue les concentrations intracellulaires d'insuline de même que la conversion de la proinsuline en insuline (170) (Furukawa, H. *et al.* 1999). Il en résulte une élévation du rapport proinsuline/insuline intracellulaire. Les acides gras semblent en effet diminuer les niveaux des prohormones convertases PC2 et PC3, de même que celui d'une protéine activatrice de PC2, 7B2 (170) (Furukawa, H. *et al.* 1999), ce qui pourrait expliquer la diminution de la conversion de la proinsuline en insuline. Une autre étude a démontré que le palmitate combiné à de hautes concentrations en glucose diminue les niveaux de proinsuline et d'insuline, en plus d'augmenter de près de 5 fois le rapport proinsuline/insuline dans les îlots (Bjorklund, A. and Grill, V. 1999).

L'effet cytotoxique des acides gras

Une publication de notre groupe a démontré que les acides gras augmentent l'apoptose dans lignée pancréatique INS-1 (Maestre, I. *et al.* 2003) et une autre publication rapporte

que l'effet pro-apoptotique des acides gras pourrait s'expliquer en partie via l'activation de la PKC δ) (Carpenter, L. *et al.* 2002; Eitel, K. *et al.* 2003). On ne connaît toutefois pas les cibles en aval de la PKC δ pouvant participer à l'effet cytotoxique des acides gras. Il a été récemment démontré que les acides gras retrouvés dans la nutrition ont des effets différents sur la cellule β en fonction du degré d'insaturation et de la longueur de leur chaîne de carbones (El-Assaad, W. *et al.*; Maedler, K. *et al.* 2001; Maedler, K. *et al.* 2003). Ainsi, une première étude effectuée sur des îlots de rat isolés démontre que les acides gras saturés tel que le palmitate et le stéarate causent l'apoptose des cellules β via une augmentation de la synthèse des céramides alors que les acides gras insaturés tel que l'oléate augmenteraient plutôt la prolifération à de faibles concentrations de glucose (Maedler, K. *et al.* 2001). En plus de leur action proliférative, les acides gras insaturés protègent les cellules β de l'apoptose induit par la palmitate et le glucose via une augmentation de l'expression de Bcl-2 (Maedler, K. *et al.* 2003). Une autre étude effectuée sur des îlots humains a confirmé l'implication des céramides dans l'effet apoptotique des acides gras en plus de démontrer une réduction de l'expression de Bcl-2 (Lupi, R. *et al.* 2002). Enfin, une publication a démontré que la surexpression d'un mutant PKB constitutivement actif supprimait l'effet apoptotique des acides gras et que l'inhibition des protéines pro-apoptotiques GSK-3, forkhead homéobox protéine 1 (FoxO1) et p53 pourrait être impliquée dans le processus (Wrede, C. E. *et al.* 2002).

Le rat ZDF (*Zucker diabetic Fatty rat*) constitue un modèle utile pour l'étude de la pathogénèse du diabète de type 2 associé à l'obésité (appelé diabète adipogénique). Les rats ZDF deviennent obèses en raison d'une mutation homozygote dans le gène codant pour le récepteur à la leptine (Iida, M. *et al.* 1996; Phillips, M. S. *et al.* 1996). Alors que la leptine prévient normalement l'accumulation exagérée de gras, les rats ZDF démontrent des dépôts adipeux dans les îlots et les autres tissus non-adipocytaires. Ces dépôts sont associés à de hauts niveaux d'acides gras libres et de triglycérides intracellulaires dans la cellule pancréatique β qui pourraient jouer un rôle central pour induire un diabète progressif impliquant une décompensation de la cellule β que l'on appelle lipotoxicité (Lee, Y. *et al.* 1994; Unger, R. H. 1995). Au cours de la progression de la maladie, les rats ZDF traversent un stade pré-diabétique (à partir de la 7^e semaine) et diabétique (à partir

de la 14^e semaine) marqués par l'accumulation progressive de triglycérides dans les îlots (Lee, Y. *et al.* 1994; Shimabukuro, M. *et al.* 1998b). Ainsi, au stade diabétique, on croit que des dépôts adipeux et des contenus en triglycérides de plus de 500 ng/îlot (soit 50 fois le niveau normal) causent une dysfonction de la cellule β , une réduction du nombre de cellules β par apoptose et le diabète (voir figure 7) (Shimabukuro, M. *et al.* 1998b).

Chez le rat ZDF, l'apoptose de la cellule β est donc probablement induite par les niveaux élevés d'acides gras circulants et intracellulaires, par la formation de céramides et par une augmentation de la production de NO dans les cellules β (voir figure 7) (Shimabukuro, M. *et al.* 1997; Shimabukuro, M. *et al.* 1998a; Shimabukuro, M. *et al.* 1998b; Shimabukuro, M. *et al.* 1998c). Les niveaux de céramides sont en effet augmentés dans les îlots de rats ZDF prédiabétiques et diabétiques (Shimabukuro, M. *et al.* 1998a; Shimabukuro, M. *et al.* 1998c). Ils peuvent être générés soit à partir de la voie de la sphingomyéline, par la sphingomyélinase ou encore par la synthèse *de novo* via la sérine palmitoyltransférase (SPT) et la céramide synthétase. Les hauts niveaux de triglycérides contenus dans les îlots de rats ZDF constituent une source probable de palmitoyl-CoA nécessaire à la formation *de novo* des céramides (Shimabukuro, M. *et al.* 1998a; Shimabukuro, M. *et al.* 1998c). Les cibles de la voie des céramides connues à ce jour comprennent la *ceramide-activated protein phosphatase* (Wolff, R. A. *et al.* 1994) et la PKC ζ (Lozano, J. *et al.* 1994) une isoforme atypique de PKC. La voie des céramides peut induire la différenciation cellulaire (Alessenko, A. V. *et al.* 1999), la prolifération (Olivera, A. *et al.* 1999) ou encore l'arrêt de prolifération (Kondo, T. *et al.* 2000) selon la nature du stimulus et le type cellulaire. Par contre, l'activation de cette voie constitue généralement un signal apoptotique dans plusieurs types cellulaires (Mathias, S. *et al.* 1998).

Le rôle des triglycérides dans la lipotoxicité de la cellules β est plus difficile à discuter puisqu'une certaine contradiction demeure dans la littérature. D'un côté, certaines études *in vitro* ont démontré une association corrélative entre les niveaux de triglycérides et l'apoptose de la cellule β (Shimabukuro, M. *et al.* 1998b) ou la dysfonction de la cellule β en terme d'expression du gène de l'insuline (Briaud, I. *et al.* 2001). D'un autre côté une publication récente suggère que la mort cellulaire des cellules β (isolées de rats ZDF)

induite par les acides gras suit une relation inverse avec les niveaux de triglycérides (Cnop, M. *et al.* 2001). La formation de triglycérides servirait de voie de détoxification et constituerait un mécanisme de protection contre la hausse des niveaux intracellulaires d'acides gras (Listenberger, L. L. *et al.* 2003).

3.4.3 – LA GLUCOLIPOTOXICITÉ

Depuis quelques années, des évidences s'accumulent en faveur de l'hypothèse selon laquelle le glucose et les acides gras pourraient agir en synergie pour causer la dysfonction de la cellule β (glucolipotoxicité) (Prentki, M. and Corkey, B. E. 1996; Prentki, M. *et al.* 2002). Selon le mécanisme proposé par Prentki et Corkey, une haute concentration de glucose inhiberait l'oxydation des acides gras et, par le fait même, la détoxification des lipides. Une récente étude, publiée par un autre groupe de recherche et portant sur l'étude de l'apoptose induit par le glucose et les acides gras, a montré un tel effet synergistique des deux nutriments calorigéniques sur l'apoptose de la cellule β bien que cela ne soit pas interprété par les auteurs dans le texte (Piro, S. *et al.* 2002). Toutefois, leurs résultats montrent clairement qu'en deçà de 48 h, le glucose et les acides gras seuls n'ont que peu d'effets sur l'apoptose alors que leur action combinée augmente les niveaux d'apoptose de près de 3 fois à 24 h et de près de 10 fois à 48 h.

La figure 9 (voir ci-dessous) illustre le modèle moléculaire par lequel la glucolipotoxicité pourrait ultimement mener à l'apparition du diabète de type 2.

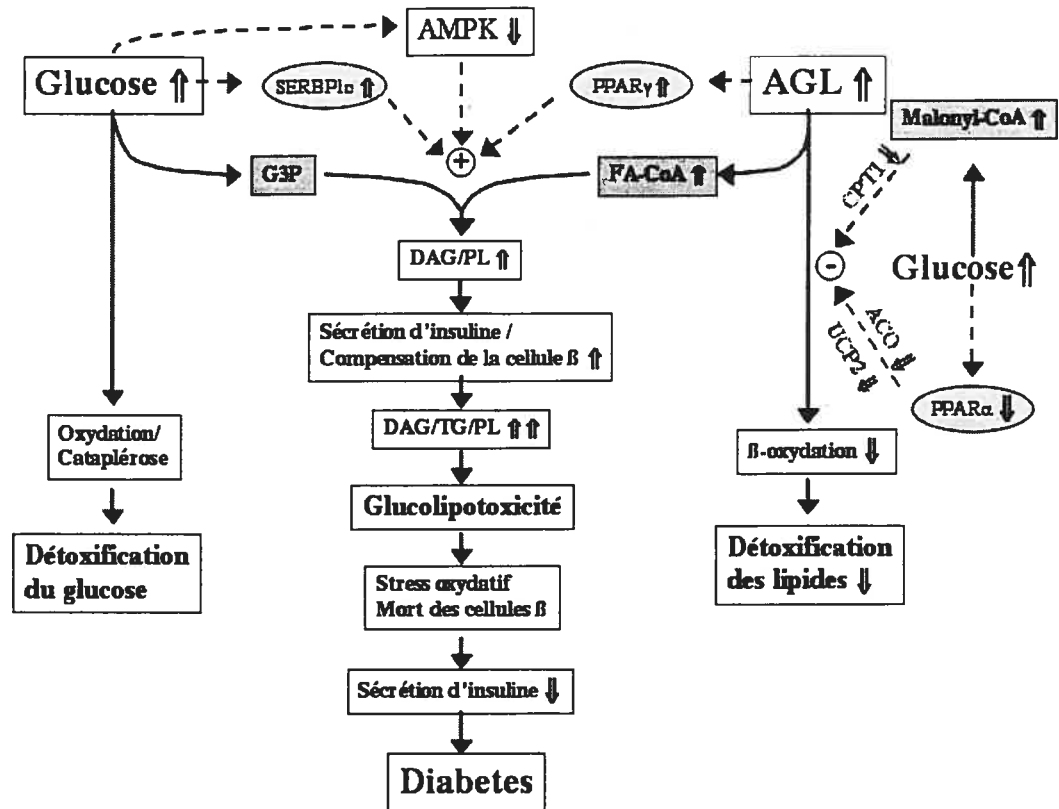


Figure 9 : Modèle moléculaire de la glucolipotoxicité. Selon l'hypothèse proposée, une concentration de glucose élevée diminue la détoxication des lipides en inhibant la β -oxydation des acides gras libres (AGL), d'une part, via la hausse en malonyl-CoA qui inhibe la carnitine-palmitoyl transférase-1 (CPT-1) et, d'autre part, via une diminution de l'expression de *peroxisome proliferator activated receptor* α (PPAR α de l'acyl-CoA oxydase (ACO), et de *uncoupling protein 2* (UCP2). Le glucose diminue aussi l'activité de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) et augmente celle du facteur de transcription *sterol responsive element binding protein-1c* (SREBP1c). Il s'ensuit une augmentation des niveaux d'acyls-CoA (FA-CoA), de diacylglycérol (DAG), de triglycérides (TG) et de phospholipides (PL) et une décompensation de la cellule β caractérisée par une diminution de la sécrétion d'insuline et une augmentation de la mort cellulaire. Le mécanisme d'action des acides gras n'est pas complètement élucidé mais pourrait faire intervenir la production de céramides et l'activation de voies apoptotiques. La glucolipotoxicité pourrait ultimement mener à l'apparition du diabète de type 2.

3.5 – LES LIGNÉES CELLULAIRES PANCRÉATIQUES β

Les difficultés techniques liées à l'obtention et au maintien en culture de cellules β primaires justifient le développement de lignées cellulaires sécrétrices d'insuline. En effet, la disponibilité des cellules β primaires est limitée puisque leur isolation requiert la digestion sélective du tissu exocrine et la purification du tissu endocrine (Gotoh, M. *et al.* 1987) par un procédé difficile et dispendieux. De plus, l'isolation d'îlots à partir de rats ne fournit que quelques centaines d'îlots par animal sacrifié (Lacy, P. E. and Kostianovsky, M. 1967; Gotoh, M. *et al.* 1987). Puisque les îlots sont constitués d'au moins 4 types cellulaires distincts, la purification des cellules β nécessite le *fluorescence-activated cell-sorting* (Van De Winkel, M. and Pipeleers, D. 1983). Finalement, il est difficile de maintenir les cellules β isolées en culture (Kaiser, N. *et al.* 1991). On comprend donc que l'usage de lignées cellulaires pancréatiques β soit répandu. La liste suivante décrit les lignées cellulaires les plus couramment utilisées :

- Les cellules RIN ont été établies en 1973 (Chick, W. L. *et al.* 1977). Suite à leur irradiation aux rayons X, des rats ont développé des insulinomes desquels furent purifiés une lignée cellulaire sécrétrice d'insuline (Gazdar, A. F. *et al.* 1980).

- Les cellules INS-1 ont été dérivées de cellules RIN cultivées en présence de 2-mercaptoéthanol (Asfari, M. *et al.* 1992). Récemment, un clone de cellules INS (832/13) a été isolé en vertu de sa réponse accrue au glucose en terme de sécrétion d'insuline (Hohmeier, H. E. *et al.* 2000).

- Les cellules HIT-T15 ont été établies à partir d'îlots de hamster dont les cellules β ont été immortalisées et transformées par SV-40 (Santerre, R. F. *et al.* 1981).

- D'une manière similaire, la microinjection d'un transgène constitué de la partie codante de l'oncogène SV40 sous le promoteur du gène de l'insuline de rat II (Hanahan, D. 1985) dans des embryons de souris a mené à l'isolation des lignées cellulaires β TC (Efrat, S. *et al.* 1988) et MIN6 (Miyazaki, J. *et al.* 1990).

Ces différentes lignées cellulaires ont perdu quelques caractéristiques fonctionnelles à divers degrés suite à leur dédifférenciation même si elles représentent tout de même des modèles utiles pour l'étude des fonctions de la cellule β au niveau moléculaire. Ainsi, les cellules RIN (Clark, S. A. *et al.* 1990) et β TC6 (Poitout, V. *et al.* 1995) ne sécrètent pas d'insuline en réponse au glucose. Quant aux HIT, elles ont un EC50 de 1.5 mM (Zhang, H. J. *et al.* 1989) ce qui signifie un déplacement vers la gauche important de la courbe de dose-réponse au glucose. Seules les INS-1 (Asfari, M. *et al.* 1992) et les MIN6 (Miyazaki, J. *et al.* 1990) ont maintenu une réponse physiologique au glucose en terme de sécrétion d'insuline (dans la région 5-15 mM de glucose). De ces deux dernières, seule la lignée cellulaire INS-1 a démontré une sécrétion d'insuline appropriée en réponse aux autres sécrétagogues pour la cellule β (éphédrine, somatostatine, KCl, arginine/leucine, IBMX et forskoline) (Asfari, M. *et al.* 1992). La lignée cellulaire INS-1, en particulier le clone INS832/13, semble donc représenter un bon modèle cellulaire, d'autant plus que son ratio glucokinase/hexokinase (un marqueur de la différenciation des cellules β) est élevé, ce qui est préférable (Marie, S. *et al.* 1993).

4 - LES AGENTS THÉRAPEUTIQUES POUR LE TRAITEMENT DU DIABÈTE DE TYPE 2

Bien que la diète et l'exercice soient deux avenues thérapeutiques omniprésentes dans le traitement du diabète de type 2 (Henry, R. R. *et al.* 1986; DeFronzo, R. A. 1999), on doit avoir recours à des agents pharmacologiques pour contrôler la glycémie. Actuellement, les divers agents thérapeutiques disponibles pour le traitement du diabète de type 2 appartiennent presque exclusivement à 6 classes pharmacologiques (Fuchtenbusch, M. *et al.* 2000; Matthaei, S. *et al.* 2000; Harrigan, R. A. *et al.* 2001). D'un côté, on retrouve 1) les sulfonylurées, 2) les glinides et 3) les dérivés de l'acide benzoïque qui sont des agents hypoglycémiants et de l'autre, 4) les biguanides, 5) les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase et 6) les thiazolidinediones qui sont des agents anti-hyperglycémiants.

4.1 - LES AGENTS HYPOGLYCÉMIANTS

Les sulfonylurées comptent parmi les agents pharmacologiques les plus prescrits pour le traitement du diabète de type 2. Ils agissent essentiellement sur la cellule β pour augmenter la sécrétion d'insuline via leur action sur les canaux KATP (Goldfine, I. D. *et al.* 1984; Campbell, R. K. 1998). Le principal risque quant à l'emploi de sulfonylurées est l'hypoglycémie, conséquence d'une surdose ou de l'interaction avec d'autres agents pharmacologiques. Les sulfonylurées exposent aussi le patient à des complications rénales et hépatiques. Malheureusement, il faut aussi mentionner que les patients se désensibilisent graduellement aux sulfonylurées diminuant ainsi l'efficacité du traitement au cours d'une thérapie à long-terme.

Les glinides (Nateglinide et Repaglinide) sont de nouveaux agents pharmacologiques qui agissent au niveau de la cellule β pour induire la sécrétion d'insuline via la fermeture des canaux KATP (Fuchtenbusch, M. *et al.* 2000). Les glinides partagent donc la même cible thérapeutique que les sulfonylurées bien qu'ils présentent une structure moléculaire différente. Les études cliniques sont prometteuses et démontrent que leur action est comparable à celle des sulfonylurées (Fuchtenbusch, M. *et al.* 2000). Puisque les glinides sont des agents hypoglycémiant, le risque potentiel d'hypoglycémie demeure la principale source d'inquiétude face à leur utilisation.

Les dérivés de l'acide benzoïque sont, quant à eux, moins étudiés. On sait toutefois qu'ils agissent au niveau de la cellule β en diminuant la sécrétion d'insuline mais leur action hypoglycémiant proviendrait d'une augmentation de l'activité de cette dernière au niveau des tissus périphériques (Guay, D. R. 1998). Tout comme pour les sulfonylurées et les glinides, le principal risque encouru lors d'une thérapie aux dérivés de l'acide benzoïque est l'hypoglycémie suite à d'une surdose.

4.2 - LES AGENTS ANTI-HYPERGLYCÉMIANTS

Parmi tous les biguanides testés, seule la metformine est encore utilisée dans le traitement du diabète de type 2. La metformine (un activateur de l'AMPK) est généralement utilisée en combinaison avec les sulfonylurées pour rétablir la glycémie via une réduction de la production hépatique de glucose, une diminution de l'absorption du glucose au niveau de l'intestin et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Bailey, C. J. and Turner, R. C. 1996). Les effets secondaires relatifs à l'usage des biguanides incluent l'acidose lactique et l'insuffisance rénale, les biguanides étant métabolisés en quasi-totalité par les reins plutôt que par le foie.

Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase, quant à eux, agissent en tant que compétiteur réversible de l'alpha-hydrolase au niveau de la bordure en brosse de l'intestin. Ceci a pour effet de diminuer l'absorption des hydrates de carbones puisque les polysaccharides sont hydrolysés moins rapidement en monosaccharides (Yee, H. S. and Fong, N. T. 1996). Bien entendu, les effets secondaires de ce type de thérapie se situent au niveau du tractus gastro-intestinal et ne sont généralement pas sévères.

Enfin, les thiazolidinediones constituent une nouvelle classe d'agents pharmacologiques accessibles pour le traitement du diabète de type 2 (Henry, R. R. 1997). Leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé mais on sait qu'ils agissent sur les PPARs pour modifier la partition des lipides. Parmi les effets bénéfiques des thiazolidinediones, on retrouve une augmentation de la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux, des muscles squelettiques et du foie. Toutefois, ces composés peuvent entraîner des dysfonctions hépatiques et sont susceptibles d'augmenter l'apparition de certains types de cancer dont le cancer du colon (Lefebvre, A. M. *et al.* 1998; Saez, E. *et al.* 1998).

4.3 - AUTRES AGENTS THÉRAPEUTIQUES POTENTIELS

À ce jour, aucune thérapie ne parvient à contrôler parfaitement le diabète de type 2. De nombreux groupes de recherche tentent donc de développer de nouveaux agents thérapeutiques. Au cours des dernières années, certaines hormones peptidiques ont

suscité beaucoup d'intérêt. Ces hormones peptidiques, aux spectres d'actions thérapeutiques variés, pourraient être utilisées en combinaison avec les agents thérapeutiques classiques. L'avantage relié à l'utilisation de ces hormones provient du fait qu'elles sont naturellement présentes chez l'humain et qu'elles n'ont que peu ou pas d'effets secondaires. Pour n'en nommer que quelques-unes, citons l'*islet neogenesis-activating protein* (INGAP) (Rafaeloff, R. *et al.* 1997; Rosenberg, L. 1998), un activateur de la néogénèse des cellules β , et le GLP-1 (Gutniak, M. *et al.* 1992; Holst, J. J. 2000; Holst, J. J. 2002), un agent prometteur dans le traitement du diabète de par sa variété d'actions thérapeutiques.

5 - LE GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1

5.1 - UNE HORMONE POLYPEPTIDIQUE

Le GLP-1 est une hormone polypeptidique sécrétée par les cellules endocrines L de l'intestin en réponse à un repas riche en graisses ou en hydrates de carbone (Drucker, D. J. 1998; Drucker, D. J. 2001b). Le GLP-1 est un produit de clivage dérivé du proglucagon suite à l'action des prohormones convertases (PC) exprimées dans les cellules L (qui expriment fortement PC1) alors qu'au niveau des cellules α du pancréas (qui expriment fortement PC2), le produit majeur de la modification post-translacionnelle du proglucagon est le glucagon (figure 10). Au cours des dernières années, le GLP-1 s'est vu accordé beaucoup d'intérêt en tant qu'agent thérapeutique potentiel pour le traitement du diabète de type 1 et de type 2.

En circulation, on retrouve principalement le GLP-1 sous 2 formes : le GLP-1 (7-36) amide et le GLP-1 (7-37), provenant tous deux de la maturation du GLP-1 de pleine longueur (Drucker, D. J. 1998; Drucker, D. J. 2001b). La forme tronquée circulante GLP-1 (7-36) amide est plus abondante que la forme GLP-1 (7-37). Les premières études dans les années 1980 ont démontré que le GLP-1 de pleine longueur est dépourvu d'activité biologique. Cependant, les peptides plus courts (auxquels on a enlevé les 6 premiers acides aminés) ont nettement plus d'activité *in vitro* (Holst, J. J.

2000) et *in vivo* (Kreymann, B. *et al.* 1987). Sachant que l'obésité est un facteur de risque pour le développement du diabète de type 2, il est intéressant de remarquer que les individus obèses présentent des niveaux sanguins de GLP-1 diminués en comparaison aux sujets sains (Ranganath, L. R. *et al.* 1996). Toutefois, on ne sait pas si ces faibles niveaux de GLP-1 circulant chez les individus obèses représentent une cause ou une conséquence de la pathologie. Une autre étude intéressante a démontré que des animaux rendus diabétiques suite à un traitement à la streptozotocine ont des niveaux accrus de PC1 et PC2 dans les cellules α du pancréas. Cette hausse des niveaux de PC1 et PC2 est accompagnée d'une production de GLP-1 (Nie, Y. *et al.* 2000). Il a donc été suggéré que l'hyperglycémie augmenterait l'expression des prohormones convertases dans la cellule α , ce qui mènerait à une production accrue de GLP-1 qui pourrait ensuite agir sur la cellule β et participer au phénomène de compensation de la cellule β via son action pléiotropique (sécrétion d'insuline, expression du gène de l'insuline, prolifération cellulaire, etc.) (Nie, Y. *et al.* 2000).

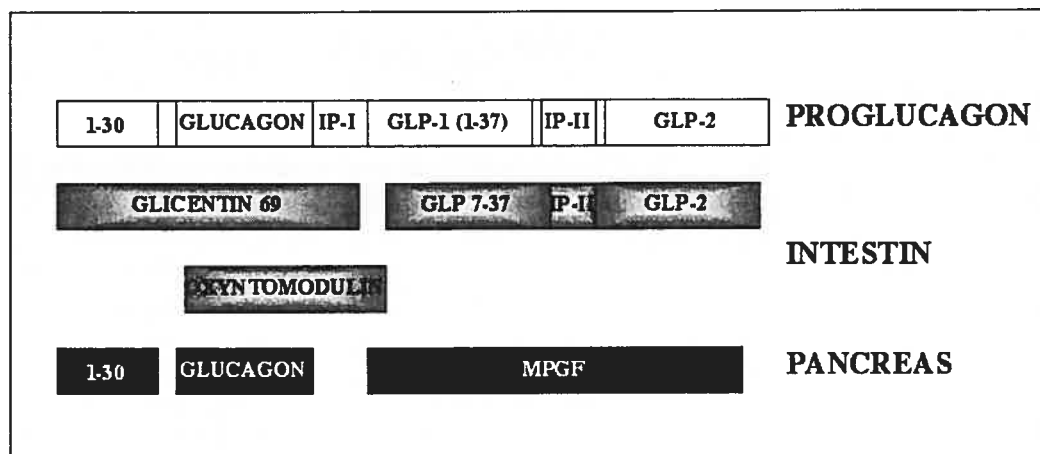


Figure 10: Représentation schématique du proglucagon et des peptides dérivés dans l'intestin et le pancréas. GLP, *glucagon-like peptide*; IP, *intervening peptide*; MPGF, *major proglucagon fragment* (Adapté de Drucker D., *Diabetes* 1998 47: 159-169).

5.2 - UN AGENT THÉRAPEUTIQUE PROMETTEUR DANS LE TRAITEMENT DU DIABÈTE DE TYPE 2

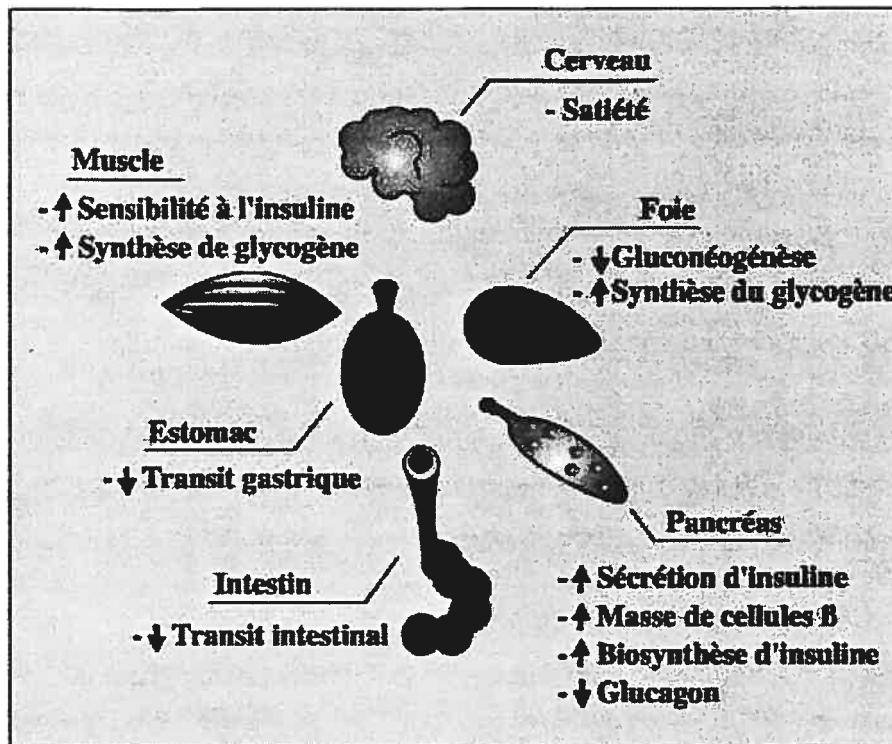


Figure 11 : Représentation schématique des actions physiologiques du glucagon-like peptide-1. Voir texte pour discussion.

Des études cliniques ont démontré l'efficacité du GLP-1 comme agent thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2. On accorde au GLP-1 une grande variété d'effets biologiques, lesquels contribueraient à réduire les excursions hyperglycémiques chez le patient diabétique (figure 11). Bien qu'énumérés brièvement ici, les principaux effets biologiques du GLP-1 seront discutés de manière plus détaillée dans les prochaines sections. 1) En premier lieu, le GLP-1 augmente la

sécrétion d'insuline en réponse au glucose par les cellules β . 2) Bien que la littérature soit contradictoire à cet effet, on pense que le GLP-1 pourrait mimer l'action de l'insuline et augmenter la sensibilité à cette dernière. 3) De plus, le GLP-1 agit comme un signal de satiété en diminuant l'appétit et en ralentissant le transit gastro-intestinal. 4) Il agit aussi comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β en augmentant sa réplication. 5) Le GLP-1 augmente aussi la masse de cellules β en augmentant sa néogénèse en stimulant la différenciation de cellules précurseurs. 6) Enfin, tout récemment, il a été démontré que le GLP-1 protégeait les cellules β de l'apoptose induite par des cytokines reconnues pour participer au développement du diabète de type 1.

5.3 - LE RÉCEPTEUR AU GLP-1

Le récepteur du GLP-1 (GLP-1R) a été cloné dans le laboratoire du Dr Thorens à partir d'une banque d'ADNc d'îlots pancréatiques de rat (Thorens, B. 1992) et jusqu'à présent, un seul GLP-1R a été identifié. Le gène du GLP-1R se situe en 6p21 et code pour un récepteur à 7 domaines transmembranaires qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Sa séquence indique qu'il appartient à la classe II des RCPGs, classe qui inclut les récepteurs au glucagon, au GIP, au *pituitary adenylate cyclase-activated protein* (PACAP), au VIP, à la calcitonine et plusieurs autres. À fortes doses, le glucagon peut se lier au GLP-1R en plus de se lier à son propre récepteur. Par contre, le GLP-1 ne peut se lier au récepteur au glucagon (Moens, K. *et al.* 1998).

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont tenté de définir les voies de signalisation induites par le GLP-1. Tout comme les GPCRs de classe II, le GLP-1R est couplé à la protéine Gs et active l'adénylate cyclase pour augmenter les niveaux d'AMPc et l'activité de la protéine kinase A (Widmann, C. *et al.* 1994; Flamez, D. *et al.* 1999). L'activation de la voie AMPc/PKA par le GLP-1 mène à l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} (Flamez, D. *et al.* 1999; Holz, G. G. *et al.* 1999).

Outre le pancréas, le GLP-1R est aussi exprimé dans le cerveau, les poumons, les reins, le tractus gastro-intestinal et le coeur (Campos, R. V. *et al.* 1994; Bullock, B. P. *et al.* 1996). Toutefois, son expression varie selon l'espèce. Par exemple, le chien exprime aussi le GLP-1R dans le muscle et le tissu adipeux alors qu'on croit qu'il est absent de ces tissus chez l'humain. L'expression du GLP-1R est diminuée par le glucose et la dexaméthasone (Abrahamsen, N. and Nishimura, E. 1995). Contrairement à d'autres RCPGs de classe II, l'expression du GLP-1R n'est pas augmentée par une hausse des niveaux d'AMPc (Abrahamsen, N. and Nishimura, E. 1995). On sait peu de choses sur la transcription du gène du récepteur au GLP-1. Son promoteur comporte des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (Wildhage, I. *et al.* 1999).

5.4 - UNE HORMONE GLUCO-INCRÉTINE

Le GLP-1 augmente la compétence de la cellule β en ce qui a trait à la sécrétion d'insuline (Fehmann, H. C. *et al.* 1995), la fermeture des canaux KATP (Holz, G. G. t. *et al.* 1993) et l'induction de gènes à réponse précoce (Susini, S. *et al.* 1998). C'est un agent thérapeutique prometteur dans le traitement du diabète de type 2 puisqu'il augmente la sécrétion d'insuline chez les patients atteints d'intolérance au glucose et de diabète de type 2 (Gutniak, M. *et al.* 1992). L'avantage de l'utilisation du GLP-1 en tant qu'agent thérapeutique dans un traitement du diabète de type 2 provient du fait que son action sur la sécrétion d'insuline, contrairement aux agents thérapeutiques actuellement utilisés, est glucose-dépendante (Holz, G. G. t. *et al.* 1993). Par conséquent, le GLP-1 agit sur la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est élevée et devient inefficace à des concentrations physiologiques normales de glucose, ce qui prévient l'hypoglycémie. Des études ont démontré que le GLP-1 augmente la sécrétion d'insuline via l'activation de la voie de transduction de signaux AMPc/PKA (Widmann, C. *et al.* 1994) et la mobilisation de stocks intracellulaires de Ca^{2+} (Holz, G. G. *et al.* 1999). Une autre étude a suggéré que le GLP-1 augmente la sécrétion d'insuline via une augmentation de la lipolyse (Yaney, G. C. *et al.* 2001).

Finalement, le GLP-1 a aussi une action périphérique puisqu'il compense la résistance à l'insuline en augmentant l'utilisation du glucose stimulée par l'insuline chez le chien pancréatectomisé (Sandhu, H. *et al.* 1999).

5.5 - UN ACTIVATEUR DE LA BIOSYNTHÈSE D'INSULINE

Le GLP-1 est aussi un agent insulinothrique. C'est-à-dire qu'il augmente la biosynthèse d'insuline en augmentant l'expression du gène de l'insuline et en stabilisant son ARNm (Fehmann, H. C. and Habener, J. F. 1992). L'action du GLP-1 sur l'expression du gène de l'insuline semble dépendante de plusieurs voies de signalisation distinctes, chacune ciblant divers facteurs de transcription pouvant se lier au promoteur du gène de l'insuline. En effet, l'effet du GLP-1 implique en partie l'activation de CREB qui se lie à l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) (Skoglund, G. *et al.* 2000). Toutefois, contrairement au dogme généralement admis, l'activation de CREB en réponse à la hausse des niveaux d'AMPc provoquée par le glucose dans la cellule β n'impliquerait pas la PKA mais plutôt Epac (Kang, G. *et al.* 2001). Des études ont aussi démontré une participation du facteur de transcription PDX-1 dans l'action insulinothrique du GLP-1 (Hussain, M. A. and Habener, J. F. 2000; Stoffers, D. A. *et al.* 2000) (Buteau, J. *et al.* 1999). Suite à sa phosphorylation par la voie de la PI-3K, PDX-1 est transloqué au noyau où il se lie à un élément de réponse dans le promoteur des gènes de l'insuline 1 et 2 chez le rat (Buteau, J. *et al.* 1999). Il est aussi intéressant de noter que certaines études ont démontré que le GLP-1 augmente les niveaux d'ARNm de PDX-1 (Stoffers, D. A. *et al.* 2000) (Buteau, J. *et al.* 1999). Enfin, une autre étude suggère que le GLP-1 augmenterait l'expression du gène de l'insuline via l'activation de *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Lawrence, M. C. *et al.* 2002). Trois éléments de réponse à NFAT ont été identifiés dans le promoteur du gène de l'insuline 1 chez le rat. L'activation de NFAT par le GLP-1 impliquerait la voie AMPc/PKA, une hausse des niveaux intracellulaires de calcium et l'activation subséquente de la protéine phosphatase-2B (calcineurine) (Lawrence, M. C. *et al.* 2002). Toutefois, ces résultats sont contradictoires avec

d'autres publications qui ont exclu un rôle de la protéine phosphatase-2B ou de la PKA dans l'expression du gène de l'insuline (Kemp, D. M. and Habener, J. F. 2001).

5.6 - LE GLP-1 ET LA MASSE DES CELLULES β

Depuis quelques années, de nombreuses études ont étudié l'effet du GLP-1 sur la masse de cellules β (Buteau, J. *et al.* 1999; Xu, G. *et al.* 1999; Stoffers, D. A. *et al.* 2000; Buteau, J. *et al.* 2001; Buteau, J. *et al.* 2003). L'effet du GLP-1 sur l'augmentation de la masse de cellules β est donc maintenant bien documenté et il est généralement admis qu'elle fait intervenir à la fois des actions mitogénique, néogénique et anti-apoptotique du GLP-1 sur la cellule β .

Tout d'abord, le GLP-1 et ses analogues agissent comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β *in vitro* (Buteau, J. *et al.* 1999; Buteau, J. *et al.* 2001; Buteau, J. *et al.* 2003) de même qu'*in vivo* (Stoffers, D. A. *et al.* 2000). Nos travaux ont démontré que le GLP-1 augmente la réplication de la cellule β via l'activation de la voie PI-3K/PKC ζ (Buteau, J. *et al.* 1999; Buteau, J. *et al.* 2001). L'activation de la voie PI-3K par le GLP-1 requiert la transactivation du récepteur à l'épidermal growth factor (EGF) via l'activation de c-Src et le clivage de la betacelluline (BTC) (Buteau, J. *et al.* 2003).

Ensuite, l'effet du GLP-1 sur la néogénèse de la cellule β commence à être documenté. Il a été rapporté que l'incubation de cellules pancréatiques exocrines AR42J avec du GLP-1 induit la différenciation de ces dernières vers un phénotype endocrine (Zhou, J. *et al.* 1999). L'apparition de ce phénotype est associé à l'expression du transporteur du glucose GLUT-2, de la glucokinase et du gène de l'insuline, de même qu'à l'apparition de propriétés sécrétoires en réponse au glucose. De plus, l'administration de GLP-1 pendant 10 jours à des rats diabétiques néonataux après une pancréatectomie partielle a stimulé la prolifération des cellules β existantes et la néogénèse de nouveaux îlots (Xu, G. *et al.* 1999). D'une manière similaire, le GLP-1 augmente l'expression de PDX-1 dans les cellules du canal pancréatique,

corrige la glycémie, augmente la masse de cellules β et la néogénèse dans les souris db/db (Stoffers, D. A. *et al.* 2000). Une étude récente rapporte aussi que le GLP-1 induit la différenciation de cellules épithéliales de l'intestin en cellules sécrétrices d'insuline *in vivo* et *in vitro*, en partie via l'activation du gène *ngn3* qui est impliqué dans le développement du pancréas endocrine (Suzuki, A. *et al.* 2003).

Enfin, de récentes études ont investigué l'action anti-apoptotique du GLP-1 sur la cellule β . Une première étude a démontré que le GLP-1 prévient l'apoptose induite par des cytokines *in vivo* et *in vitro* (Farilla, L. *et al.* 2002; Li, Y. *et al.* 2003). Une seconde étude suggère que l'action anti-apoptotique du GLP-1 sur l'effet cytotoxique du peroxyde d'hydrogène impliquait l'activation de la PI-3K (Hui, H. *et al.* 2003).

Ces résultats, en somme, démontrent que le GLP-1 augmente la masse de cellules β par une variété d'actions biologiques distinctes faisant intervenir la réplication des cellules β existantes, la néogénèse et la survie cellulaire. La possibilité d'augmenter la masse de cellules β chez le patient diabétique a d'énormes implications puisque le diabète de type 1 et 2 impliquent tous deux une insuffisance au niveau de la masse de cellules β . De plus, l'efficacité relative des protocoles de greffes d'îlots dans le traitement du diabète a mis en lumière la nécessité de découvrir de nouveaux agents permettant la survie et l'augmentation de la masse des cellules β tant *in vitro* qu'*in vivo* chez le patient transplanté. Puisqu'il y a un manque évident de donneurs pour la greffe d'îlots, il devient important d'identifier des agents participant à la néogénèse et la prolifération de la cellule β . On peut en effet penser que la génération de tissus *in vitro* pourrait pallier à la rareté du matériel biologique. En ce sens, le GLP-1 pourrait être d'une grande utilité.

5.7 - STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES CONCERNANT LE GLP-1

Le GLP-1 possède une alanine en position 2 qui le rend sensible à une dégradation rapide par la dipeptidyl peptidase IV (DPIV, aussi connu sous le nom de CD26), une aminopeptidase associée à la membrane que l'on retrouve dans plusieurs tissus

(Mentlein, R. *et al.* 1993). Les études ont démontré que l'inactivation du GLP-1 par la DPIV limite de manière importante l'activité biologique du GLP-1 chez les rongeurs (Kieffer, T. J. *et al.* 1995). et les humains (Deacon, C. F. *et al.* 1995). L'inactivation rapide du GLP-1 par la DPIV représente un obstacle majeur à l'utilisation du GLP-1 comme agent thérapeutique. D'ailleurs, *in vivo*, la demi-vie du peptide n'est que de quelques minutes et le défi des stratégies thérapeutiques utilisant le GLP-1 consiste donc 1) à développer des analogues au GLP-1 qui peuvent agir sur de plus longues durées; et 2) (de manière moins souhaitable) à diminuer la dégradation du GLP-1 en inactivant la DPIV. Toutefois, cette deuxième approche semble à première vue problématique parce qu'elle pose un problème de spécificité, la DPIV dégradant une variété de peptides circulants. Toutefois, de nombreuses études ont rapporté une amélioration de l'état de patients diabétiques suite à un traitement aux inhibiteurs de la DPIV, telle que l'isoleucine thiazolidide (Ahren, B. *et al.* 2002).

L'exendine 4 du lézard est un analogue naturel du GLP-1 qui résiste à la dégradation par la DPIV puisqu'elle comporte une glycine en position 2. Ceci augmente sa stabilité et, par le fait même, son attrait en tant qu'agent thérapeutique (Drucker, D. J. 2001a). Récemment, des études ont démontré que l'exendine 4 reproduisait les effets biologiques du GLP-1 sur la sécrétion d'insuline (Wang, Z. *et al.* 1995), la suppression de l'appétit, le transit gastro-intestinal, la biosynthèse du gène de l'insuline (Skoglund, G. *et al.* 2000; Stoffers, D. A. *et al.* 2000; Chepurny, O. G. *et al.* 2002), la prolifération (Xu, G. *et al.* 1999) et la néogénèse des cellules β (Xu, G. *et al.* 1999; Zhou, J. *et al.* 1999; Movassat, J. *et al.* 2002; Zhou, J. *et al.* 2002). De surcroît l'exendine 4 présente une action hypoglycémiant améliorée par rapport au GLP-1 grâce à sa longue demi-vie (Tourrel, C. *et al.* 2002).

La liste des peptides synthétiques analogues au GLP-1 présentement testés en phase clinique comprend le NN2211 (Larsen, P. J. *et al.* 2001; Agerso, H. *et al.* 2002; Elbrond, B. *et al.* 2002; Juhl, C. B. *et al.* 2002; Ribbel, U. *et al.* 2002; Rolin, B. *et al.* 2002), le LY315902 (Naslund, E. *et al.* 2002) et le CJC-1131 (Kim, J. G. *et al.* 2003).

Leur demi-vie varie respectivement de 26 min, à 8 heures et à 18 heures. Des études cliniques démontrent leur potentiel en tant qu'agent thérapeutique dans le traitement du diabète de type 2 et on ne leur connaît pas d'effets secondaires importants pour le moment outre des nausées ainsi qu'une réduction du transit gastro-intestinal.

6 – LES SYSTÈMES DE TRANSDUCTION DE SIGNAUX DU GLP-1

La signalisation cellulaire implique un réseau vaste et complexe de protéines faisant intervenir des récepteurs, des protéines adaptatrices, des kinases et des facteurs de transcription. Comme ce domaine est très étendu, nous nous limiterons à la description des systèmes étudiés au cours de cette thèse de doctorat.

6.1 - LES RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

Avec plus de 1000 membres, cette famille de récepteurs représente plus de 1% des protéines encodées dans le génome humain. Les RCPGs sont composés d'une partie N-terminale extracellulaire, d'un domaine contenant 7 passages transmembranaires et d'une partie C-terminale cytoplasmique.

Les protéines G trimériques

Les protéines G trimériques sont constituées de trois sous-unités : $\alpha\beta$ et γ (Rodbell, M. 1996; Rodbell, M. 1997). On compte à ce jour 17 sous-unités α différentes, 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ (Dhanasekaran, N. *et al.* 1998). La sous-unité α lie le GTP ou le GDP et possède une activité GTPase. La liaison d'un ligand à son RCPG provoque un changement conformationnel qui permet 1) l'échange du GDP lié à la sous-unité α pour un GTP, 2) l'action de l'activité GTPase, et 3) la dissociation de la sous-unité α du complexe $\beta\gamma$. Les protéines G ont diverses fonctions et peuvent activer différentes voies de transduction de signaux. Par exemple, la protéine G_s active l'adénylate cyclase, ce qui a pour effet d'augmenter les niveaux d'AMPc et l'activité de la PKA; la protéine G_i inhibe l'activité adénylate cyclase; la protéine G_q

active la phospholipase C, ce qui génère de l'inositol-3 phosphate et du DAG pour mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire et activer les PKCs; la protéine Gt (situé dans la rétine) active une GMP phosphodiesterase; et de surcroît, les différentes protéines G peuvent activer divers canaux ioniques. Les sous-unités $\beta\gamma$ peuvent aussi agir sur différentes voies signalétiques, entre autres, la voie de la PI-3K.

Les arrestines

Jusqu'à présent, 4 membres de la famille des arrestines ont été découverts (Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. 1996). Alors que deux de ces membres sont exclusifs à la rétine, les β -arrestine 1 et β arrestine-2 sont exprimées de manière ubiquitaire (Ferguson, S. S. *et al.* 1996). Les arrestines lient les RCPGs une fois ces derniers activés par leur ligands et phosphorylés par les *G protein-coupled receptors kinases* (GRKs) (Ferguson, S. S. *et al.* 1996; Bunemann, M. and Hosey, M. M. 1999). Les arrestines découplent alors les RCPGs de leur protéines G respectives pour les désensibiliser (Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. 2001; Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. 2002). Les β -arrestines servent d'adaptateurs pour cibler les RCPGs aux vésicules enrobées de clathrines (Ferguson, S. S. *et al.* 1998), des vésicules d'endocytose, pour les séquestrer (figure 12). On a longtemps cru que ceci signifiait la terminaison de la signalisation induite par les RCPGs. Toutefois, des études récentes démontrent que les arrestines recrutent des partenaires impliqués dans différentes voies signalétiques une fois les RCPGs internalisés (figure 12). La liste des protéines ainsi recrutées incluent : la famille des tyrosines-kinases Src, certains membres de la famille *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et des activateurs de la voie *c-Jun N-terminal domain kinase* (JNK) (Luttrell, L. M. *et al.* 1999; McDonald, P. H. and Lefkowitz, R. J. 2001; Miller, W. E. and Lefkowitz, R. J. 2001; Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. 2001; Luttrell, L. M. 2002).

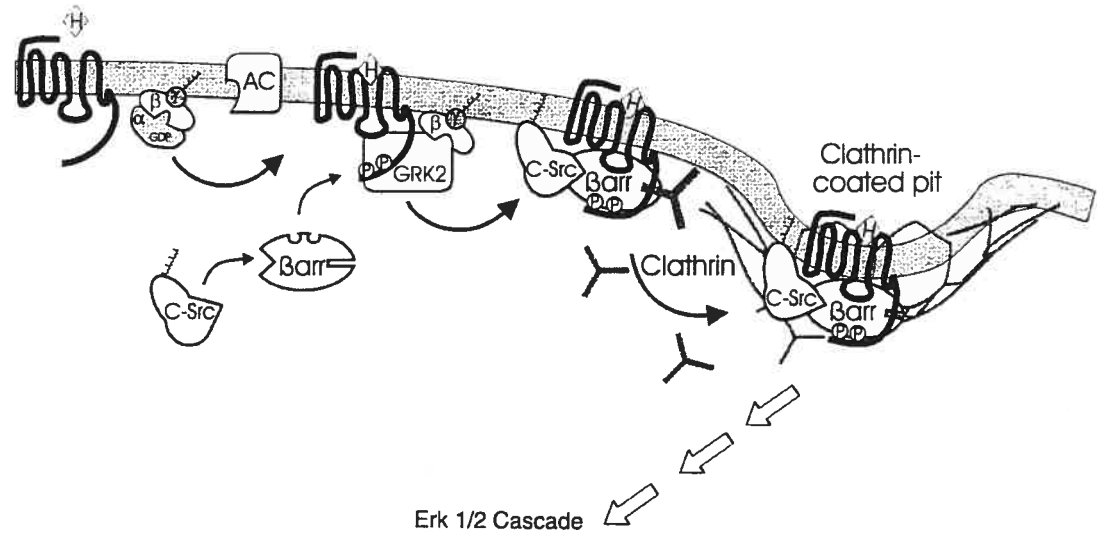


Figure 12 : Le double rôle des arrestines. Les arrestines participent à l'internalisation des GPCRs dans des vésicules d'endocytose et, simultanément, recrutent différents partenaires pour activer diverses voies de signalisation une fois les RCPGs internalisés.

6.2 - LE RÉCEPTEUR À L'EGF

6.2.1 – UNE FAMILLE DE RÉCEPTEURS

Le récepteur à l'EGF (aussi appelé erbB-1 et HER) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase qui joue un rôle clé dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire (Prenzel, N. *et al.* 2001). La liaison d'un ligand au récepteur à l'EGF provoque la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur à l'EGF, ce qui active son activité tyrosine-kinase (Jorissen, R. N. *et al.* 2003). La famille erb comprend quatre membres (erbB1, erbB2, erbB3 et erbB4) ayant chacun des caractéristiques signalétiques qui lui sont propres (Carraway, K. L., 3rd and Sweeney, C. 2001). Ainsi, erbB-2 est le partenaire préférentiel de tous les membres pour l'hétérodimérisation et il est surexprimé dans plusieurs cancers. Les complexes comprenant au moins un erbB-2 démontrent une activation prolongée.

ErbB-3 est dépourvu d'activité tyrosine-kinase mais peut tout de même interagir avec des protéines adaptrices recrutant des protéines signalétiques. Les propriétés de l'isoforme erbB-4 sont moins documentées et on connaît peu de choses à son sujet.

Une étude a démontré que le récepteur à l'EGF est transloqué au noyau suite à son activation où il peut agir comme un facteur de transcription pour augmenter l'expression de certains gènes, dont la cycline D1 (Lin, S. Y. *et al.* 2001).

Le récepteur à l'EGF est activé par une variété de ligands présentant un motif structural commun à l'EGF (Harris, R. C. *et al.* 2003). On connaît six ligands au récepteur à l'EGF à ce jour : l'EGF, le *transforming growth factor-alpha* (TGF α), l'amphiréguline, le *heparin-binding EGF-like protein* (HB-EGF), la betacelluline (BTC) et l'épiréguline.

Le récepteur à l'EGF est impliqué dans la régulation de la masse de cellules β . Une étude démontre que la signalisation du récepteur à l'EGF induit la prolifération de cellules pancréatiques embryonnaires (Cras-Meneur, C. *et al.* 2001). De plus, des souris déficientes pour le récepteur à l'EGF présentent un développement anormal des îlots (Miettinen, P. J. *et al.* 2000). Huotari *et al.* (Huotari, M. A. *et al.* 1998) ont étudié l'effet de tous les ligands connus du récepteur à l'EGF sur la prolifération de la cellule β in vitro en utilisant la lignée pancréatique INS-1. Leur publication rapporte que seule la BTC augmente la prolifération de la cellule β . L'action de la BTC se compare à celle des facteurs de croissance les plus puissants pour la cellule β tels que l'IGF-1, l'hormone de croissance et la prolactine.

6.2.2 - LA TRANSACTIVATION DU RÉCEPTEUR À L'EGF

Un concept récent propose que les RCPGs peuvent transactiver le récepteur à l'EGF. Cette transactivation requiert la maturation protéolytique de ligands transmembranaires pour le récepteur à l'EGF afin de libérer les fragments solubles et actifs des protéines (Daub, H. *et al.* 1997; Prenzel, N. *et al.* 1999; Leserer, M. *et al.*

2000; Pierce, K. L. *et al.* 2001). Ce système implique donc l'activation de métalloprotéinase transmembranaires par un second messenger intracellulaire en réponse à l'activation du RCPG. Différentes études ont proposé un rôle de la phospholipase C, du calcium intracellulaire, du complexe $G\beta\gamma$, de Pyk-2 et de c-Src dans ce processus.

La première étude faisant état du processus de transactivation du récepteur à l'EGF a été publiée en 1996 alors que Daub *et al.* démontrait que l'endothéline, la thrombine et l'acide lysophosphatidique (LPA) transactivait toutes le récepteur à l'EGF (Daub, H. *et al.* 1996). Par la suite, de nombreuses études ont démontré un processus de transactivation pour une variété de GPCRs tel que les récepteurs muscariniques (Tsai, W. *et al.* 1997), aux acides gras insaturés (Vacaresse, N. *et al.* 1999; Duval, C. *et al.* 2002), β -adrénergiques (Maudsley 2000) (Maudsley, S. *et al.* 2000), à l'angiotensine (Eguchi, S. *et al.* 1999), à la thromboxane (Gao, Y. *et al.* 2001), à l'endothéline (Iwasaki, H. *et al.* 1999), etc.

6.2.3 - LA BETACELLULINE : UN LIGAND DU RÉCEPTEUR À L'EGF IMPORTANT POUR LA CELLULE β

La BTC est une hormone peptidique isolée à partir d'un milieu conditionné par les cellules d'un insulinome (Shing, Y. *et al.* 1993). La BTC est un membre de la famille EGF qui est synthétisée sous forme de protéine transmembranaire. Le fragment extracellulaire mature et actif de la BTC est produit par clivage protéolytique. Ainsi, la BTC agit de manière juxtacrine/autocrine (Tada, H. *et al.* 1999) en activant le récepteur à l'EGF (erbB-1) et erbB-4 (Riese, D. J. *et al.* 1996). La BTC est exprimée dans l'intestin et le pancréas (Seno, M. *et al.* 1996).

La BTC pourrait être un facteur important pour la différenciation des cellules β . En effet, la BTC induit la transdifférenciation de cellules pancréatiques exocrines AR42J en cellules β (Mashima, H. *et al.* 1996). Une récente étude suggère aussi que la BTC détermine la différenciation des différentes populations de cellules endocrines lors du

développement du pancréas (Huotari, M. A. *et al.* 2002). Une autre étude démontre que le traitement de souris diabétiques à la BTC induit la formation d'îlots dans le foie exprimant le facteur de transcription NeuroD (Kojima, H. *et al.* 2003). La formation de structures semblables à celles des îlots est associée à l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques à la cellule β tels que l'insuline et la glucokinase. Il a aussi été démontré que la BTC augmente la prolifération de la cellule β *in vitro* (Huotari, M. A. *et al.* 1998) de même qu'*in vivo* chez le rat diabétique suite à un traitement à l'alloxan (Yamamoto, K. *et al.* 2000) ou à une pancréatectomie (Li, L. *et al.* 2001). Au niveau moléculaire, la BTC augmente l'expression et l'activité de liaison à l'ADN de PDX-1, un facteur de transcription impliqué dans le développement du pancréas (Watada, H. *et al.* 1996).

Ces études suggèrent donc que la BTC est un agent thérapeutique potentiel dans le traitement du diabète de type 2 en vertu de son effet sur la néogénèse et la prolifération des cellules β .

6.3 - LA PHOSPHATIDYLINOSITOL-3 KINASE

La PI-3K est une enzyme activée par de nombreux facteurs de croissance (Vanhaesebroeck, B. *et al.* 1997; Cantley, L. C. 2002) dans de multiples types cellulaires. Elle tire son nom du fait qu'elle phosphoryle l'anneau inositol du phosphatidylinositol (PI) en position 3 pour donner du PI-3,4 phosphate à partir du PI-4 phosphate et du PI-3,4,5 phosphate à partir du PI-4,5 phosphate (MacDougall, L. K. *et al.* 1995). L'action antagoniste est effectuée par la phosphatase PTEN (pour *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) qui déphosphoryle les phosphatidylinositols à la position 3. L'intérêt grandissant pour PTEN provient du fait qu'elle supprime la formation de tumeurs (Maehama, T. and Dixon, J. E. 1998; Cantley, L. C. and Neel, B. G. 1999).

On accorde à la PI-3K une importance capitale dans la signalisation induite par l'insuline et les facteurs de croissance. En effet, la PI-3K active une variété de voies

de signalisation distinctes qui participent à diverses actions biologiques. Parmi les effecteurs de la voie de la PI-3K, on retrouve 1) les *phosphatidylinositol-dependent kinases* (PDKs) qui à leur tour activent PKB (aussi appelé Akt) (Anderson, K. E. *et al.* 1998), la PKC ζ (Le Good, J. *et al.* 1998) et plusieurs autres voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire; 2) la P70S6Kinase et *mammalian target of rapamycin* (TOR) qui augmentent la synthèse protéique (Thomas, G. and Hall, M. N. 1997); et enfin, 3) la voie Raf/MAPK, ce qui mène subséquemment à la phosphorylation de facteurs de transcription modulant la réponse nucléaire (Castillo, A. I. *et al.* 1998). Ainsi, la PI-3K module l'activité d'une multitude d'effecteurs. Suite à son activation par l'insuline et les facteurs de croissance, la PI-3K stimule la prolifération, la survie cellulaire, la synthèse du glycogène; la lipogénèse, la synthèse protéique et la translocation de vésicules contenant les transporteur du glucose GLUT4 à la surface cellulaire afin d'augmenter la prise de glucose dans les tissus périphériques (Nicholson, K. M. and Anderson, N. G. 2002; Schwartz, J. *et al.* 2002).

6.4 – LA PROTÉINE KINASE B

PKB/Akt a été identifiée simultanément par deux groupes indépendants. En effet, il a été découvert en vertu de son homologie avec une protéine du rétrovirus transformant AKT8 d'une part (Bellacosa, A. *et al.* 1991), et avec les familles des protéines kinases A et des protéines kinases C d'autre part (Jones, P. F. *et al.* 1991).

Les PI phosphorylés en 3' par la PI-3K lient avec une haute affinité le domaine d'homologie aux pleckstrines (PH) de PKB. Cette liaison permet la phosphorylation des résidus Thr-308 et Ser-473 par PDK-1, ce qui est nécessaire à l'activation de PKB (Franke, T. F. *et al.* 1997). Un troisième site de phosphorylation a été découvert (Thr-450) mais la phosphorylation de ce dernier semble constitutive dans les cellules quiescentes et indépendante de l'action de PDK-1 (Alessi, D. R. *et al.* 1997). Il semble que la déphosphorylation de PKB pourrait faire intervenir la phosphatase 2A. Il est aussi à noter que certains groupes ont rapporté une activation de PKB

indépendante de la PI-3K qui serait plutôt régulée par la voie cAMP/PKA (Filippa, N. *et al.* 1999).

Une fois activée, PKB est transloquée de la membrane cellulaire vers différents compartiments cellulaires où il va phosphoryler ses différents substrats. Ainsi, PKB phosphoryle des effecteurs cytoplasmiques, des protéines associées à la mitochondrie et entre dans le noyau pour phosphoryler différents facteurs de transcription. La majorité des substrats de PKB sont impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. Parmi les cibles de PKB qui jouent un rôle dans l'apoptose, on retrouve Bad (del Peso, L. *et al.* 1997), NF- κ B (Romashkova, J. A. and Makarov, S. S. 1999; Madrid, L. V. *et al.* 2001), la caspase-9 (Weng, L. *et al.* 2001), les facteurs de transcription de type forkhead (Rena, G. *et al.* 1999; Takaishi, H. *et al.* 1999), GSK-3 (Cross, D. A. *et al.* 1995). PKB exerce son effet prolifératif en partie via l'augmentation des niveaux de cycline D1 (Muisse-Helmericks, R. C. *et al.* 1998) et l'activation des protéines kinases TOR et p70S6K (Cross, T. G. *et al.* 2000; Sekulic, A. *et al.* 2000). PKB active la synthèse du glycogène via la phosphorylation de GSK-3 (Cross, D. A. *et al.* 1995), augmente l'expression de la FAS (Wang, D. and Sul, H. S. 1998) et stimule la translocation de GLUT4 à la membrane cellulaire pour promouvoir la capture du glucose dans les tissus périphériques (Wang, Q. *et al.* 1999).

PKB semble jouer un rôle clé dans la régulation de la masse des cellules β . Deux études récentes ont démontré que des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de PKB affichait une masse de cellule β considérablement augmentée (Bernal-Mizrachi, E. *et al.* 2001; Tuttle, R. L. *et al.* 2001). De plus, ces animaux sont protégés du diabète induit par la streptozotocine, une toxine augmentant l'apoptose des cellules β . Ces études rapportent aussi une augmentation de la néogénèse de cellules β alors qu'une seule d'entre elle observe une prolifération accrue des cellules β (Bernal-Mizrachi, E. *et al.* 2001). En somme, ces deux études suggèrent un rôle important de PKB dans la régulation de la masse de cellules β par

un mécanisme complexe et hétérogène faisant intervenir la néogénèse, la réplication de même que l'apoptose.

6.5 – LA PROTÉINE KINASE C ζ : UNE PKC ATYPIQUE

La famille des PKCs comprend 12 protéines kinases différentes qui sont divisées en trois sous-familles ayant des profils d'activations distincts. On retrouve les PKCs classiques (cPKC : α , β et γ) qui sont activées par le calcium, le diacylglycérol (DAG) et les esters de phorbol; les PKCs novels (nPKC : δ , ϵ , η et θ) qui sont activées par le DAG et les esters de phorbol; et les PKCs atypiques (aPKC : ζ et λ) qui présentent une sous-famille au profil d'activation unique étant donné d'importantes différences structurales en comparaison aux autres sous-familles (revues sur les PKCs : (Moscat, J. and Diaz-Meco, M. T. 2000; Toker, A. 2000)). Les aPKCs sont en effet insensibles au calcium et au DAG/esters de phorbol mais seraient plutôt phosphorylées par PDK-1 en réponse à des signaux mitogéniques (Chou, M. M. *et al.* 1998; Le Good, J. *et al.* 1998). On accorde d'ailleurs à la PKC ζ un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Berra, E. *et al.* 1993; Diaz-Meco, M. T. *et al.* 1993). On connaît peu de choses sur les cibles en aval des aPKCs. Toutefois, un groupe a suggéré que PKC ζ pourrait agir sur les nPKCs pour augmenter leur activité en collaboration avec TOR (Parekh, D. *et al.* 1999; Ziegler, W. H. *et al.* 1999; Parekh, D. B. *et al.* 2000). Les facteurs de transcription NF-kB (reconnu pour jouer un rôle dans la prolifération et l'apoptose) et PDX-1 (facteur important et spécifique à la cellule β , voir plus bas) sont aussi des cibles de PKC ζ récemment découvertes. Enfin, une autre étude a permis de suggérer une implication des aPKCs dans la stimulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras (Yaney, G. C. *et al.* 2000).

6.6 – LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION PDX-1, AP-1 et NF-kB DANS LA CELLULE β

La réponse précoce aux divers agents mitogènes implique l'activation de voies de transduction de signaux qui mènent ultimement à l'activation de facteurs de transcription, souvent par phosphorylation, afin d'en moduler l'activité. La phosphorylation d'un facteur de transcription peut en effet changer sa localisation cellulaire, augmenter ou diminuer sa liaison à l'ADN et moduler son activité transcriptionnelle (Hunter, T. and Karin, M. 1992). Dans cette introduction, nous nous limiterons à la description de trois facteurs de transcription étudiés au cours de cette thèse de doctorat.

6.6.1 - PDX-1

Fonctions biologiques de PDX-1

Le gène PDX-1 (aussi appelé IDX-1 (Miller, C. P. *et al.* 1994) pour *islets and duodenum homeobox protein 1*) code pour une protéine qui fait partie du groupe des protéines homéobox (Habener, J. F. and Stoffers, D. A. 1998). Les protéines homéobox jouent un rôle crucial lors du développement et régulent l'expression de gènes clés conférant à un type cellulaire un phénotype spécifique. Ainsi, PDX-1 est essentiel pour le développement du pancréas chez l'embryon mais n'est exprimé que dans la cellule β chez l'adulte où il augmente l'expression de certains gènes importants pour la cellule β en se liant à son élément de réponse (composé de la séquence consensus TAATT/G) (Offield, M. F. *et al.* 1996). Parmi les gènes sous le contrôle de PDX-1, on retrouve : l'insuline (Watada, H. *et al.* 1996), le transporteur du glucose GLUT2 (Waeber, G. *et al.* 1996) et la glucokinase, l'enzyme limitante pour la glycolyse (Watada, H. *et al.* 1996).

PDX-1 régule des gènes nécessaires au développement du pancréas endocrine mais qui n'ont pas été identifiés à ce jour. Le knock-out du gène PDX-1 chez la souris inhibe complètement le développement du pancréas (Jonsson, J. *et al.* 1994; Jonsson, J. *et al.* 1995; Offield, M. F. *et al.* 1996). Aussi, les souris hétérozygotes (+/-) pour une mutation inactivatrice de PDX-1 se développent normalement mais présentent

une masse de cellules β réduite. D'ailleurs, un tel phénotype existe chez l'humain où une mutation homozygote pour le gène PDX-1 est associée à une absence totale du pancréas alors que les individus hétérozygotes développent un diabète précoce (Stoffers, D. A. *et al.* 19972). Une autre évidence de l'implication de PDX-1 dans le développement du pancréas provient du fait que des altérations telles les pancréatectomies (Sharma, A. *et al.* 1999) ou des traitements à la streptozotocine (Fernandes, A. *et al.* 1997) induisent une expression de PDX-1 qui corrèle avec la régénération des cellules β .

Le grand intérêt que suscite PDX-1 provient aussi du fait qu'il régule l'expression du gène de l'insuline (Watada, H. *et al.* 1996; Melloul, D. *et al.* 2002a). On retrouve en effet des sites de liaison pour PDX-1 dans le promoteur du gène de l'insuline chez l'humain et chez le rat sur lesquels PDX-1 agit de concert avec les protéines à motif basique hélice-boucle-hélice (bHLH). Ainsi, chacun de ces promoteurs contient des enhancers eux-mêmes constitués de sites adjacents de liaison pour PDX-1 et pour les protéines bHLH (E2A, et Beta2/NeuroD) (Habener, J. F. and Stoffers, D. A. 1998) qui agiront en synergie pour augmenter l'expression du gène de l'insuline. On sait aussi que l'hyperglycémie chronique ou l'expression prolongée de la cellule pancréatique β à de hautes concentrations en glucose diminue l'expression des gènes de PDX-1 et de l'insuline (Olson, L. K. *et al.* 1995; Sharma, A. *et al.* 1995; Melloul, D. *et al.* 2002b). Cette observation fournit une explication plausible à la glucotoxicité de la cellule pancréatique β , c'est-à-dire une production et une sécrétion d'insuline déficientes suite à l'hyperglycémie chronique (Yki-Jarvinen, H. 1992).

Régulation de l'expression de PDX-1

L'activité de même que l'expression de PDX-1 est sous le contrôle de stimuli nutritionnels. En effet, une exposition à court terme à une concentration de glucose élevée active la liaison de PDX-1 à l'ADN par un mécanisme impliquant la PI-3K et P38 (Macfarlane, W. M. *et al.* 1994; Macfarlane, W. M. *et al.* 1997) alors que le palmitate diminue l'expression et l'activité de PDX-1, réduisant par conséquent les

niveaux de GLUT2, de la glucokinase et de l'insuline (Gremlich, S. *et al.* 1997). Cette activation de PDX-1 par le glucose participe à l'effet insulino-tropique du glucose tel que suggéré par le groupe de Docherty (Macfarlane, W. M. *et al.* 1997).

6.6.2 - AP-1

Fonctions biologiques de AP-1

AP-1 (pour *activating protein-1*) est un ensemble de facteurs de transcription composés d'homodimères entre les membres de la famille de gènes à réponse précoce JUN ou encore d'hétérodimères entre celles de JUN (c-jun, junB et junD), FOS (c-fos, v-fos, fosB, Fra-1 et Fra-2) et ATF (ATF2, ATF3 et B-ATF). Le complexe AP-1 génère un motif leucine-zipper qui lui permet de se lier à son élément de réponse nommé TRE (élément de réponse au TPA) et qui consiste en une séquence palindromique : TGAC/GTCA. On a nommé ainsi l'élément de réponse à AP-1 puisque ce dernier est impliqué dans la modulation de l'expression de certains gènes induits par l'ester de phorbol 12-o-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Toutefois, les complexes composés des membres ATF-JUN et ATF-ATF lient avec une plus grande affinité le CRE dont la séquence consensus est proche de celle du TRE : TGACGTCA (Karin, M. 1992; Karin, M. 1995) (Karin 1992 Karin 1997; Karin, M. *et al.* 1997). L'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 peut participer à la réponse à certains stimuli mitogéniques (Piechaczyk, M. and Blanchard, J. M. 1994; Schreiber, M. *et al.* 1999), à la réponse cellulaire au stress (Ausserer, W. A. *et al.* 1994), à l'apoptose (Bossy-Wetzel, E. *et al.* 1997) et au développement (Lian, J. B. *et al.* 1991). Un mauvais contrôle de l'activité transcriptionnelle de AP-1 peut mener à une croissance aberrante et à des transformations oncogéniques.

Régulation de l'activité de AP-1

En plus de la régulation effectuée au niveau de l'hétérodimérisation des membres du complexe AP-1, les membres des familles FOS, JUN et ATF peuvent être la cible de

plusieurs voies de transduction de signaux dont les voies *extra-cellular signal related kinase 1/2* (ERK1/2), P38 MAPK et JNK (Karin, M. 1995). La phosphorylation de certains résidus change l'affinité du complexe pour son élément de réponse à l'ADN ou encore modifie l'activité transcriptionnelle de AP-1. L'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 est aussi modulée par les interactions du complexe avec une variété de coactivateurs/corépresseurs (tels que *jun activation domain binding protein 1* (JAB1), *CREB binding protein* (CBP) et p202).

L'expression des gènes à réponse précoce composant le complexe AP-1

Le promoteur du gène *c-fos* comporte un CRE qui permet une modulation de l'expression du gène en réponse aux augmentations des niveaux intracellulaires de cAMP et de Ca^{2+} induites par les neurotransmetteurs et les hormones polypeptidiques (Sheng, M. *et al.* 1991). On y retrouve aussi un élément de réponse reconnu par les facteurs de transcription STAT et un élément de réponse au sérum (SRE) reconnaissant un dimère SRF/TCF (*serum-response factor/ternary complex factors*) (Treisman, R. 1992; Darnell, J. E., Jr 1996). Quant à *c-jun*, il est induit rapidement par plusieurs stimuli dont les facteurs de croissances, les cytokines et les irradiations aux UV (Karin, M. 1995). Son expression est généralement modulée via un TRE reconnu par les dimères c-Jun /ATF2 (van Dam, H. *et al.* 1993). Contrairement aux membres des familles FOS et JUN, ATF2 est exprimé constitutivement et sa régulation se situe donc au niveau post-translationnel par phosphorylation (Karin, M. 1995).

L'activité de AP-1 et l'expression des membres des familles FOS et JUN peuvent être modulées par divers stimuli nutritionnels. Premièrement, leur expression est augmentée par plusieurs agents provoquant des élévations de calcium dans divers types cellulaires (Roche, E. and Prentki, M. 1994). Aussi, de récentes études effectuées par notre groupe de recherche sur la lignée cellulaire pancréatique β INS-1 ont démontré que le glucose et le GLP-1 agissent en synergie pour augmenter l'expression de certaines composantes de AP-1 (tels que *c-fos*, *c-jun* et *junB*) (Susini,

S. *et al.* 1998). La forte induction de l'expression de *c-fos* par le glucose et le GLP-1 implique les voies de transduction de signaux AMPc/PKA et Ca^{2+} /CaMKII toutes deux dirigées vers le CRE au promoteur et vers un élément de réponse situé dans le premier intron du gène (Susini, S. *et al.* 2000). Les acides gras (tels que l'oléate et le palmitate) induisent aussi l'expression de *c-fos* via l'activation de certaines isoformes de la PKC et nécessite une concentration cytosolique de calcium élevée (Roche, E. *et al.* 1999).

6.6.3 - NF-kB

Le facteur de transcription NF-kB est une cible en aval de PKB qui est reconnu pour jouer un rôle clé dans la régulation de l'apoptose dans une variété de systèmes cellulaires. Le facteur de transcription NF-kB constitue un homo- ou un hétérodimère des membres d'une famille de protéines qui comprend p50, p52, Rel-A (aussi nommé p65), c-Rel et Rel-B. Le complexe NF-kB est présent dans le cytoplasme dans sa forme inactive où il est séquestré par son inhibiteur IκB. PKB, de même que d'autres kinases, phosphoryle IκB pour induire son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ceci a pour effet de libérer la forme active de NF-kB qui est relocalisé au noyau où il peut exercer son activité transcriptionnelle pour augmenter l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques en fonction du contexte cellulaire (Baldwin, A. S. 2001) (Yamamoto, K. *et al.* 2000; Chen, F. *et al.* 2001). Il est intéressant de remarquer que IκB peut aussi être phosphorylé par la PKCζ (Diaz-Meco, M. T. *et al.* 1993), une kinase activée par le GLP-1 dans la cellule β (Buteau, J. *et al.* 2001). Des sites de liaison pour NF-kB ont été trouvés dans le promoteur de gènes pro-apoptotiques tels que l'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Taylor, B. S. *et al.* 1998), certaines cytokines (Hiscott, J. *et al.* 1993; Taylor, B. S. *et al.* 1998), Fas and Fas-Ligand (Matsui, K. *et al.* 1998). NF-kB régule aussi l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que : les inhibiteurs de caspase IAP-1, IAP-2 et XIAP (Wang, C. Y. *et al.* 1998); les stabilisateurs de la membrane mitochondriale Bcl-2 (Mattson, M. P. and Camandola, S. 2001), Bcl-xl et Bfl-1 (Lee, H. H. *et al.* 1999); et des régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D1 (Guttridge, D. C. *et al.* 1999;

Hinz, M. *et al.* 1999). Le double rôle de NF- κ B sur la promotion/prévention de l'apoptose s'explique par l'interaction de NF- κ B qui agit en combinaison avec les autres voies de signalisation et facteurs de transcription activés dans un contexte cellulaire spécifique (Pahl, H. L. 1999). On connaît peu de choses sur le rôle de NF- κ B dans la cellule β . On sait que son activité est augmentée par différentes cytokines, ce qui peut suggérer que NF- κ B jouerait un rôle plutôt pro-apoptotique dans cette cellule (Giannoukakis, N. *et al.* 2000; Cardozo, A. K. *et al.* 2001; Heimberg, H. *et al.* 2001). Toutefois, certains auteurs suggèrent que cette augmentation de l'activité de NF- κ B en réponse aux cytokines pourraient constituer une défense de la cellule via l'activité anti-apoptotique de NF- κ B. Une récente étude, en accord avec cette dernière hypothèse, rapporte que l'activation de NF- κ B prévient l'apoptose induite par le TNF- α (Chang, I. *et al.* 2003).

7 - THÉMATIQUE ET BUT DU TRAVAIL

Le GLP-1, une hormone sécrétée par les cellules L de l'intestin suite à un repas riche en graisses ou en hydrates de carbones, est un agent thérapeutique potentiel prometteur dans le traitement du diabète. Au moment de commencer ma thèse de doctorat, ses actions glucoincrétines et insulinothropiques étaient reconnues. Toutefois, l'hypothèse selon laquelle l'effet anti-diabétogénique du GLP-1 dépendrait en partie de la régulation de la masse de cellules β n'avait jamais été testée. Une possible action proliférative et anti-apoptotique du GLP-1 constituait une perspective attrayante qui ajoutait beaucoup d'intérêt quant à son utilisation dans un traitement du diabète de type 1 et 2.

Article 1 : Glucagon-Like Peptide-1 Promotes DNA Synthesis, Activates Phosphatidylinositol-3 kinase and Increases PDX-1 DNA Binding Activity in β (INS-1)-Cells

Diabetologia 1999 **42**(7): 856-64

Nous nous sommes proposés dans un premier temps d'étudier l'effet du GLP-1 sur la prolifération de la cellule β en utilisant la lignée cellulaire INS-1 et des îlots de rats isolés. Nous avons aussi tenté d'identifier la (les) voie(s) de signalisation participant à l'effet prolifératif du GLP-1. À cette époque, on connaissait bien peu de choses sur les voies de signalisation induites par le GLP-1. On savait que le GLP-1, via l'activation de son récepteur couplé à la protéine Gs, active la voie de transduction du signal AMPc/PKA. Or, plusieurs agents agissant comme des facteurs de croissance pour la cellule pancréatique β sont reconnus pour activer la voie AMPc/PKA. Les voies de signalisation AMPc/PKA et de la PI-3K représentaient des candidats de choix étant donné leur rôle connu dans la transduction de signaux prolifératifs en réponse à de nombreux facteurs de croissance dans divers types cellulaires. De plus, une publication récente de notre groupe de recherche venait de démontrer que le GLP-1 et le glucose agissent en synergie pour augmenter l'expression de certains gènes à réponse précoce pouvant être impliqués dans la prolifération cellulaire (*c-fos*, *c-jun* et *junB*). Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle l'expression de ces gènes corrélait avec la prolifération de la cellule β afin de savoir s'ils pourraient être impliqués dans un possible effet prolifératif du GLP-1.

Les résultats indiquent que le GLP-1 agit comme un facteur de croissance pour la cellule β . En effet, le GLP-1 augmente l'incorporation de thymidine tritiée dans la lignée cellulaire INS-1 et les îlots de rats isolés. L'incorporation de thymidine tritiée induite par le GLP-1 est dose-dépendante et non-additive avec le glucose. L'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques suggère que le GLP-1 active la prolifération via l'activation de la voie de signalisation de la PI-3K. La prolifération de la cellule β ne corrèle ni avec l'expression des gènes à réponse précoce, ni avec l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1, mais plutôt avec l'expression et l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1. L'activation du facteur de transcription PDX-1 par le GLP-1 est associée à une augmentation de l'expression du gène de l'insuline, du transporteur du glucose GLUT2 et de la glucokinase, l'enzyme limitante pour la glycolyse.

Article 2 : Protein Kinase C ζ Activation Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Induced Pancreatic β -Cell Proliferation

Diabetes 2001 50(10): 2237-43

Nous avons par la suite tenté d'identifier les voies de signalisation situées en aval de la PI-3K pouvant participer à l'effet prolifératif du GLP-1. En ce sens, nous avons tout d'abord étudié l'effet du GLP-1 sur les principales voies de signalisation en aval de la PI-3K étant déjà reconnues pour participer à la transduction de signaux mitogéniques : PKB, ERK1/2, p38 MAPK et PKC ζ , une aPKC. Nous avons vérifié si l'activité de ces kinases corrélait avec la prolifération de la cellule β . Ensuite, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques disponibles commercialement pour inhiber spécifiquement certaines de ces voies afin de tester leur implication dans l'effet prolifératif du GLP-1. D'une manière similaire, nous avons utilisé des adénovirus recombinants afin de surexprimer différents mutants PKC ζ (dominant négatif, constitutivement actif et type sauvage).

Les résultats démontrent que le GLP-1 augmente l'activité de PKB, ERK1/2 et p38 MAPK. De plus, le GLP-1 induit la translocation de la PKC ζ du cytoplasme au noyau dans la lignée cellulaire INS832/13 et dans des cellules β dispersées à partir d'îlots de rats. Des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à p38 MAPK et aux aPKCs ont supprimé l'effet prolifératif du GLP-1. Toutefois, l'inhibiteur de p38 MAPK a diminué la prolifération basale de la cellule β . La surexpression d'une PKC ζ dominante négative a aboli l'effet prolifératif du GLP-1 alors qu'une construction constitutivement active a augmenté la prolifération basale de la cellule β .

Ces résultats sont compatibles avec un modèle selon lequel le GLP-1 augmenterait la translocation de la PKC ζ du cytoplasme au noyau de la cellule β . La translocation au noyau de la PKC ζ pourrait jouer un rôle dans l'effet pléiotropique de l'hormone gluco-incréatine (biosynthèse d'insuline, expression de gènes du métabolisme, prolifération, etc.).

Article 3 : Glucagon-Like Peptide-1 Induces Pancreatic β -Cell Proliferation Via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor

Diabetes 2003 **52**(1): 124-32

À ce stade-ci, le mécanisme précis par lequel le GLP-1 active la PI-3K pour promouvoir la prolifération de la cellule β demeurerait inconnu. Au cours de cette étude, nous avons alors testé l'hypothèse selon laquelle le GLP-1R transactiverait le récepteur à l'EGF pour augmenter l'activité de la PI-3K et la prolifération de la cellule β . Nous avons aussi ensuite tenté de définir le mécanisme précis par lequel le GLP-1R pourrait transactiver le récepteur à l'EGF. Ainsi, nous avons testé l'implication de c-Src et de la maturation protéolytique de la BTC dans le processus de transactivation du récepteur à l'EGF en réponse au GLP-1.

L'usage d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à c-Src (PP1) et au récepteur à l'EGF (AG1478) inhibent la prolifération induite par le GLP-1 dans la lignée cellulaire INS832/13 et les îlots de rats isolés. Le GLP-1 augmente la phosphorylation du récepteur à l'EGF d'une manière sensible au PP1. De plus, la surexpression d'un récepteur à l'EGF dominant-négatif à l'aide d'un rétrovirus supprime l'effet prolifératif du GLP-1. Ces résultats suggèrent que le GLP-1 transactive le récepteur à l'EGF par un mécanisme impliquant c-Src pour promouvoir la prolifération de la cellule β . Nos résultats démontrent aussi que le GLP-1 réduit les niveaux de BTC à la surface cellulaire. La prolifération de la cellule β induite par le GLP-1 est supprimée par un anticorps neutralisant la BTC et un inhibiteur pan-spécifique des métalloprotéinases (GM6001). Le GLP-1 induit aussi la prolifération de la lignée cellulaire LNCaP, une lignée n'exprimant pas le GLP-1R mais affichant une réponse mitogénique en réponse à la BTC, lorsque co-cultivée en présence de cellules INS832/13. Cette prolifération des LNCaP est supprimée par un anticorps neutralisant la BTC et le GM6001.

Nos résultats sont compatibles avec un modèle selon lequel le GLP-1 active la voie de la PI-3K et stimule la prolifération de la cellule β via la transactivation du récepteur à l'EGF par un mécanisme dépendant de c-Src et du clivage de la betacelluline. Cette étude démontre pour la première fois que le GLP-1R transactive le récepteur à l'EGF et stimule la maturation de la betacelluline. Nos résultats ajoutent beaucoup d'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans le traitement du diabète de type 2 puisque la betacelluline est considérée comme un agent anti-diabétogénique potentiel pour la cellule pancréatique β .

Article 4 : Glucagon-Like Peptide-1 Prevents β -Cell Glucolipototoxicity Via Protein Kinase B/Akt

Soumis pour publication

Un possible effet anti-apoptotique du GLP-1, conjuguée à son action sur la prolifération cellulaire, est une perspective attrayante qui ajouterait de l'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans un traitement du diabète. Au cours de cette étude, nous avons étudié l'effet du GLP-1 sur l'apoptose induite par de hautes concentrations de glucose (glucotoxicité) et d'acides gras libres (lipotoxicité), seuls ou combinés (glucolipototoxicité), dans la cellule β .

Le GLP-1 protège la cellule β de l'apoptose induite par une concentration élevée de glucose ou de palmitate, qu'ils soient seuls ou combinés dans la lignée cellulaire INS832/13 et dans des cultures primaires d'îlots humains. La surexpression d'un mutant PKB dominant-négatif dans la cellule INS832/13 supprime l'effet anti-apoptotique du GLP-1 alors qu'un PKB constitutivement actif inhibe l'apoptose induite dans un contexte de glucolipototoxicité. Le GLP-1 augmente l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- κ B dans la cellule INS832/13 et son activité anti-apoptotique est abolie par un inhibiteur de NF- κ B. Enfin, le GLP-1 augmente l'expression de IAP2 et de Bcl-2, deux gènes anti-apoptotiques dont l'expression peut être régulée par NF- κ B.

Nos résultats suggèrent que le GLP-1 prévient la glucotoxicité, la lipotoxicité et la glucolipotoxicité de la cellule β , via l'activation de PKB et de NF- κ B. Cette étude suggère que l'hormone gluco-incréatine joue un rôle clé dans la régulation de la masse de cellules β par divers mécanismes faisant intervenir la prolifération et la protection contre l'apoptose. Cette étude a beaucoup d'implications quant à l'usage du GLP-1 dans un traitement du diabète puisque la glucolipotoxicité de la cellule β semble jouer un rôle important dans la phase de décompensation de la cellule β . De plus, elle révèle l'utilité du GLP-1 quant à « l'expansion » de la masse de cellules β et la survie des cellules β en culture dans le cadre d'un programme de transplantations d'îlots.

RÉSULTATS

Glucagon-Like Peptide-1 Promotes DNA Synthesis, Activates Phosphatidylinositol-3 kinase and Increases PDX-1 DNA Binding Activity in β (INS-1)-Cells

J. Buteau¹, R. Roduit¹, S. Susini², M. Prentki¹

¹Molecular Nutrition Unit, Department of Nutrition, University of Montreal and the CR-CHUM, Institut du Cancer, Montreal, Quebec, Canada.

²Fondation pour Recherches Medicales, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

Au cours de cette étude, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le GLP-1 pourrait agir comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β et nous avons tenté d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'action proliférative du GLP-1.

Nous démontrons pour la première fois que le GLP-1 stimule la prolifération de la cellule β . De plus, nos résultats suggèrent que l'action proliférative du GLP-1 nécessite l'activation de la voie de signalisation de la PI-3K. Nous rapportons aussi pour la première fois que le GLP-1 augmente l'activité du facteur de transcription PDX-1 via la PI-3K pour accroître l'expression du gène de l'insuline, du transporteur du glucose GLUT2 et d'autres gènes importants impliqués dans le métabolisme du glucose.

Cette étude ajoute beaucoup d'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans un traitement du diabète de type 2 car en plus de son action sur la sécrétion d'insuline, le GLP-1 peut aussi agir comme un facteur de croissance pour la cellule β .

Contributions des coauteurs :

R. Roduit : Isolation d'îlots de rat

S. Susini : Étude préliminaire sur l'expression des gènes à réponse précoce

Summary

Aims: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is a potent glucocretin hormone and a potentially important drug in the treatment of type II diabetes. We have investigated whether GLP-1 may act as a growth factor in β (INS-1)-cells and have studied the signaling pathways and transcription factors implicated in this process.

Methods: Cell proliferation was assessed by tritiated thymidine incorporation measurements. We have examined the action of GLP-1 on the enzymatic activity of phosphatidylinositide 3-kinase (PI3-kinase). The DNA binding activity of transcription factors was investigated by electrophoretic mobility shift assay. mRNA measurements were performed using the Northern technique.

Results: GLP-1 caused an increase in tritiated thymidine incorporation in β (INS-1)-cells and PI3-kinase activity in a dose-dependent manner non-additively with glucose. The PI3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 blocked the effects of GLP-1 on DNA synthesis. PDX-1 DNA binding activity was increased by GLP-1 at 3 or 11 mM glucose and the PI3-kinase inhibitor LY294002 suppressed the action of GLP-1 on PDX-1 DNA binding activity. GLP-1 and glucose alone did not change AP-1 DNA binding activity. However, they synergized to increase the activity of AP-1. GLP-1 also increased the expression level of PDX-1, GLUT2, glucokinase and insulin mRNAs. Finally, GLP-1 increased the incorporation of tritiated thymidine in isolated rat islets.

Interpretation: The results suggest that GLP-1 may act as a growth factor for the β cell via a PI3-kinase mediated event. GLP-1 could also regulate the expression of the insulin gene and genes encoding enzymes implicated in glucose transport and metabolism via the PI3-kinase/PDX-1 transduction signaling pathway.

Abbreviations: GLP-1, Glucagon-like peptide-1; PI3-K, phosphatidylinositide 3-kinase; PDX-1, pancreatic and duodenal homeobox gene-1; AP-1, activating protein-1; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus; IEG, immediate-early response genes.

Introduction

Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) is secreted by the intestinal L-cells in response to fat meals and carbohydrates [1,2]. It is a potent glucoincretin hormone which acts as a competence factor in determining the ability of the β -cell to respond to glucose in terms of insulin secretion [3], K/ATP channels closure [4] and the induction of immediate early response genes (IEG) [5]. It is considered as a potentially important drug in the treatment of diabetes particularly in view of its ability to improve insulin secretion both in subjects with impaired glucose tolerance and non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) [6]. GLP-1 is also an insulintropic agent through its ability to stimulate insulin gene expression and proinsulin biosynthesis [7]. Whether it may also influence β -cell growth is presently unknown. A β -cell growth promoting action of GLP-1 is an attractive possibility in view of the fact that various pharmacological agents known to raise islet cAMP have been documented to stimulate β -cell replication [8] and that GLP-1 activates the cAMP/protein kinase A transduction system [2]. In addition, our recent work indicates that GLP-1 synergize with glucose to induce a number of IEG known to be implicated in cell growth and differentiation, in particular *c-fos*, *c-jun* and *junB* [5].

Little is known about the signaling pathways that regulate β -cell replication by glucose and various peptide hormones. A number of studies have implicated the protein kinase A and C transduction systems but more recent work has led to the emerging concept that a number of insulin activated signaling molecules, in particular IRS-2 [9,10], play a crucial role in this process. An important downstream effector of IRS-2 is phosphatidylinositide 3-kinase (PI3-K), a family of proteins known to be activated in response to various growth factors in different cell types [11]. Glucose activates PI3-K in pancreatic β -cell, an action that may be causally implicated in insulin gene induction by the sugar via phosphorylation of the transcription factor PDX-1 [12]. Mutations in the transactivating domain of PDX-1 have been shown to cause a monogenic early-onset form of diabetes (MODY4) [13] and it has been hypothesized that defective PDX-1 function could have pleiotropic effects on β -cell function in particular abnormal cell growth and insulin gene expression [14].

In view of the possible importance of GLP-1 as a therapeutic agent [6] and of the crucial role of altered β -cell replication/apoptosis in the etiology of diabetes [8,15] we have investigated the action of the incretin on β -cell signaling and DNA replication.

Materials and methods

Materials. LY294002 and wortmannin were purchased from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Human glucagon-like peptide-1 fragment 7-36 amide was obtained from Sigma (Geneva, Switzerland). Anti p85 α PI3-K antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA). RPMI 1640 and the supplements including fetal calf serum were purchased from Gibco BRL (Burlington, ONT). Methyl [^3H] thymidine was from ICN (Costa Mesa, CA).

Cell Culture and Incubation. INS-1 cells (passages 36-70) were grown in monolayer cultures as described previously [16] in regular RPMI-1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 μM β -mercaptoethanol, 100 IU/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified (5% CO_2 , 95% air) atmosphere. When cells reached 80% confluence after approximately 7 days they were washed with 11mM phosphate buffered saline (PBS) and preincubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min in a Krebs-Ringer bicarbonate medium (KRB) containing 1mM CaCl_2 , 5mM NaHCO_3 , 25 mM HEPES (pH 7.4) supplemented with 3 mM glucose and 0.1% defatted BSA (Sigma, Fraction V). Cells were then washed with PBS and incubated for the indicated times in the same supplemented KRB medium containing the substances to be tested. Subsequently, electrophoretic mobility shift assay and PI3-K activity measurements were carried out as described below.

Thymidine Incorporation Assay. INS-1 cells were seeded 2 days prior use in 96-well plates (8×10^4 cells per well) and cultured in regular RPMI medium as described above. Cells were then washed with PBS and preincubated for a period of 24 h in minimal RPMI medium i.e. without serum and glucose but with 0.1% BSA. They were then incubated for 24 h in minimal RPMI medium at the indicated glucose concentrations with various test substances. Proliferation was determined by incorporation of [^3H]thymidine (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) during the final 4 h of the 24 h

incubation period. Cells were then harvested with a PHD cell harvester from Cambridge technology (Watertown, MA) and the radioactivity retained on the dried glass fiber filters was measured.

Rat islets were isolated from 200 g Wistar rats as described before [17]. Isolated rat islets (50 islets per condition) were seeded in 12-well plates and cultured in regular RPMI containing 11 mM glucose and 10% FCS for 24 h. Islets were then washed with PBS and preincubated for a period of 24 h in minimal RPMI medium. They were then incubated for 24 h in minimal RPMI medium containing 3 mM glucose with or without GLP-1 and growth hormone. Tritiated thymidine (5 μ Ci/well) was added for the final 6 h incubation period. Then, islets were lysed and DNA precipitated in 10% trichloroacetic acid using a published procedure [18]. DNA was solubilized in 0.4 M NaOH and radioactivity measured.

Preparation of Nuclear Extracts and Electrophoretic Mobility Shift Assays. Nuclear extracts were isolated using a published procedure [19]. Briefly, cells (40×10^6 per condition) previously grown in 225 cm² petri dishes were harvested using a rubber policeman, washed in cold PBS, sedimented at 3'500xg for 4 min and lysed in 1 ml of ice-cold buffer A (15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5% Nonidet P-40). After a 10 min incubation on ice, nuclei were collected by centrifugation (100xg for 5 min) and washed with buffer A without Nonidet P-40. Nuclei were lysed in 10 μ l of a buffer containing 2 mM KCl, 25 mM HEPES, 0.1% EDTA, and 1 mM dithiothreitol (DTT). After a 15 min incubation period on ice, 300 μ l of a buffer containing 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 0.1% PMSF, 2 μ g/ml aprotinin, 0.1 mM EDTA, and 11% glycerol was added to the nuclei preparation. Samples were centrifuged (16'000xg, 20 min) and the supernatants containing the nuclear proteins was used for protein determination, subsequently aliquoted (50 μ l) and kept frozen at -70°C for further analysis. The oligonucleotides used to assess the binding activities of the transcription factors PDX-1 and AP-1 by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were purchased from ACGT (Toronto, ONT). Respectively, a 30-mer oligonucleotide containing a sequence of the A1 box of the rat insulin I promoter was

used to assess PDX-1 activity [20] and a 28-mer oligonucleotide containing a consensus AP-1 recognition sequence has been used to measure AP-1 activity [21]. After annealing, the double-stranded oligonucleotides were labeled with [γ ³²P]-ATP using the DNA 5'-end-labeling kit from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). EMSAs were performed as described previously [22]. Briefly, 5 μ g of protein extracts were incubated with a radiolabeled probe (20'000 cpm per sample) for 20 min at room temperature in a buffer containing 25 mM HEPES, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40, and 1 mM DTT. A 50 fold molar excess of cold oligonucleotide was added with the labeled probe to assess the specificity of nuclear protein binding of the EMSA. Samples were analyzed on 4% nondenaturing polyacrylamide gels containing 0.01% Nonidet P-40.

Phosphatidylinositide3-kinase (PI3-K) activity measurements. INS cells were grown in 75 cm² petris. Following a 5 min incubation period in KRB with various test substances, PI3-K was assayed according to reference [23]. In brief, PI3-K was immunoprecipitated from 2-3 mg of INS-1 cell total protein extracts and resuspended in 50 μ l of a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 100 mM EGTA. After a 10 min preincubation period with 10 μ g of L- α -phosphatidylinositol, 10 μ Ci of [γ ³²P]-ATP were added with 10 mM MgCl₂. Reactions were stopped after 4 min at room temperature with 0.15 ml of CHCl₃-MeOH-HCl (100:200:2). Lipids were extracted and spotted on silica gel plates for thin layer chromatography [6].

RNA isolation and Northern blot analysis. Total RNA was isolated by the guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform method from cells incubated for 3h in serum free RPMI medium at 3 or 11 mM glucose in 75 cm² petris. RNA (15 μ g) was denatured with glyoxal and dimethylsulphoxide and subjected to electrophoresis in 1.2% agarose gels. RNA was transferred to a nylon membrane by capillarity and detected by Northern blot hybridization with ³²P-labeled cDNA probes obtained by random priming. The inserts used were: a BamHI-XbaI rat insulin fragment subcloned in

pBSKS; a glucokinase EcoRI 1-2216 EcoRI fragment from rat in plasmid pBSKS; a GLUT2 EcoRI 18-882 BamHI fragment from rat subcloned in pGEM-4 (Promega) and a 1.4 Kb EcoRI-EcoRI PDX-1 fragment subcloned in pBJ5. A human α -actin PstI 1-720 PvuII fragment in plasmid pSP65 and methylene blue staining were used to normalize mRNA levels.

Calculations and statistics. Data are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with the SPSS for Windows system. Differences between two conditions were assessed with Student's *t*-test for related samples. Differences were deemed to be significant when *p* was less than 0.05.

Results

GLP-1 and glucose increase DNA synthesis in β (INS-1)-cells in a non-additive manner. The effects of GLP-1 on β -cell growth and DNA synthesis were initially examined in INS-1 cells cultured in a minimal RPMI medium (described in "Materials and Methods") to avoid the effects of unknown factors present in the serum, particularly in view that serum is a potent growth factor for β (INS-1)-cells [9].

Fig.1 shows the dose dependence of GLP-1 and glucose on β (INS-1)-cell DNA synthesis. Panel A reports the effect of increasing GLP-1 concentration at a fixed concentration of glucose of 6 mM. It is apparent that GLP-1 promotes tritiated thymidine incorporation in INS-1 cell in a dose dependent manner. The threshold effective concentration is in the range 10^{-12} M to 10^{-11} M. The half maximal and maximal effective concentrations are respectively 10^{-10} and 10^{-9} M. This underscores the extreme sensitivity of the action of GLP-1 on INS-1 cell proliferation. Panel B reports the dose dependence of the action of glucose ranging from 3 to 25 mM in the absence and presence of GLP-1 at a maximally effective concentration of 10^{-8} M. The results indicates that GLP-1 promotes cell growth already maximally at low (3mM) glucose and that the effects of glucose and GLP-1 are not additive, suggesting a possible common mechanism of the two agents (Fig.1B). In subsequent experiments, we investigated the mode of action of GLP-1 at glucose concentrations ranging from 3 to 11 mM.

GLP-1 and glucose modulate PI-3K activity in INS-1 cells. PI3-K is an enzyme that has been implicated in many cellular processes including cell growth and cellular differentiation [11]. It is also thought to be involved in the mode of action of glucose on insulin gene expression as evidenced by the group of K. Docherty [12]. We hypothesized that PI3-K might also participate in the mode of action of GLP-1 on β -cell growth and wished to determine whether its activity in the presence of GLP-1 correlates with cell growth measurements. The activation of PI3-K was studied after

a 5 min incubation period with increasing concentration of GLP-1 (from 100 pM to 100 nM) at 6 mM glucose (Fig.2A). The results show that similarly to cell growth a maximal activity is observed at 10^{-9} M. The results in Fig.2B show that both GLP-1 and glucose (11 mM) enhanced PI3-K activity in a non-additive manner like they do for β -cell growth (Fig.1B).

We next investigated the action of PI3-K inhibitors on the cell growth promoting action of GLP-1 and glucose to determine whether rises in DNA synthesis caused by GLP-1 and glucose may involve the PI3-K signal transduction pathway. Cells were incubated at 3 or 11 mM glucose with or without 10 nM GLP-1, in the presence or absence of the PI3-K inhibitors (LY294003 and wortmannin). These agents blocked both GLP-1 and glucose-induced increases in DNA synthesis (Fig.3). This provides pharmacological evidence of the implication of PI3-K in the cell growth promoting action of the glucocoincretin.

Much recent evidence has been obtained for a paracrine signaling pathway involving insulin in the β -cell [24,25]. To determine whether GLP-1 exerts its effect on PI3-K via insulin, we investigated the action of 35 mM KCl on the activity of the PI3-K in β (INS-1)-cells. KCl did not change PI3-K activity even if it is well known to induce insulin secretion at this concentration (data not shown, n=4). Furthermore, we measured PI3-K activity in the presence of the L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine (100 nM) in order to block insulin secretion. The effects of both glucose and GLP-1 singly or combined were preserved in the presence of the pharmacological agent (data not shown). These results suggest that GLP-1 and glucose mediated effects on PI3-K and β -cell proliferation are not due to a paracrine signaling pathway implicating insulin.

GLP-1 increases PDX-1 DNA binding activity and synergizes with glucose to induce AP-1 DNA binding activity. PDX-1 is an important β -cell specific transcription factor regulating the development of the endocrine pancreas [14] as well as a number of β -cell genes including insulin, glucokinase and the glucose transporter GLUT2 [26,27]. We therefore wished to examine the possible action of GLP-1 on the activity of this transcription factor. DNA retardation assay was carried out using a double-stranded

30-mer oligonucleotide probe corresponding to a sequence within the human insulin gene enhancer region containing a PDX-1 binding site [20] (Fig.4A). The quantification of 5 separated experiments is shown in panel C. It is apparent that GLP-1 promotes an increase in PDX-1 DNA binding activity at both 3 and 11 mM glucose.

Previous work from our laboratory [5] indicated that both glucose (at the intermediate concentration of 11 mM) and GLP-1 synergize to induce the expression level of a number of immediate early response genes (IEG) and oncogenes like *c-fos*, *c-jun* and *junB* implicated in cell growth control and differentiation. We therefore aimed at determining whether the activity of the transcription factors AP-1 which consists of dimers of FOS, JUN and ATF proteins correlates with the induction of these IEG and/or cell growth measurements.

Fig.4B shows the DNA binding activity of AP-1 in a representative experiment as examined in a DNA retardation assay. Panel C shows the quantification of 4 different experiments. It is apparent that glucose at 11 mM and GLP-1 alone did not significantly modify AP-1 DNA binding activity. However glucose and GLP-1 synergize to increase the DNA binding activity of AP-1. The data indicates that AP-1 DNA binding activity in the presence of GLP-1 does not correlate with either PI3-K activity or cell growth measurements.

To investigate whether GLP-1 modulation of PDX-1 DNA binding activity involves a PI3-K mediated event, INS-1 cells were incubated in the presence or absence of the PI3-K inhibitor LY294002 (Fig.5). At this concentration, LY294002 is known to inhibit growth factor-stimulated PI3-K in various cell types [28]. The results indicate that the PI3-K inhibitor suppresses the GLP-1 induced activation of PDX-1 DNA binding activity at both 3 and 11 mM glucose.

GLP-1 increases PDX-1 and insulin mRNA levels in INS-1 cells. Fig.6 shows that GLP-1 causes an accumulation of the insulin and PDX-1 transcripts. This result correlates with the activity of the PDX-1 transcription factor as assayed by DNA retardation assay (Fig.4A). As reported before in rat islets [29] GLP-1 also increases

at 3 mM glucose GLUT2 and glucokinase mRNA expression by about 2 fold (data not shown, observed in 4 separated experiments).

GLP-1 promotes tritiated thymidine incorporation in isolated rat islets. We next investigated whether the cell proliferation results obtained with the INS-1 cell line are applicable in a normal islet tissue. Fig.7 shows that GLP-1 promotes a significant 40% increase in tritiated thymidine incorporation into DNA. Growth hormone, which is known to be a potent growth factor for the β -cell [30], increased DNA synthesis by 80%.

Discussion

In the present study, we provide evidence that GLP-1, a potent glucocretin hormone and a potentially important drug in the treatment of diabetes [9,10], acts as a growth factor in the β (INS-1)-cell line as well as in isolated rat islet tissue. A β -cell growth promoting action of GLP-1 in addition to its insulinotropic action reinforces the view of its usefulness as a therapeutic agent in the treatment of diabetes. However, it should be stated that unlike secretion, the action of GLP-1 on DNA synthesis occurs at low glucose only, is not glucose dependent and does not increase with increasing glucose concentrations. This is different feature than the action of IGF-1 which is glucose dependent [31]. Thus, it might be speculated that GLP-1 is a growth factor under basal conditions and may be important in early obesity where the β -cell mass expends to compensate insulin resistance. With respect to the diabetic state, GLP-1 might act as a growth factor during times when circulating glucose concentration has returned close to basal value following insulin or sulfonylurea treatment.

PI3-K mediates nuclear activity via phosphorylation cascades leading to the activation of transcription factors [12,32,33]. It was found that glucose and GLP-1 alone do not significantly modify AP-1 DNA binding activity. However, they synergize to induce AP-1 DNA binding activity as they do for the induction of several IEGs [5]. This indicates that the activity of AP-1 is not essential to the proliferative action of GLP-1. Possibly, an increase in AP-1 activity may be related to other functions which have been implicated for this transcription factor such as differentiation and apoptosis [34]. To examine the possibility that another important candidate transcription factor (i.e. PDX-1) is implicated in the action of GLP-1 on DNA synthesis, we investigated PDX-1 DNA binding activity in the presence of GLP-1. It was found that GLP-1 causes an increase in PDX-1 DNA binding activity at 3 or 11 mM glucose. Moreover, the PI3-K inhibitor LY294002 suppressed the GLP-1 induced PDX-1 DNA binding activity and DNA synthesis, providing pharmacological evidence of the implication of PI3-K in the GLP-1 induced PDX-1 response and DNA synthesis.

The cAMP analog, chlorophenylthio-cAMP (0.5 mM), was able to induce both PI3-K and PDX-1 DNA binding activity (data not shown, n=3 for each). In addition, high KCl and the Ca²⁺ channel blocker nifedipine did not change the PI3-K activity. Since GLP-1 has been documented to cause a rise in both cAMP and Ca²⁺ in the β -cell [2,35], these results indicate that activation of the cAMP transduction system only and not Ca²⁺ is likely implicated in the reported action of GLP-1 on PI3-K, PDX-1 and β cell proliferation. The activation of PI3-K by GLP-1 via a mechanism not involving calcium or the insulin receptor is intriguing. It may be speculated that the trimeric G-protein activated by GLP-1 directly interacts with PI3-K or that the cAMP/PKA transduction system alters the phosphorylation state of the kinase resulting in enhanced enzymatic activity. Alternatively, GLP-1 induced glycogen breakdown might result in enhanced glycolysis causing indirectly PI3-K activation. Thus, glucose itself, through its metabolism, activates PI3-K [12]. The latter possibility is compatible with the observation that the actions of GLP-1 and glucose on PI3-K and INS cell proliferation are not additive. The precise way by which GLP-1 and cAMP cause PI3-K and PDX-1 activation remain to be established.

Our work may also be related to the observations made by Withers et al. [36] on IRS-2 knocked-out mice. It is apparent that mice with disruption of IRS-2 display reduced β -cell mass and an attenuation of glucose-induced insulin release. Knowing that PI3-K is a direct downstream target of IRS-1/2, it is likely, as suggested by our data, that a possible decreased PI3-K activation by this signaling pathway in response to GLP-1 and other growth factors should result in a reduced β -cell growth, metabolic enzyme gene expression and insulin biosynthesis.

In conclusion, our results indicate that GLP-1 at physiological concentrations increases INS-1 cell DNA synthesis non-additively with glucose by a mechanism which appears to implicate PI3-K activation. GLP-1 increases the expression level of PDX-1 mRNA and activates the transcription factor PDX-1 non additively with glucose as assessed by its DNA binding activity. The possibility exists that an increase in PDX-1 DNA binding activity promoted by GLP-1 involving a PI3-K

mediated event may play a role in the pleiotropic effects (DNA synthesis, metabolic enzyme gene expression, insulin biosynthesis) of the glucocorticoid.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada, the Canadian Diabetes Association, the Cancer Research Society of Montreal, the Juvenile Diabetes Foundation (#197047) and the Swiss National Science Foundation (#3200-050879.97/1). R.R. is supported by a Swiss National Science Foundation Fellowship. M.P. is a Medical Research Council of Canada Scientist. We thank Dr W. Schlegel for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

References

- 1 Drucker DJ (1998) Glucagon-like peptides. *Diabetes* 47: 159-169
- 2 Widmann C, Burki E, Dolci W, Thorens B (1994) Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of beta cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1029-1035
- 3 Fehmann HC, Goke R, Goke B (1995) Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev* 16: 390-410
- 4 Holz GG, Kuhlreiber WM, Habener JF (1993) Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37). *Nature* 361: 362-365
- 5 Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W (1998) Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta (INS-1) cells. *FASEB J* 12: 1173-1182
- 6 Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S (1992) Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus [see comments]. *N Engl J Med* 326: 1316-1322
- 7 Fehmann HC, Habener JF (1992) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-166
- 8 Sjöholm A (1996) Diabetes mellitus and impaired pancreatic beta-cell proliferation. *J Intern Med* 239: 211-220
- 9 Hugl SR, White MF, Rhodes CJ (1998) Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic

- activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem* 273: 17771-17779
- 10 Schuppin GT, Pons S, Hugl S, et al (1998) A specific increased expression of insulin receptor substrate 2 in pancreatic beta-cell lines is involved in mediating serum-stimulated beta-cell growth. *Diabetes* 47: 1074-1085
 - 11 Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272
 - 12 Macfarlane WM, Smith SB, James RF, et al (1997) The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 272: 20936-20944
 - 13 Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17: 138-139 (Letter)
 - 14 Oster A, Jensen J, Serup P, et al (1998) Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *J Histochem Cytochem* 46: 707-715
 - 15 Tanigawa K, Xu G, Nakamura S, Tamura K, Kawaguchi M (1996) Pancreatic B-cell replication in an animal model of insulin-resistant non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pancreas* 13: 326-327 (Letter)
 - 16 Asfari M, Janjic D, Meda P, et al (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-178
 - 17 Gotoh M, Maki T, Satomi S, et al (1987) Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43: 725-730

- 18 Strauss PR, Sheehan JM, Kashket ER (1977) Membrane transport by murine lymphocytes. II. The appearance of thymidine transport in cells from concanavalin A-stimulated mice. *J Immunol* 118: 1328-1334
- 19 Han JH, Beutler B, Huez G (1991) Complex regulation of tumor necrosis factor mRNA turnover in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1090: 22-28
- 20 Macfarlane WM, Read ML, Gilligan M, Bujalska I, Docherty K (1994) Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem J* 303: 625-631
- 21 Ausserer WA, Bourrat-Floeck B, Green CJ, Laderoute KR, Sutherland RM (1994) Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol Cell Biol* 14: 5032-5042
- 22 Fried M, Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 9: 6505-6525
- 23 Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, et al (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77
- 24 Velloso LA, Carneiro EM, Crepaldi SC, Boschero AC, Saad MJ (1995) Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. *FEBS Lett* 377: 353-357
- 25 Xu GG, Rothenberg PL (1998) Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes* 47:1243-1252.
- 26 Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, et al (1996) PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 45:1826-1831.

- 27 Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C (1996) Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 10:1327-1334.
- 28 Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248.
- 29 Wang Y, Perfetti R, Greig NH, et al (1997) Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest* 99:2883-2889.
- 30 Bonner-Weir S, Smith FE (1994) Islet Cell Growth and the Growth Factors Involved. *Trends Endocrinol Metab* 5:60-64.
- 31 Tateishi K, Funakoshi A, Misumi Y, Matsuoka Y (1998) Jun and MAP kinases are activated by cholecystokinin in the pancreatic carcinoma cell line KP-1N. *Pancreas* 16:499-504.
- 32 Wang Y, Falasca M, Schlessinger J, et al (1998) Activation of the c-fos serum response element by phosphatidyl inositol 3-kinase and rho pathways in HeLa cells. *Cell Growth Differ* 9:513-522.
- 33 Montmayeur JP, Valius M, Vandenhede J, Kazlauskas A (1997) The platelet-derived growth factor beta receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs. *J Biol Chem* 272:32670-32678.
- 34 Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246.
- 35 Gromada J, Bokvist K, Ding WG, et al (1998) Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic beta-cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 47:57-65.

- 36 Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-904.

FIGURES

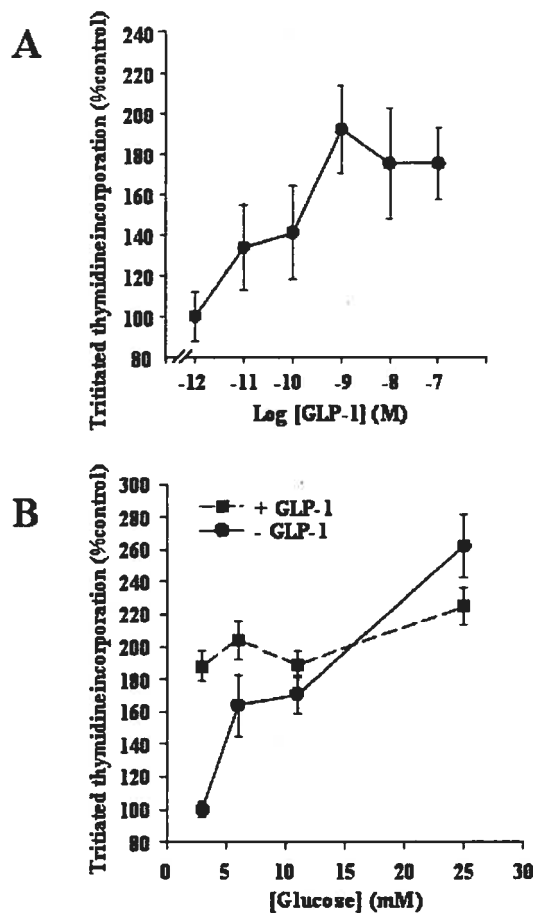


Fig. 1. Effects of GLP-1 and glucose on DNA synthesis in INS-1 cells. DNA synthesis was determined by tritiated thymidine incorporation. Dose-response characteristics for the effects of GLP-1 at 6 mM glucose (A) or dose-response characteristics for the effects of glucose in presence or absence of 10 nM GLP-1 (B) are shown. Cells were cultured for 24 h in serum free RPMI medium containing 0.1% BSA and different concentrations of glucose in the presence or absence of GLP-1. 1 μ Ci/well of tritiated thymidine was added during the final 4 h of the 24 h incubation period. Data represent means \pm SE of 4 (A) or 3 (B) experiments (each comprising 3 to 4 wells).

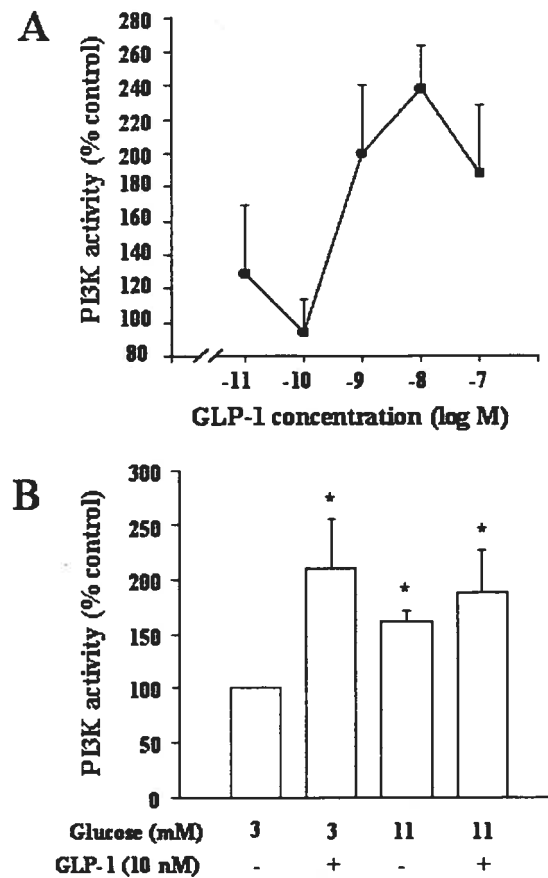


Fig. 2. GLP-1 and glucose stimulate PI3-K activity in INS-1 cells in a non-additive manner. A, Cells were incubated in 6mM glucose KRB medium with different concentrations of GLP-1 for 5 min. PI3-K was assayed as described in “Materials and Methods”. Data represent means \pm SE of 3 experiments.

B, Cells were incubated at different concentrations of glucose (3 mM or 11 mM) in the presence or absence of 10 nM GLP-1. Proteins were extracted after 5 min to perform the assay. Means \pm SE of 3 experiments. *, $p < 0.05$.

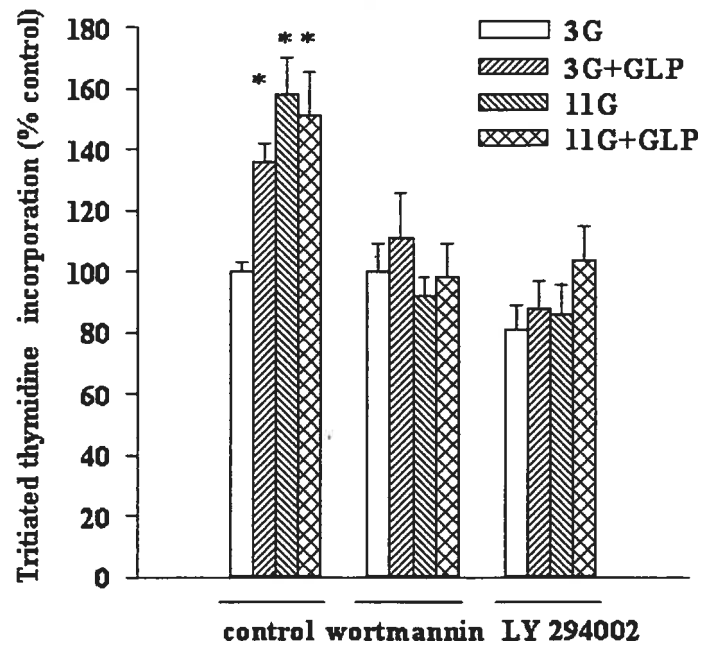


Fig. 3. LY 294002 and wortmannin inhibit GLP-1 and glucose induced DNA synthesis in INS-1 cells. Cells were cultured for 24 h in serum free RPMI medium as described in figure 1 in the presence or absence of the PI3-K inhibitors LY-294002 (50 μ M) or wortmannin (50 nM). During the last 4 h of the 24 h incubation period, 1 μ Ci of tritiated thymidine was added in each well. The data represent the mean values \pm SE obtained from 4 experiments (each comprising 4 wells). *, $p < 0.005$

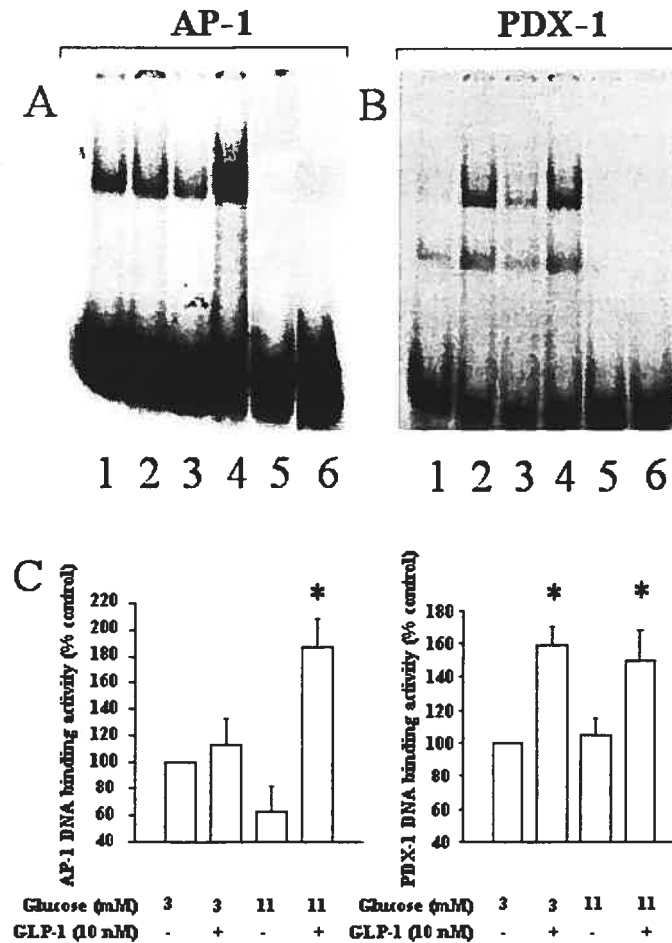


Fig. 4. Effects of GLP-1 and glucose on PDX-1 and AP-1 DNA binding activity. A, representative DNA retardation assay performed with nuclear extracts of INS-1 cells cultured for 2 h at 3 or 11 mM glucose in KRB medium in the presence or absence of 10 nM GLP-1. A probe containing a consensus PDX-1 responsive element was used to assess PDX-1 DNA binding activity (top band)[20]. B, the same experiment as in A was carried out using a probe containing an AP-1 binding site. Lane 1, 3 mM glucose; lane 2, 3 mM glucose and 10 nM GLP-1; lane 3, 11 mM glucose; lane 4, 11 mM glucose and 10 mM GLP-1; lane 5, no cell extract added; lane 6, replicate of lane 4 with a 100 fold excess of cold probe. C, quantification of the DNA retardation assays is shown. Data represent the means \pm SE of 5 experiments for PDX-1 (left panel) and 4 experiments for AP-1 (right panel). *, $p < 0.05$.

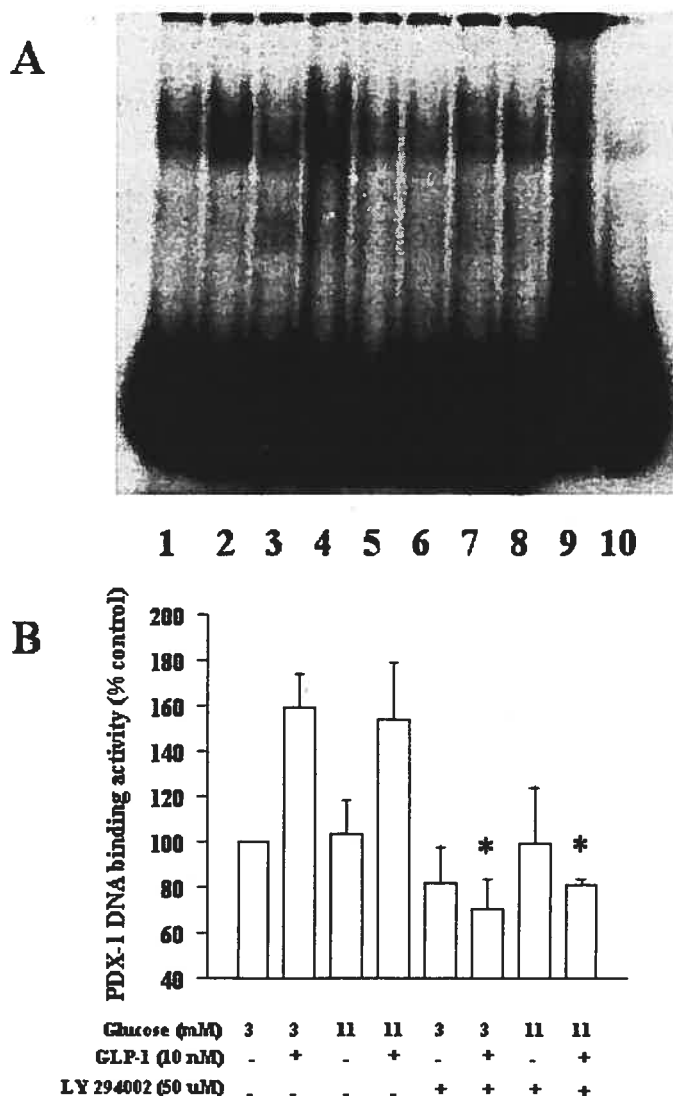


Fig. 5. The PI3-K inhibitor, LY 294002, inhibits GLP-1 modulation of PDX-1 DNA binding activity in INS-1 cells. A, representative DNA retardation assay performed on nuclear extracts of INS-1 cells cultured as in figure 4 with or without 50 μ M LY-294002. Lane 1, 3 mM glucose; lane 2, 3 mM glucose and 10 nM GLP-1; lane 3, 11 mM glucose; lane 4, 11 mM glucose and 10 mM GLP-1; lane 5-6-7-8, same as lanes 1 to 4 but in the presence of the inhibitor; lane 9, no cell extract added; lane 10, replicate of lane 4 with a 100 fold excess of cold probe. B, quantification of 3 different DNA retardation assays for PDX-1 is shown. Error bars indicate the SE. *, $p < 0.05$ versus the control situation plus GLP-1 without the inhibitor.

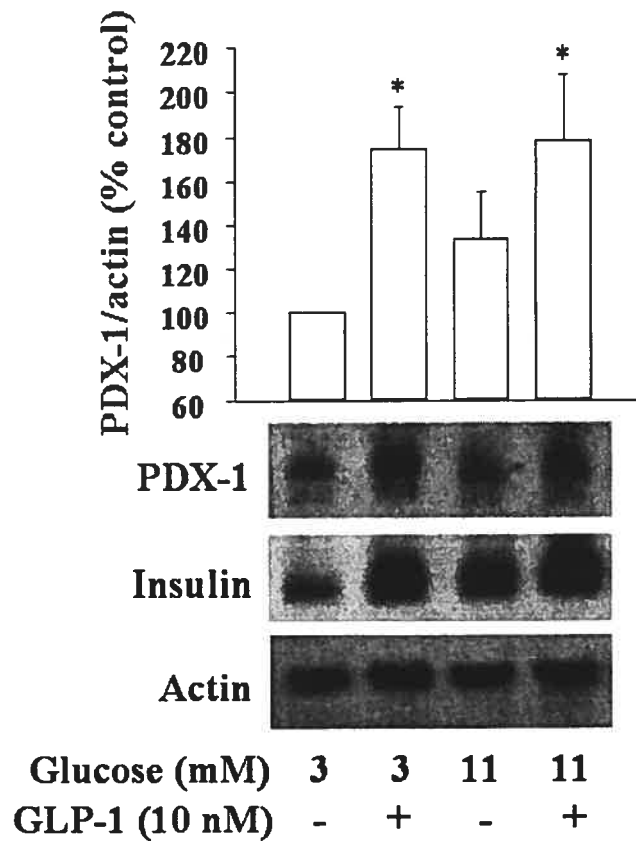


Fig. 6. Effect of GLP-1 on the expression of PDX-1 and insulin mRNAs. Representative results from Northern blot are shown. INS-1 cells were treated for 3 h in RPMI serum-free medium in the presence of glucose (3 mM or 11 mM) with or without 10 nM GLP-1. Similar results were obtained in a second experiment for insulin. Means \pm SE of 3 experiments for PDX-1. *, $p < 0.05$.

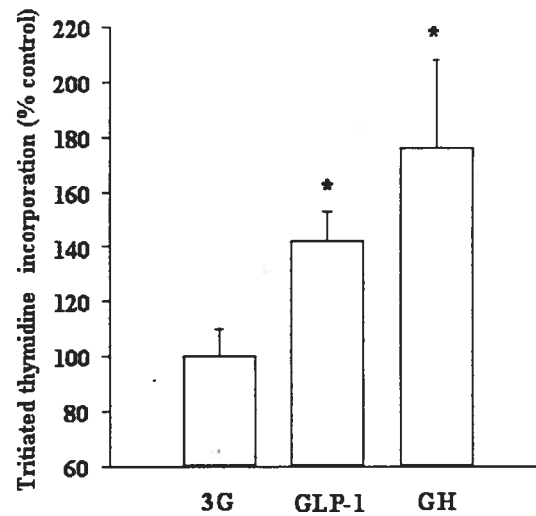


Fig. 7. Effects of GLP-1 and growth hormone on isolated rat pancreatic islets tritiated thymidine incorporation. Cells were incubated at 3mM glucose in the absence (3G) or in the presence of 10 nM GLP-1 or 100 nM growth hormone (GH) for 24 h. Then, 6 μ Ci/well of tritiated thymidine were added and cells further incubated for 6 h. Data represent the means \pm SE of 12 (3G, GLP-1) and 6 experiments (GH). *, $p < 0.05$.

Protein Kinase C ζ Activation Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Induced Pancreatic β -Cell Proliferation

Jean Buteau, Sylvain Foisy, Christopher J. Rhodes, Lee Carpenter, Trevor J. Biden, and Marc Prentki

From the Molecular Nutrition Unit (J.B., S.F., M.P.), Department of Nutrition, University of Montreal, the Centre de Recherche du CHUM and Institut du Cancer, Montreal, Quebec, Canada; the Pacific Northwest Research Institute & Department of Pharmacology (C.J.R.), University of Washington, Seattle, Washington, USA; and the Garvan Institute of Medical Research (L.C., T.J.B.), Darlinghurst, New South Wales, Australia.

Nous avons démontré précédemment que le GLP-1 augmente la prolifération de la cellule β via l'activation de la PI-3K. Au cours de la présente étude, nous avons tenté d'identifier les voies de signalisation en aval de la PI-3K pouvant participer à la transduction du signal prolifératif induit par le GLP-1.

Nos résultats démontrent que le GLP-1 active les voies de signalisation ERK 1/2, p38 MAPK, PKB et PKC ζ , des cibles de la PI-3K déjà reconnues pour participer à des événements prolifératifs. Nos résultats, obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et d'adénovirus recombinants, indiquent que l'effet prolifératif du GLP-1 implique la PKC ζ .

Plusieurs groupes de recherche tentent d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'effet pléiotropique du GLP-1 d'une manière indépendante de la voie AMPc/PKA. Nous montrons ici que le GLP-1 active diverses voies de signalisation pouvant participer à une variété d'effets biologiques. En plus de démontrer l'implication de la PKC ζ dans l'effet prolifératif du GLP-1, notre étude ouvre la voie sur de nouvelles actions biologiques de l'hormone gluco-incréatine.

Contribution des coauteurs :

S. Foisy : Participation aux études d'imagerie par microscopie confocale et à l'isolation des îlots de rats

C.J. Rhodes, L. Carpenter et T.J. Biden : Préparation et purification des adénovirus

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; ERK, extracellular signal-related kinases; GLP-1, glucagon-like peptide-1; KRBH, Krebs-Ringer bicarbonate HEPES medium; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogenic-extracellular signal-regulated kinase; MOI, multiplicity of infection; mTOR, mammalian target of rapamycin; NF κ B, nuclear-factor κ B; PBS, phosphate buffered saline; PDK, phosphoinositide-dependent kinases; PDX-1, pancreatic and duodenal homeobox gene-1; PI-3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.

SUMMARY

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), an insulinotropic and glucoincretin hormone, is a potentially important therapeutic agent in the treatment of diabetes. We previously provided evidence that GLP-1 induces pancreatic β -cell growth non additively with glucose in a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent manner. In the present study, we investigated the downstream effectors of phosphatidylinositol-3 kinase to determine the precise signal transduction pathways mediating the action of GLP-1 on β -cell proliferation. GLP-1 increased extracellular signal-related kinase 1/2, p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase B activities non additively with glucose in pancreatic β (INS 832/13) cells. GLP-1 also caused nuclear translocation of the atypical protein kinase C (PKC) ζ isoform in INS as well as in dissociated normal rat β -cells as shown by immunolocalization and Western immunoblotting analysis. Tritiated thymidine incorporation measurements showed that the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 suppressed GLP-1-induced β -cell proliferation. Further investigation was performed using isoform-specific pseudo-substrates of classical (α , β and γ) or ζ atypical PKC isoforms. The PKC ζ pseudo-substrate suppressed the proliferative action of GLP-1 while the inhibitor of classical PKC isoforms had no effect. Overexpression of a kinase-dead PKC ζ acting as a dominant negative protein suppressed GLP-1 induced proliferation. In addition, ectopic expression of a constitutively active PKC ζ mutant stimulated tritiated thymidine incorporation to the same extent as GLP-1 and the glucoincretin had no growth promoting action under this condition. The data indicate that GLP-1-induced activation of PKC ζ is implicated in the β -cell proliferative signal of the insulinotropic hormone. The results are consistent with a model in which GLP-1-induced PI-3K activation results in PKC ζ translocation to the nucleus which may play a role in the pleiotropic effects (DNA synthesis, metabolic enzymes and insulin gene expression) of the glucoincretin.

INTRODUCTION

Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide (GLP-1), a potent glucocretin hormone (1,2), is secreted by the intestinal L-cells in response to fat meals and carbohydrates (3,4). It is a potentially important drug in the treatment of diabetes in view of its ability to improve insulin secretion in both subjects with impaired glucose tolerance and Type II diabetes mellitus (5,6). GLP-1 is also an insulinotropic agent through its ability to stimulate insulin gene expression and proinsulin biosynthesis (7) and acts as a potent β -cell growth factor (8). GLP-1 increases the expression level of the β -cell specific transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) (8,9). In addition, the glucocretin increases β -cell proliferation non-additively with glucose in a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)-dependent manner in β (INS-1) cells (8) as well as islet mass in mouse pancreas (9). However, the precise signal transduction pathway mediating the proliferative action of GLP-1 is not completely elucidated.

PI-3K is a family of proteins known to be activated in response to various growth factors in different cell types (10). Many downstream effectors of PI-3K mediate proliferative signals. Extracellular signal-related kinases (ERK) 1 /2 and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) are in some instances downstream targets of PI-3K (11) mediating the proliferative response of a variety of external signals (12). ERK 1 /2 and p38 MAPK also promote cell growth by being involved in anti-apoptotic processes (13). Glucose activates p38 MAPK in pancreatic β -cell, an action that may be causally implicated in insulin gene induction by the sugar via phosphorylation of the transcription factor PDX-1 (14). However, the involvement of p38 in PDX-1 activation has recently been challenged (15). Among other downstream effectors of PI-3K are phosphoinositide-dependent kinases (PDK) which in turn activate protein kinase B (PKB) (also named Akt) (16). PKB participates in proliferative signals in response to many stimuli in different cell types possibly via the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and p70s6kinase (17). Other targets of PDK that could play a role in cell-growth regulation include the atypical isoform ζ of protein kinase C (PKC) (18,19). PKC is a multigene family

divided into three classes depending on their cofactor requirements : classical PKCs (cPKCs) that are sensitive to calcium/diacylglycerol and tumor promoting phorbol esters; novel PKCs (nPKCs) that are sensitive to diacylglycerol and tumor promoting phorbol esters only; and atypical PKCs (aPKCs) that are insensitive to all three regulators (20).

We report here that GLP-1 increases the PI-3K downstream targets ERK1/2, p38 MAPK and PKB activities non-additively with glucose in INS(832/13) cells. GLP-1 also causes PKC ζ nuclear translocation. However, only PKC ζ and p38 MAPK are likely involved in GLP-1-induced proliferation as revealed by tritiated thymidine incorporation measurements in the presence of specific inhibitors. The implication of the aPKC isoform ζ in the proliferative action of GLP-1 is demonstrated using recombinant adenoviruses allowing expression of various PKC ζ constructs.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Reagents. Pharmacological inhibitors (SB203580, PD98059, LY294002, KN-93, myristoylated PKC ζ and cPKC (20-28) peptide inhibitors), were purchased from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Human glucagon-like peptide-1 fragment 7-36 amide was obtained from Sigma (St-Louis, MO). The anti PKC ζ antibody was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). The anti insulin antibody was from Sigma (Saint Louis, MS). RPMI 1640 and the supplements including fetal calf serum were purchased from Gibco BRL (Burlington, ONT). Methyl [^3H]-thymidine was from ICN (Costa Mesa, CA).

Cell Culture and Incubation. INS(832/13) (21) cells (passages 36-70) were grown in monolayer cultures as described previously (22) in regular RPMI-1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 μM β -mercaptoethanol, 100 IU/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified (5% CO_2 , 95% air) atmosphere. This clone (832/13) of INS-1 cell was used because it shows better differentiation characteristics in term of glucose-stimulated insulin secretion than the original INS-1 cells (21). When cells reached 80% confluence after approximately 7 days they were washed with phosphate buffered saline (PBS) and preincubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min in a Krebs-Ringer bicarbonate medium containing 1mM CaCl_2 , 5mM NaHCO_3 , 25 mM HEPES (pH 7.4) (KRBH) supplemented with 3 mM glucose and 0.1% defatted bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Fraction V). Cells were then washed with PBS and incubated for the indicated times in the same supplemented KRBH medium containing the substances to be tested.

In Vitro Kinase Assays. *In vitro* kinase activities were evaluated using MAPK (ERK 1 /2), p38 MAPK and PKB/Akt kinase assay kits from New England Biolab (Beverly, MA) according to manufacturer's protocol. In brief, cells cultured as described above were homogenized in lysis buffer (1% SDS, 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol). The different kinases (ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB/Akt) were then immunoprecipitated from 200 μg of cell lysate and resuspended in 40 μl of kinase buffer (25 mM Tris (pH 7.5), 5 mM β -glycerolphosphate, 2 mM dithiotreitol

(DTT), 0.1 mM sodium-orthovanadate and 10 mM $MgCl_2$) supplemented with 200 μM ATP. Specific substrates (respectively Elk-1, ATF-2 and GSK3 α for ERK1 /2, p38 MAPK and PKB) were added and the reactions were stopped after 30 min by adding SDS sample buffer containing 62.5 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, and 0.1% bromophenol blue. 20 μl of samples were loaded on SDS-PAGE gels for Western immunoblottings. Substrates phosphorylation was detected by incubation of the membranes with phospho-specific antibodies.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy. INS-cells were cultured overnight on polyornithine-coated coverslips and stimulated as described in the legend to Fig. 2. After washing with PBS, the cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde/PBS for 15 min at room temperature before incubation for 5 min with 0.1 M glycine/PBS and permeabilization with 0.2% Triton X-100 in PBS for 2 min. For immunofluorescence, cells were blocked with 1% BSA/PBS for 10 min, incubated with a PKC ζ primary antibodies at 10 $\mu g/ml$ for 1 h, washed 3 times with PBS, stained with a goat anti-rabbit fluorescein secondary antibody (PierceRockford, IL) for 1 h, and washed three times with PBS. Image acquisition was performed using a LSM-410 confocal microscope (Carl Zeiss).

Rat islets were isolated from 200 g Wistar rats as described before (23) and trypsinized in order to obtain dissociated islet cells (24). Dissociated islet cells (corresponding to 100 islets per condition) were seeded on polyornithine-coated coverslips in 6-well plates and cultured in regular RPMI for 24 h. Cells were then washed with PBS, incubated in the absence and presence of GLP-1, and subsequently fixed as described above for INS cells. For immunofluorescence, cells were blocked with 1% BSA/PBS for 10 min, incubated for 1h with both a polyclonal PKC ζ (10 $\mu g/ml$) and a monoclonal mouse anti-insulin (10 $\mu g/ml$) primary antibodies, washed 3 times with PBS, next incubated for 1h with both a goat anti-rabbit fluorescein secondary antibody (PierceRockford, IL) and a rhodamin-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (Jackson Immunoresearch, PA), and finally washed three times with PBS. Image acquisition was performed using a LSM-410 confocal microscope (Carl Zeiss).

Preparation of Nuclear Extracts and Immunoblot Analysis of PKC ζ . Nuclear extracts were isolated using a published procedure (25). Briefly, cells (40×10^6 per condition) previously grown in 225 cm^2 petri dishes were harvested with a rubber policeman in cold PBS, sedimented at $3'500g$ for 4 min and lysed in 1 ml of ice-cold buffer A (15 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5% Nonidet P-40). After a 10 min incubation on ice, nuclei were collected by centrifugation ($1000 \times g$ for 5 min) and washed with buffer A without Nonidet P-40. Nuclei were lysed in a buffer containing 2 mM KCl, 25 mM HEPES (pH 7.4), 0.1% EDTA and 1 mM DTT. After a 15 min incubation period on ice, a dialysis buffer (25 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM DTT, 0.1% PMSF, $2 \mu\text{g/ml}$ aprotinin, 0.1 mM EDTA, and 11% glycerol) was added to the nuclei preparations. Samples were centrifuged ($16'000 \times g$, 20 min) and the supernatants containing the nuclear proteins were used for protein determinations, subsequently aliquoted ($50 \mu\text{l}$) and kept frozen at -70°C for subsequent immunoblot analysis. Lysates were subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.). Membranes were probed with a PKC ζ primary antibody and subsequently with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG. Signals were visualized by chemiluminescence, using ECL reagent (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England).

Tritiated Thymidine Incorporation Assay. A previously described procedure was used (8,26). In brief, INS-1 cells were seeded 2 days prior use in 96-well plates (8×10^4 cells per well) and cultured in regular RPMI medium as described above. Cells were then washed with PBS and preincubated for a period of 24 h in minimal RPMI medium i.e. without serum and glucose but with 0,1% BSA. They were then incubated for 24 h in minimal RPMI medium with various test substances. Proliferation was determined by incorporation of [^3H]-thymidine ($1 \mu\text{Ci/well}$) during the final 4 h of the 24 h incubation period. Cells were then harvested with a PHD cell harvester from Cambridge technology (Watertown, MA) and the radioactivity retained on the dried glass fiber filters was measured.

Adenoviruses Constructs. PKC ζ cDNA was a kind gift from H. Mischak, laboratory of Genetics, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland. Dominant negative kinase defective PKC ζ (DN) was generated by PCR mutagenesis using the pAlter system (Promega, Madison, WI) to give a K281W substitution within the ATP-binding site. This mutation results in a dominant negative mutant of PKC ζ which has been shown to inhibit PKC ζ stimulated nuclear-factor κ B (NF κ B) reporter gene activity in NIH 3T3 fibroblasts (27) and PKC ζ -dependent mitogenic activity in oocytes and fibroblasts (28,29). An adenoviral shuttle plasmid (pXCMV) was generated by subcloning the NruI/DraIII digested and blunted expression cassette from pRcCMV (Invitrogen, Carlsbad, CA) into XbaI digested and blunted pXCX3 (pXCX3 was derived from pXCX2). The PKC ζ constructs (wild type (WT), DN and CA) were then sub-cloned into the EcoRV site of pXCMV. Recombinant adenoviruses were prepared essentially as described by Graham and Prevec (30). Caesium chloride purified plasmids containing the pXCMV PKC ζ gene cassettes were co-transfected with pJM17 (a circular form of the adenovirus genome) in HEK 293 cells at a ratio of 1:1 using calcium phosphate. Control virus MX17 which does not contain a gene cassette was constructed by recombination between pXCX2 and pJM17. Once transfected, the HEK 293 cells were maintained in 0.5% agarose and 1X culture medium. Recombinant viruses were isolated 1-2 weeks later as single plaques and amplified by re-infecting confluent monolayers of HEK 293 cells. Recombinant viruses were prepared from lysates of cytopathic cells 3-7 days after the second round of infection. Medium from the 35mm dish was used in further rounds of amplification to generate viral stocks which were purified by CsCl gradient. Plaque assays were performed in HEK 293 cells to determine the titer (pfu/ml) of these stocks which were then used to infect INS(832/13) cells at the designated multiplicity of infection (MOI). Constitutively active PKC ζ (CA) was generated as described before (31) by a A119E mutation in the pseudosubstrate site of PKC, a substitution which frees the catalytic region from the inhibitory constraint of being bound to the regulatory region.

Infections. INS(832/13) cells were seeded 2 days prior use in 6-well plates (4×10^6 cells per well) and cultured in regular RPMI medium as described above. Cells were then incubated with different PKC ζ adenoviral constructions at a MOI of 10 pfu/cell for 5 h in 0.5 ml of complete RPMI medium. 1.5 ml of fresh RPMI medium was then added to each well still containing 0.5 ml of media with viruses. 7 h later, cells were trypsinized and plated in 96-well plates as described above to perform a tritiated thymidine incorporation assay after a 24 h incubation in the absence or presence of GLP-1.

Calculations and Statistics. Data are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with the SPSS for Windows system. Differences between two conditions were assessed with Student's *t*-test for related samples. Differences were deemed to be significant when *p* was less than 0.05.

RESULTS

Activation of Signal Transduction Pathways Downstream of PI-3K by GLP-1.

ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB are three potential downstream effectors of PI-3K. We wished to determine whether their activities in the presence of GLP-1 correlate with cell growth measurements as evaluated with the tritiated thymidine incorporation assay. *In vitro* ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB activities were studied after 1 h incubation of INS(832/13) cells at 3 mM or 11 mM glucose with or without 10 nM GLP-1 (Fig. 1). The results indicate that GLP-1 at a maximal effective concentration of 10 nM caused activation of ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB at low (3mM) glucose. Elevated (11mM) glucose also increased the activity of the same kinases. The action of GLP-1 and glucose were not additive. GLP-1 caused a rise in tritiated thymidine incorporation in INS(832/13) cells to an extent similar to that of 11 mM glucose and the actions of both agents were not additive. The threshold half maximal and maximal concentrations of GLP-1 at 3 mM glucose on PKB activation were respectively 0.01 nM and 10 nM (data not shown). These values were similar to that obtained for INS(32/13) cell proliferation (data not shown). Overall, the results indicate that both GLP-1 and glucose activate ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB and that the action of GLP-1 on the activation of these signaling pathways correlate with the proliferative response of the glucocretin.

GLP-1 Induces PKC ζ Nuclear Translocation. PKC ζ , an atypical isoform of PKC, is an additional downstream target of both PI-3K and PDK (19,32). It is translocated from the cytoplasm to the nucleus following its activation by various stimuli (32). We therefore, investigated whether GLP-1 causes nuclear translocation of PKC ζ in INS(832/13) cells as well as in dissociated normal rat β -cells. Fig 2 shows that a 5 min exposure of INS cells to 10 nM GLP-1 caused PKC ζ translocation to the nucleus as observed by confocal microscopy in association with immunofluorescence (top 2 panels). Interestingly, GLP-1 caused a change in cell shape of INS cells which appeared less flat and rounder than controls. PKC ζ nuclear translocation was also observed in dissociated rat β -cells (identified by insulin staining) after a 2 min treatment with 10 nM GLP-1 (Fig 2, lower 4 panels). Fig 3 shows a time-dependent

increase in PKC ζ immunoreactivity in nuclear fractions of INS-cells, with a maximal effect observed at 5 min and a return to basal value after a 30 min incubation period. Consistent with a causal implication of PI-3K in PKC ζ activation by GLP-1, the PI-3K inhibitor LY294002 (50 μ M) suppressed the GLP-1-induced PKC ζ nuclear translocation (data not shown).

Specific Inhibitors for PKC ζ and p38 MAPK Suppress GLP-1-Induced β -Cell Proliferation. To obtain further insight into the signal transduction pathways implicated in the proliferative action of GLP-1, we used specific inhibitors for different kinases known to mediate cell proliferation in response to diverse stimuli. The inhibitors were tested at concentrations at which they are known to be effective without displaying major cytotoxicity in a variety of cell systems (33). Cellular proliferation was evaluated with the tritiated thymidine assay, as described before in INS cells (8,26). Fig. 3 shows that the calmodulin-dependent kinase II inhibitor, KN-93, and the mitogenic-extracellular signal-regulated kinase (MEK) inhibitor, PD98059, did not affect significantly GLP-1 induced proliferation suggesting that calmodulin-dependent kinase II and ERK1 /2 are not involved in the β -cell growth effect of the glucocoincretin. The p38 MAPK inhibitor, SB203580 suppressed GLP-1-induced proliferation while strongly affecting basal thymidine incorporation as well. Further investigation was performed using isoform-specific pseudo-substrates to inhibit classical (α , β and γ) or the ζ atypical isoforms of PKC. The PKC ζ pseudo-substrate blocked GLP-1-induced INS(832/13)-cell proliferation while the inhibitor of classical PKC enzymes did not. The p38 MAPK, PKC ζ and cPKC inhibitors reduced proliferation observed at basal glucose in the absence of GLP-1 (Fig. 3). However, no apparent cytotoxicity was observed as evaluated by morphological examination of the cells under the microscope. Although we cannot exclude some cytotoxicity, we rather favor the view that the corresponding pathways are involved in cell proliferation under non stimulated conditions. These observations provide pharmacological evidence for the implication of both PKC ζ and p38 MAPK in the cell growth promoting action of GLP-1. Since pseudosubstrate peptides are highly specific enzyme inhibitors, the pharmacological evidence is particularly strong for PKC ζ .

GLP-1 Induced β -Cell Proliferation is Altered by Overexpressing PKC ζ Mutants. A molecular approach was used to further document the implication of PKC ζ in GLP-1-induced proliferation. Thus, adenoviral constructs were used to increase the expression level of various PKC ζ proteins in INS(832/13)-cells. Western blot studies showed that the wild-type and kinase-dead dominant negative constructs were expressed about 20 fold over basal PKC ζ at a MOI of 10 pfu/cell (data not shown). Overexpressing wild type PKC ζ slightly but significantly enhanced basal proliferation without affecting maximal thymidine incorporation in the presence of GLP-1. The dominant negative construct reduced GLP-1-induced proliferation by approximately 60%. Constitutively active PKC ζ increased β (INS 832/13)-cell proliferation in the absence of GLP-1 to an extent similar to that occurring in the presence of the glucoincretin. In addition, GLP-1 did not further enhance thymidine incorporation under this condition (Fig. 4). Adenoviral infections by itself did not affect INS cells proliferation since there was no significant difference in tritiated thymidine incorporation between uninfected cells and cells overexpressing β -gal following infection with a β -gal adenoviral construct (data not shown).

DISCUSSION

GLP-1, a potent glucagon-like hormone and a potentially important drug in the treatment of diabetes (26,34), has recently been described as a growth factor in the β (INS-1)-cell line (8) as well as in mouse islet tissue (9). However, the exact mechanism by which GLP-1 exerts its growth promoting action remains to be defined.

Pharmacological and biological evidences have suggested that PI3-K plays a central role in the transduction of the GLP-1-induced proliferative signal (8). The results of the present study indicate that GLP-1 and glucose activate not-additively ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB, three potential downstream targets of PI-3K, like they do for β -cell growth (8). PKC ζ , an atypical isoform of PKC and downstream target of PDK, is also activated by the glucagon-like hormone as evidenced from its translocation from the cytoplasm to the nucleus following GLP-1 treatment of INS(832/13) cells and dissociated rat β -cells. The transient nuclear translocation of PKC ζ induced by GLP-1 in β -cells is similar to that caused by NGF in PC12 cells in term of intensity and duration (35). We therefore studied the effect of specific inhibitors of these signalling pathways activated by the glucagon-like hormone on GLP-1-induced tritiated thymidine incorporation. On the one hand, the MEK inhibitor PD98059 did not suppress GLP-1-induced DNA synthesis. MEK is an upstream kinase and activator of ERK 1 /2, thus indicating that the ERK 1 /2 pathway is unlikely to be involved in this proliferative process. On the other hand, both the p38 MAPK inhibitor, SB203580, and the PKC ζ pseudo-substrate suppressed the GLP-1-induced growth response, thus providing pharmacological evidence for the implication these particular pathways in this process. Moreover, overexpression of a dominant-negative PKC ζ in INS cells reduced the GLP-1-induced tritiated thymidine incorporation and increasing the expression level of a constitutively active PKC ζ was sufficient to cause the proliferation of INS cells to the same extent as GLP-1. The combined pharmacological and molecular biology approaches allow the conclusion that PKC ζ activation is an important step in the proliferative signaling pathway(s) of the glucagon-like hormone.

Recent studies have suggested a role for PKC ζ nuclear translocation in the transduction of proliferative signals in response to various stimuli in different cell types (36-38). However, the precise way by which PKC ζ might activate cell growth is unclear because little is known about the targets of PKC ζ . An interesting candidate is NF- κ B whose activation, which is followed by its nuclear translocation, is known to be modulated by PKC ζ (39). Thus, NF- κ B activation is an anti-apoptotic signal in some cells(40). Interestingly, another candidate target of PKC ζ is the transcription factor PDX-1 which is also induced by GLP-1 (8,41). PDX-1 is a key β -cell specific transcription factor (42) regulating the development of the endocrine pancreas (43,44) as well as a number of β -cell genes including those encoding insulin, glucokinase and the glucose transporter GLUT2 (45,46). Moreover, PDX-1 expression has been shown to correlate with the proliferation of β (INS)-cells (8) and pancreatic β -cell regeneration (47).

GLP-1 was already known to activate p38 MAPK in Chinese hamster ovary cells and rat insulinoma cells (RIN 1046-38) (48). In the present study, we show that GLP-1 activates p38 MAPK in INS(832/13) cells as well and that p38 MAPK inhibition suppresses the proliferative action of GLP-1. Evidence has been obtained for a role for p38 MAPK along with ERK 1 /2 in the mitogenic response of MIN6 β -cells to serum (49). Because p38 MAPK phosphorylates numerous transcription factors and induces several immediate-early response genes involved in cell growth/apoptosis control (50,51), it can be postulated that p38 MAPK is also implicated in the growth promoting action of GLP-1. The hypothesis that p38 MAPK could cross-talk with the PKB cascade to mediate a proliferative event is a possibility that requires evaluation in the β -cell in view of a recent publication documenting such effect in muscle cells (39).

In conclusion, our results indicate that GLP-1 increases ERK 1 /2, p38 MAPK and PKB activities in INS-1 cell non-additively with glucose. GLP-1 also causes the translocation of PKC ζ , a downstream target of PI-3K, from the cytoplasm to the nucleus. However, utilization of specific kinases inhibitors reveals that only p38 MAPK and PKC ζ activation are likely to play a role in the GLP-1-induced

proliferative response. The use of recombinant adenoviruses to express various PKC ζ constructs has allowed the demonstration of the implication of PKC ζ in the GLP-1-induced increase in DNA synthesis in INS(832/13) cells. The results are consistent with a model in which GLP-1-induced PI-3K activation results in PKC ζ translocation to the nucleus which may play a role in the long term pleiotropic effects (DNA synthesis, metabolic enzymes and insulin gene expression) of the glucocretin.

AKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and the Canadian Diabetes Association (to MP). M.P. is a Canadian Institute of Health Research Scientist.

REFERENCES

1. Fehmann HC, Goke R, Goke B : Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr.Rev.* 16: 390-410, 1995
2. Holz GG, Kuhtreiber WM, Habener JF : Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* 361: 362-365, 1993
3. Drucker DJ : Glucagon-like peptides. *Diabetes* 47: 159-169, 1998
4. Widmann C, Burki E, Dolci W, Thorens B : Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of beta cell lines. *Mol.Pharmacol.* 45: 1029-1035, 1994
5. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S : Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 326: 1316-1322, 1992
6. Holst JJ : Gut hormones as pharmaceuticals. From enteroglucagon to GLP-1 and GLP-2. *Regul.Pept.* 93: 45-51, 2000
7. Fehmann HC, Habener JF : Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-166, 1992
8. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M : Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells [In Process Citation]. *Diabetologia* 42: 856-864, 1999
9. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM : Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49: 741-748, 2000

10. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD : Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends.Biochem.Sci.* 22: 267-272, 1997
11. Wymann MP, Pirola L : Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim.Biophys.Acta* 1436: 127-150, 1998
12. Miyata Y, Nishida E : Distantly related cousins of MAP kinase: biochemical properties and possible physiological functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 266: 291-295, 1999
13. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM : Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp.Cell Res.* 256: 34-41, 2000
14. Macfarlane WM, Smith SB, James RF, Clifton AD, Doza YN, Cohen P, Docherty K : The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J.Biol.Chem.* 272: 20936-20944, 1997
15. Rafiq I, da Silva XG, Hooper S, Rutter GA : Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear trans-location of pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2. *J.Biol.Chem.* 275: 15977-15984, 2000
16. Anderson KE, Coadwell J, Stephens LR, Hawkins PT : Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr.Biol.* 8: 684-691, 1998
17. Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT : A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 60: 3504-3513, 2000

18. Le GJ, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ : Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281: 2042-2045, 1998
19. Mendez R, Kollmorgen G, White MF, Rhoads RE : Requirement of protein kinase C zeta for stimulation of protein synthesis by insulin. *Mol. Cell Biol.* 17: 5184-5192, 1997
20. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ : Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 19: 496-503, 2000
21. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB : Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49: 424-430, 2000
22. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB : Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-178, 1992
23. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP : Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43: 725-730, 1987
24. Rouiller DG, Cirulli V, Halban PA : Differences in aggregation properties and levels of the neural cell adhesion molecule (NCAM) between islet cell types. *Exp. Cell Res.* 191: 305-312, 1990
25. Han JH, Beutler B, Huez G : Complex regulation of tumor necrosis factor mRNA turnover in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1090: 22-28, 1991
26. Hugl SR, White MF, Rhodes CJ : Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin

receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J.Biol.Chem.* 273: 17771-17779, 1998

27. Crespo P, Mischak H, Gutkind JS : Overexpression of mammalian protein kinase C-zeta does not affect the growth characteristics of NIH 3T3 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 213: 266-272, 1995

28. Berra E, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Chapkin RS, Moscat J : Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74: 555-563, 1993

29. Diaz-Meco MT, Berra E, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Dominguez I, Diaz-Golpe V, Lain de Lera MT, Alcami J, Paya CV : A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol.Cell Biol.* 13: 4770-4775, 1993

30. Graham FL, Prevec L : Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol.Biotechnol.* 3: 207-220, 1995

31. Pears CJ, Kour G, House C, Kemp BE, Parker PJ : Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur.J.Biochem.* 194: 89-94, 1990

32. Maraldi NM, Marmioli S, Cocco L, Capitani S, Barnabei O, Manzoli FA : Nuclear lipid-dependent signal transduction in human osteosarcoma cells. *Adv.Enzyme Regul.* 37:351-75: 351-375, 1997

33. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P : Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem.J.* 351: 95-105, 2000

34. Schuppin GT, Pons S, Hugl S, Aiello LP, King GL, White M, Rhodes CJ : A specific increased expression of insulin receptor substrate 2 in pancreatic beta-cell lines is involved in mediating serum-stimulated beta-cell growth. *Diabetes* 47: 1074-1085, 1998

35. Zhou G, Seibenhener ML, Wooten MW : Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J.Biol.Chem.* 272: 31130-31137, 1997
36. Guizzetti M, Costa LG : Possible role of protein kinase C zeta in muscarinic receptor-induced proliferation of astrocytoma cells [In Process Citation]. *Biochem.Pharmacol.* 60: 1457-1466, 2000
37. Donson AM, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Fleitz JM, Foreman NK : Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines. *J.Neurooncol.* 47: 109-115, 2000
38. Umar S, Sellin JH, Morris AP : Increased nuclear translocation of catalytically active PKC-zeta during mouse colonocyte hyperproliferation. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 279: G223-G237, 2000
39. Blair AS, Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS : Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 274: 36293-36299, 1999
40. Bertrand F, Atfi A, Cadoret A, Allemain G, Robin H, Lascols O, Capeau J, Cherqui G : A role for nuclear factor kappaB in the antiapoptotic function of insulin. *J.Biol.Chem.* 273: 2931-2938, 1998
41. Furukawa N, Shirotani T, Araki E, Kaneko K, Todaka M, Matsumoto K, Tsuruzoe K, Motoshima H, Yoshizato K, Kishikawa H, Shichiri M : Possible involvement of atypical protein kinase C (PKC) in glucose-sensitive expression of the human insulin gene: DNA-binding activity and transcriptional activity of pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) are enhanced via calphostin C-sensitive but phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Go 6976-insensitive pathway. *Endocr.J.* 46: 43-58, 1999

42. Marshak S, Totary H, Cerasi E, Melloul D : Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93: 15057-15062, 1996
43. Oster A, Jensen J, Serup P, Galante P, Madsen OD, Larsson LI : Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *J.Histochem.Cytochem.* 46: 707-715, 1998
44. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H : Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609, 1994
45. Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K, Matsuzawa Y, Kawamori R, Yamasaki Y : PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 45: 1826-1831, 1996
46. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C : Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol.Endocrinol.* 10: 1327-1334, 1996
47. Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S : The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48: 507-513, 1999
48. Montrose-Rafizadeh C, Avdonin P, Garant MJ, Rodgers BD, Kole S, Yang H, Levine MA, Schwindinger W, Bernier M : Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 140: 1132-1140, 1999
49. Burns CJ, Squires PE, Persaud SJ : Signaling through the p38 and p42/44 mitogen-activated families of protein kinases in pancreatic beta-cell proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 268: 541-546, 2000

50. Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH : Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31: 2087-2099, 1999

51. Lee SA, Park JK, Kang EK, Bae HR, Bae KW, Park HT : Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by nitric oxide. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 75: 16-24, 2000

FIGURES

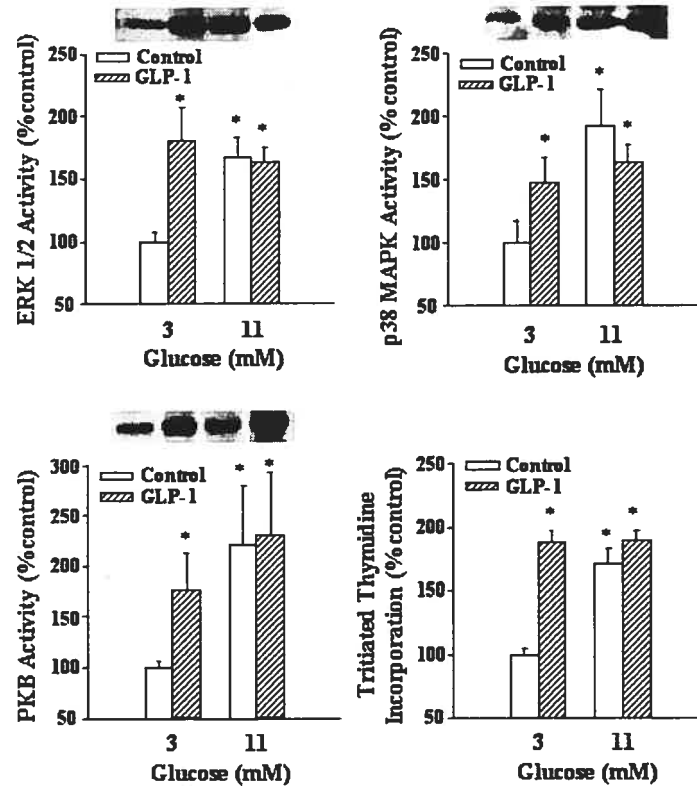


FIG 1: Effects of GLP-1 and glucose on ERK1/2, p38 MAPK, PKB and DNA synthesis in INS(832/13) cells. *In vitro* kinase activities were measured at 3 mM or 11 mM glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1. DNA synthesis was determined by tritiated thymidine incorporation. Cells were cultured in serum free RPMI medium containing 3 mM or 11 mM glucose in the presence or absence of GLP-1 for 24 h. 1 uCi/well of tritiated thymidine was added during the final 4 h of the 24 h incubation period. Representative immunoblots for each kinase activity measurement are shown. Means \pm SE of 4 independent experiments for kinase activities and 4 independent experiment each comprising 3 or 4 wells for cell proliferation assay. *, $p < 0.05$.

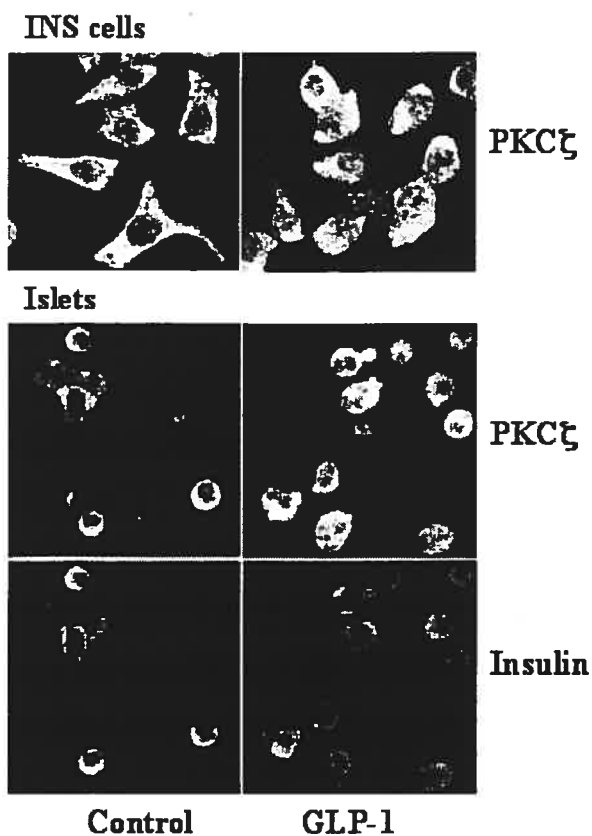


FIG 2: GLP-1 causes nuclear translocation of PKC ζ in INS(832/13) and dissociated normal rat β -cells. INS(832/13) cells (top 2 panels) and dissociated rat islet cells (lower 4 panels) were incubated at 3 mM glucose with or without 100 nM GLP-1 for 5 min (INS cells) or 2 min (islet cells). Cells were examined using a confocal microscope (630X magnification with oil immersion) for their immunofluorescence staining as described in “Experimental procedures”. Dissociated rat islet cells were co-immunostained with anti-PKC ζ and mouse anti-insulin antibodies to identify β -cells.

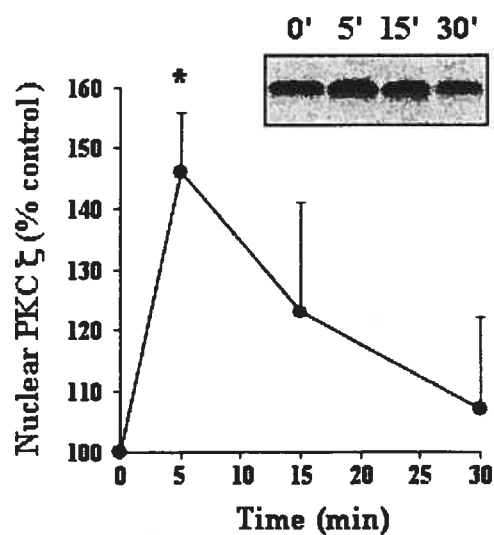


FIG 3: Time-dependent increase in PKC ζ immunoreactivity in nuclear fractions of INS-cells. INS cells were incubated at 3 mM glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1 for the indicated time periods. Nuclear proteins were extracted to perform Western blot analysis. Immunoreactivity was quantitated by densitometry. Inset, a representative PKC ζ immunoblot is shown. Means \pm SE of 4 different experiments. *, $p < 0.05$.

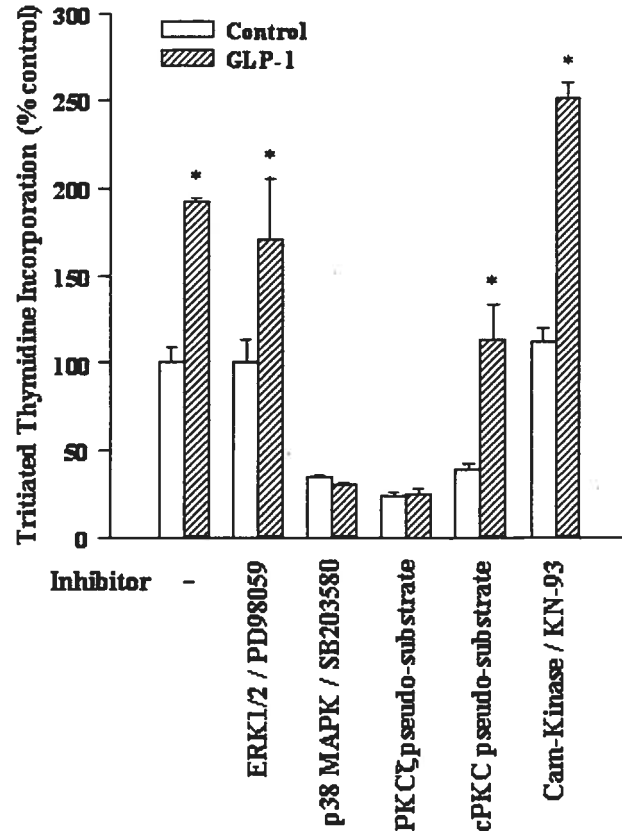


FIG 4: PKC ζ and p38 MAPK inhibitors suppress GLP-1-induced DNA synthesis in INS(832/13) cells. Cells were cultured at 3 mM glucose for 24 h in serum free RPMI medium in the presence or absence of 10 nM GLP-1 and with or without different pharmacological inhibitors (50 μ M PD98059, 10 μ M SB203580, 50 μ M PKC ζ pseudosubstrate, 50 μ M cPKC pseudosubstrate and 1 μ M KN-93). Means values \pm SE of 3 separated experiments, each comprising 4 wells. Cam-Kinase, calmodulin-dependent protein kinase. *, $p < 0.05$.

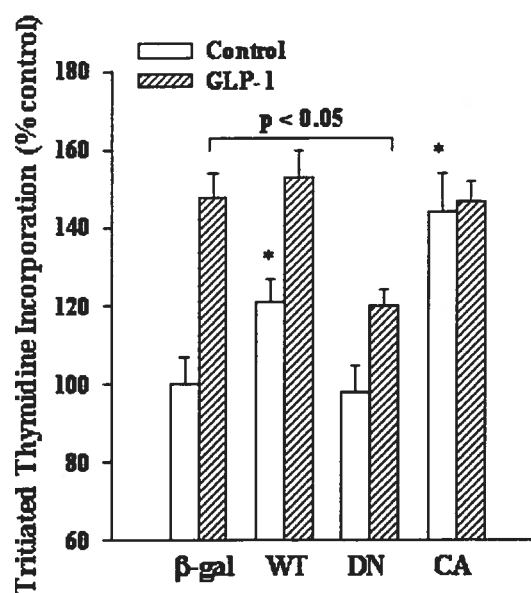


FIG 5: Effects of adenoviral overexpression of various PKC ζ constructs on GLP-1-induced proliferation in INS(832/13) cells. Cells were infected for overexpression of wild type (WT), dominant-negative (DN) and constitutively active (CA) PKC ζ constructs as described in “Experimental procedures”. Cells were then cultured at 3 mM glucose for 24 h in serum free RPMI medium in the presence or absence of 10 nM GLP-1 to perform tritiated thymidine incorporation assay as described in Fig. 1. Means values \pm SE of 3 separated experiments, each comprising 4 wells. *, $p < 0.05$.

Glucagon-Like peptide-1 Induces Pancreatic β -Cell Proliferation Via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor

Jean Buteau, Sylvain Foisy, Erik Joly and Marc Prentki

From the Molecular Nutrition Unit, Departments of Nutrition and Biochemistry, University of Montreal, the Centre de Recherche du CHUM and Institut du Cancer, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada

Nous avons démontré au cours de nos études antérieures que le GLP-1 agit comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β en induisant la prolifération de cette dernière via l'activation de la voie de signalisation PI-3K/PKC ζ . Toutefois, le mécanisme précis par lequel le GLP-1 active la PI-3K demeure inconnu.

Au cours de cette étude, nous démontrons que le GLP-1 active la voie de la PI-3K et stimule la prolifération de la cellule β via la transactivation du récepteur à l'EGF par un mécanisme dépendant de c-Src et du clivage de la betacelluline.

Cette étude démontre pour la première fois que le GLP-1R transactive le récepteur à l'EGF et stimule la maturation protéolytique de la betacelluline. Nos résultats ajoutent beaucoup d'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans le traitement du diabète de type 2 puisque la betacelluline est considérée comme un agent anti-diabétogénique potentiel et un facteur de différenciation important pour la cellule pancréatique β .

Contribution des coauteurs :

S. Foisy : Élaboration de l'hypothèse de travail. Assistance technique et supervision.

E. Joly : Participation à l'écriture du manuscrit.

The abbreviations used are: BSA, bovine serum albumin; BTC, betacellulin; EGFR, epidermal growth factor receptor; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GLP-1R, glucagon-like peptide-1 receptor; GPCR, G protein-coupled receptor; KRBH, Krebs-Ringer bicarbonate HEPES medium; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PBS, phosphate buffered saline; PDX-1, pancreatic and duodenal homeobox gene-1; PI-3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SH2, Src-homology domain 2.

SUMMARY

We previously provided evidence that glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces pancreatic β -cell growth non-additively with glucose in a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)- and PKC ζ -dependent manner. However, the exact mechanism by which the GLP-1 receptor (GLP-1R), a member of the G protein coupled-receptor (GPCR) superfamily, activates the PI-3K signaling pathway to promote β -cell growth remains unknown. We hypothesized that the GLP-1R could activate PI-3K and promote β -cell proliferation through transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR), an event possibly linked to GPCRs via activation of c-Src and the production of putative endogenous EGF-like ligands. Both, the c-Src inhibitor PP1 and the EGFR-specific inhibitor AG1478 blocked GLP-1-induced [3 H]- thymidine incorporation in INS(832/13) cells as well as in isolated rat islets, while only AG1478 inhibited the proliferative action of betacellulin (BTC), an EGFR agonist. Both compounds also suppressed GLP-1-induced PI-3K activation. A time-dependent increase in tyrosine phosphorylation of the EGFR in response to GLP-1 was observed in INS(832/13) cells. This transactivation of the EGFR was sensitive to both the pharmacological agents PP1 and AG1478. The action of GLP-1 and BTC on INS-cell proliferation were found to be not additive. Overexpression of a dominant negative EGFR in INS cells with a retroviral expression vector curtailed GLP-1-induced β -cell proliferation. GLP-1 treatment of INS cells caused a decrease in cell-surface associated BTC as shown by FACS analysis. Also, the metalloproteinase inhibitor GM6001 and an anti-BTC neutralizing antibody suppressed the GLP-1 proliferative effect. Finally, co-culturing the prostatic cancer cell line LNCaP that lacks GLP-1 responsiveness with INS cells increased LNCaP cell proliferation in the presence of GLP-1, thus revealing that INS cells secrete a growth factor in response to GLP-1. GM6001 and an anti-BTC neutralizing antibody suppressed increased LNCaP cell proliferation in the presence of GLP-1 in the co-culture experiments. The results are consistent with a model in which GLP-1 increases PI-3K activity and enhances β -cell

proliferation via transactivation of the EGFR that would require the proteolytic processing of membrane-anchored BTC or other EGF-like ligands.

INTRODUCTION

Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide (GLP-1), a potent glucocretin hormone (1,2), is secreted by the intestinal L-cells in response to fat meals and carbohydrates (3,4). It is a potentially important drug in the treatment of type 2 diabetes in view of its ability to improve insulin secretion in both subjects with impaired glucose tolerance and Type II diabetes mellitus (5,6). GLP-1 is also an insulinotropic agent through its ability to stimulate insulin gene expression and proinsulin biosynthesis (7,8). GLP-1 increases the expression level of the β -cell specific transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) (9) which is implicated in the regulation of the expression of the insulin, GLUT2 and glucokinase genes and β -cell differentiation (10-12). In addition, the glucocretin increases *in vitro* β -cell proliferation non-additively with glucose via a phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)/protein kinase C ζ (PKC ζ) signaling pathway in β (INS-1) cells (9,13) as well as the islet mass in mouse pancreas *in vivo* (14). Finally, GLP-1 induces several immediate-early response genes and proto-oncogenes in INS cells that are implicated in cell growth/apoptosis control such as c-fos, c-jun, junD and nur77 (15,16).

GLP-1 signal transduction in the β -cell is now being extensively studied. GLP-1 interaction with its specific, high affinity receptor (GLP-1R), a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily, increases cAMP levels in several β -cell models to activate the protein kinase A (PKA) signal transduction system (4,17,18). There is also evidence that this rise in cAMP levels leads to an increase in cytosolic Ca²⁺ (19,20). However, the precise mechanism by which GLP-1R activates the PI-3K signaling pathway to mediate the proliferative action of GLP-1 has not been elucidated.

Recent studies investigating the mitogenic effects of GPCR agonists have led to the concept that some GPCRs, lacking intrinsic kinase activity, transactivate the epidermal growth factor receptor (EGFR) to promote cell proliferation and mitogenic signal transduction pathways (21,22). The EGFR has been recently identified as an essential element in the GPCR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI-3K signaling pathways in cells treated with various GPCR

agonists such as lysophosphatidic acid (21,22), thrombin (22), and angiotensin II (23). In some instances, the EGFR transactivation by GPCRs has been documented to require the non-receptor-type tyrosine kinase c-Src (24,25). The mechanism involves the production of endogenous EGFR ligands from transmembrane precursors via GPCR-induced c-Src activation of an endoprotease (26).

Receptor molecules for EGF-like growth factors are encoded by the c-erbB gene and its relatives. Upon binding of their ligands, EGFRs undergo dimerization and autophosphorylation on tyrosine residues in order to recruit SH2 (Src homology 2)-containing proteins responsible for signal transduction (22). There are at least four known members for the EGFR family : c-erbB-1 (EGFR), c-erbB2, c-erbB-3 and c-erbB4. The c-erbB-1/EGFR is expressed throughout the human fetal pancreas and in adult β -cells (27). Huotari et al. (27) showed that only the c-erbB-1/EGFR gene is expressed in INS-1 cells and that betacellulin (BTC), a member of the EGF family and activator of erbB-1/EGFR and erbB-4 (28), displays mitogenic activity as it stimulated INS-1 cell replication at picomolar concentrations (27). BTC, a 9.5-KDa glycoprotein expressed in several mouse tissues including kidney, liver and pancreas (29), is synthesized from a 32-KDa membrane-anchored precursor that is thought to be proteolytically cleaved to generate an active and soluble secreted form of the molecule (30), as occurs with other members of the EGF family. Since BTC is expressed in all pancreatic β -cell types examined so far such as various insulinomas (31), the β -cell line BTC3 (29), normal β -cells (32) as well as in pancreatic duct cells (32), it is reasonable to think that BTC could link the GLP-1R to the EGFR and be responsible for the mitogenic action of GLP-1 on the β -cell.

In this study, we aimed at investigating the possible implication of EGFR transactivation in GLP-1-induced β -cell proliferation and PI-3K stimulation. Using both pharmacological and molecular biology approaches, we provide evidence supporting the concept that c-Src-dependent transactivation of the EGFR and proteolytic processing of membrane-anchored BTC or other EGF-like ligands link GLP-1R signaling to PI-3K activation and β -cell proliferation.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Reagents. Pertussis toxin was purchased from Calbiochem (LaJolla, CA). AG1478 and PP1 were purchased from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Human glucagon-like peptide-1 fragment 7-36 amide and human recombinant BTC were obtained from Sigma (St-Louis, MO). The anti-EGFR antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Mississauga, ON). The PY20 and 4G10 anti-phosphotyrosine antibodies were respectively from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA) and Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Monoclonal anti-BTC primary antibody was from R&D System (Minneapolis, MN). GM6001, a pan-specific pharmacological metalloproteinase inhibitor, was from Chemicon International (Temecula, CA). RPMI 1640 and the cell culture supplements, including fetal calf serum, were purchased from Gibco BRL (Burlington, ONT). Methyl-[³H]-thymidine was from ICN (Costa Mesa, CA). Proteins concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

Cell Culture and Incubation. INS832/13 (33) cells (passages 36-70) were grown in monolayer cultures as described previously (34) in regular RPMI-1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M β -mercaptoethanol, 100 IU/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37 °C in a humidified (5% CO₂, 95% air) atmosphere. This clone (832/13) of INS-1 cell was used because it shows better differentiation characteristics in term of glucose-stimulated insulin secretion than the original INS-1 cell line (33). When cells reached 80% confluence (after approximately 7 days), they were washed with phosphate buffered saline (PBS) and preincubated at 37 °C for 90 min in a Krebs-Ringer bicarbonate medium containing 1mM CaCl₂, 5mM NaHCO₃, 25 mM HEPES (pH 7.4) (KRBH) supplemented with 3 mM glucose and 0.1% defatted bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Fraction V). The pharmacological inhibitors were added to the medium during the last 30 min of the preincubation period. Cells were then washed with PBS and incubated for the indicated times in the same supplemented KRBH medium containing the substances to be tested.

LNCaP cells were kindly given by Dr. Mes-Masson (University of Montreal, QC) and were cultured as described above for INS(832/13) cells.

[³H]-Thymidine Incorporation Assay. A previously described procedure was used (9,35). In brief, cells were seeded 2 days prior use in 96-well plates (8X10⁴ INS(832/13) cells or 1.5X10⁴ LNCaP cells per well) and cultured in regular complete RPMI medium as described above. Cells were then washed with PBS and preincubated for a period of 24 h in minimal RPMI medium i.e. without serum but with 3 mM glucose and 0.1% BSA. They were then incubated for 24 h in minimal RPMI medium with various test substances. Proliferation was determined by incorporation of [³H]-thymidine (1μCi/well) during the final 4 h of the 24 h incubation period. Cells were then harvested with a PHD cell harvester from Cambridge Technology (Watertown, MA) and the radioactivity retained on the dried glass fiber filters was measured by liquid scintillation.

BrdU labeling and detection assay. Cells were seeded in 6-well plates at 80% confluency, attached onto polyornithine-coated coverslips, and cultured as described for the [³H]-thymidine incorporation assay. For the co-culture experiments, INS(832/13) and LNCaP cells were mixed and seeded together at a 5:1 ratio. BrdU labeling and detection was performed by using a commercially available kit (BrdU Labeling and detection kit I (Roche Diagnostics, Laval, QC)) according to manufacturer's protocol. In brief, BrdU labeling was performed for the last hour of a 24 h incubation period in the presence or absence of 10 nM GLP-1 or 5 ng/ml BTC with or without an anti-BTC antibody (BTC-Ab) (0.25 μg/mL) or 2.5 μM GM6001 (Ilomastat). Cells were then washed, fixed in ethanol and incubated with a mouse monoclonal anti-BrdU antibody and a rabbit anti-insulin antibody (Santa Cruz Biotech Inc., CA) working solution. After several washes with PBS, cells were stained with a sheep anti-mouse fluorescein-conjugated antibody and a donkey anti-rabbit rhodamine-conjugated antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove, CA). The fluorescence of bound anti-BrdU and anti-insulin antibodies was visualized under a fluorescence microscope at 400X magnification. At least 200 cells were analyzed for each condition of an experiment. INS(832/13) cells and LNCaP cells were identify by their different insulin staining and cell morphology.

Rat Islets Isolation and Incubation. Pancreatic islets were obtained from male (200 g) Wistar rats as described (36). Isolated rat islets (50 islets per condition) were seeded in 12-well plates and cultured in regular RPMI containing 11 mM glucose and 10% FCS for 24 h. Islets were then washed with PBS and preincubated for a period of 24 h in minimal RPMI medium. They were then incubated for 24 h in minimal RPMI medium containing 3 mM glucose with or without GLP-1. [³H]-thymidine (5 μ Ci/well) was added during the final 6 h incubation period. Then, islets were lysed and DNA precipitated in 10% trichloroacetic acid (TCA) using a published procedure (37). After several washes of the TCA pellets, DNA was solubilized in 0.4 M NaOH and radioactivity measured.

Immunoprecipitation and Western Blotting. INS(832/13) cells were grown and incubated as described above in 100 mm petri dishes, washed twice with PBS and lysed in 1 ml of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 5 mM sodium pyrophosphate, and 1 mM orthovanadate) for 30 min at 4°C. Samples were centrifuged (16,000 x g, 20 min) and the supernatants used for protein determination and immediately submitted to immunoprecipitation. EGFR was immunoprecipitated for 4 h at 4°C from 2 mg of cell lysates with 5 μ g of sheep polyclonal anti-EGF receptor (Fitzgerald, Concord, MA) adsorbed to 30 μ l of Protein A-Sepharose. Following 4 washes in lysis buffer, proteins were denatured in SDS-PAGE sample buffer, subjected to electrophoresis on 7% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.). Membranes were blocked with 1% BSA in PBS, probed with a cocktail of monoclonal anti-phosphotyrosine primary antibodies (800 ng/ml PY20 and 200 ng/ml 4G10) in PBS/BSA and subsequently with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Following chemiluminescence detection with ECL (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, England), membranes were stripped for 30 min at 50 °C in a buffer containing 62.5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2% SDS and 100 mM β -mercaptoethanol, and reprobbed with a sheep polyclonal anti-EGFR primary antibody (1.3 μ g/ml, Fitzgerald, Concord, MA) and subsequently with a peroxidase-conjugated goat anti-sheep secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West

Grove, PA) in order to control for protein loading and EGFR expression. The PY/EGFR ratios were quantitated by densitometry.

Phosphatidylinositol 3-kinase Activity Measurements. INS(832/13) cells were grown in T-75 flasks. Following a 5 min incubation period in KRB with various test substances, PI-3K was assayed according to reference (38). In brief, PI-3K was immunoprecipitated from 2-3 mg of total protein extracts and resuspended in 50 μ l of a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, and 100 mM EGTA. After a 10 min incubation period with 10 μ g of L- α -phosphatidylinositol, 10 μ Ci of [γ 32P]-ATP were added with 10 mM MgCl₂. Reactions were stopped after 4 min at room temperature with 0.15 ml of CHCl₃-MeOH-HCl (100:200:2). Lipids were extracted and spotted on silica gel plates for thin layer chromatography. The plates were then dried and exposed to films for autoradiography.

Retroviral Infections. Dominant-negative EGFR retroviral expression was conducted as previously published (22). GPE-Isif 4E1 and GPE-CD533 cells, respectively generating empty retroviral particles and dominant-negative EGFR retroviral particles, were kindly provided by Dr. A. Ullrich (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany) and grown to 80% confluency in 100 mm petri dishes in 10 ml of regular RPMI medium. Then, culture media were changed and new media, containing retroviruses, were collected after 48 h and filtered through 0.45 μ m filters and kept frozen at -80°C. Retroviruses containing RPMI media were diluted 1:4 prior infections of INS(832/13) cells in 96-well plates. Cells were washed with PBS 24 h post-infection and serum-starved to performed [3 H]-thymidine incorporation assays as described above. The dominant-negative EGFR mutant lacks the cytoplasmic domain and disrupts EGFR downstream signaling by forcing endogenous wild-type receptors into signaling-incompetent heterodimers (22).

Flow cytometric analysis of cell-surface anchored BTC content. INS832/13 cells were cultured as described above in 60 mm petri dishes. Cells were harvested and incubated for 30 min at 4° C with a monoclonal anti-BTC primary antibody (0.5 μ g/ml) in PBS and subsequently with biotin-conjugated goat anti-mouse IgG (7 μ g/ml in PBS) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for another 30 min. Following incubation with a streptavidin-conjugated FITC, cells were fixed in 1%

paraformaldehyde (pH 7.4), and sample acquisition was performed on a Epics XL flowcytometer from Coulter (Miami, FL) using the Septan II software.

Calculations and statistics. Data are presented as means \pm SEM. Statistical analyses were done with the SPSS for Windows system. Differences between two conditions were assessed with Student's *t* test for related samples. Differences were deemed to be significant when *p* was less than 0.05.

RESULTS

GLP-1-Induced β -Cell Proliferation Requires c-Src and EGFR Transactivation.

To assess the early signaling events implicated in GLP-1-induced β -cell proliferation we first tested the effect of various pharmacological agents including pertussis toxins, PP1 and AG1478 (respectively specific inhibitors for Gi, c-Src and the EGFR). As shown in Fig 1, GLP-1-increased INS(832/13) cell proliferation by about 40% as assessed by [3 H]-thymidine incorporation. However, when proliferation was assessed using the BrdU incorporation assay, the percentage of positive INS cells nuclei rose from less than 1% for the control situation to approximately 4% when cells were treated with 10 nM GLP-1 (see also Fig 10). Thus, the relatively modest increase in proliferation observed with the [3 H]-thymidine incorporation assay might be due to intrinsic factors of the assay and to the low increased percentage of cells that respond to GLP-1. Indeed, the low labeling index found in response to GLP-1 with [3 H]-thymidine might be due to self-decomposition products of the thymidine and incorporation of catabolic products of the thymidine in cellular fractions other than DNA, thus raising background incorporation in the control situation. It also has to be considered that the BrdU labeled index is determined visually by counting positive nuclei and that this method, in contrast to the thymidine incorporation measurements assay, does not take in account the general background of incorporation nor quantify the level of BrdU incorporation. Because of the convenience of the [3 H]-thymidine incorporation assay we used this method in most subsequent experiments. GLP-1-induced proliferation was suppressed by AG1478 and PP1 whereas pertussis toxin had no effect (Fig 1). Pertussis toxin also reduced basal proliferation. However, no apparent cytotoxicity was observed as evaluated by morphological examination of the cells under the microscope. This suggests that GLP-1 induces β -cell DNA synthesis via c-Src, and provides pharmacological evidence for the implication of EGFR transactivation in GLP-1-induced β -cell proliferation.

Fig 2 shows that BTC increased [3 H]-thymidine incorporation in INS(832/13) cells and that its action was not additive to that of GLP-1. This observation is

compatible with the view that GLP-1 induces β -cell proliferation by transactivation of the EGFR following production of endogenous ligands such as BTC.

We next investigated whether the cell proliferation results obtained with the INS(832/13) cell line are applicable to normal islet tissue. Fig 3A and B show that both PP1 and AG1478 suppressed GLP-1-induced [3 H]-thymidine incorporation in cultured rat islets.

GLP-1 Transactivates the EGFR via c-Src. As shown in Fig 4, GLP-1 induced a transient tyrosine phosphorylation of the EGFR in INS(832/13) cells. EGFR tyrosine phosphorylation showed a time-dependent increase with a maximal effect observed as early as 2 min after exposure to 10 nM GLP-1 and a return to basal value after about 30 min. Fig 5 shows that GLP-1-induced EGFR phosphorylation was abolished by PP1 or AG1478 treatments, thus supporting the implication of c-Src or c-Src-like proteins in GLP-1-induced EGFR transactivation. In contrast, only the EGFR inhibitor AG1478 blocked BTC-induced EGFR phosphorylation since PP1 had no effect.

GLP-1 Increases PI-3K Activity via a c-Src-Dependent EGFR Transactivation. The activation of PI-3K by GLP-1 plays a central role in the proliferative action of the glucocretin (9). We therefore tested the functional role of EGFR transactivation in GLP-1-induced PI-3K activation. Fig 6 shows that GLP-1-induced PI-3K activation was sensitive to both pharmacological inhibitors, PP1 and AG1478, whereas only AG1478 suppressed BTC-induced PI-3K activation. This result suggests a role for a c-Src-dependent EGFR transactivation in GLP-1-induced PI-3K activation.

GLP-1-Induced β -Cell Proliferation is Suppressed by Overexpressing a Dominant Negative EGFR. In order to complement the pharmacological studies by a molecular approach, a retroviral construct was used to overexpress a dominant negative EGFR (lacking kinase activity) (22). INS(832/13) cells were infected with

the empty vector as control or with the dominant negative EGFR retrovirus 24 h prior serum starvation to subsequently perform [³H]-thymidine incorporation experiments. The dominant negative construct suppressed both GLP-1- and BTC-induced INS(832/13) cells proliferation (Fig 7), thus providing direct evidence for an implication of EGFR transactivation in the proliferative action of the glucocincretin. The basal [³H]-thymidine incorporation of non-infected cells was not significantly different with that of cells infected with the empty virus or with the dominant negative EGFR viral construct (not shown).

GLP-1 Reduces the Amount of Membrane-Associated BTC in INS(832/13)-Cells. The possibility that BTC might be implicated in the cell growth promoting action of GLP-1 was evaluated. We investigated whether cell-membrane associated BTC is processed following GLP-1 treatment in an attempt to identify the putative EGF-like ligand generated during GLP-1-induced EGFR transactivation. Because no radioimmuno-assays are available for the detection of BTC in either its membrane bound or secreted form, BTC cleavage was indirectly measured by FACS analysis. Fig 8 shows that GLP-1 caused a decrease in the content of cell-surface anchored BTC in INS(832/13) cells and that this reduction in cell-surface BTC was abolished by the c-Src inhibitor PP1, suggesting that c-Src would act upstream of the metalloproteinase and therefore would not activate directly the EGFR.

GLP-1-Induced Proliferation is Inhibited by a Pan-Specific Metalloproteinase Pharmacological Inhibitor and by an Anti-BTC Neutralizing Antibody.

To directly test the possible implication of a BTC processing event in the glucocincretin proliferative effect, an anti-BTC antibody was used in a proliferation assay to determine whether BTC neutralization can suppress GLP-1-induced proliferation. Because a juxtacrine effect of BTC on EGFR without requirement of BTC processing by metalloproteinase(s) is an alternative possibility to consider, the action of GM6001 (also known as I lomastat), a pan-specific metalloproteinase pharmacological inhibitor, was also tested. As shown in Fig 9, both the anti-BTC neutralizing antibody and GM6001 completely suppressed GLP-1-induced

INS(832/13) cell proliferation, suggesting that the action of GLP-1 on β -cell proliferation requires proteolytic cleavage of membrane-anchored BTC. Similar observation was made using the BrdU incorporation assay (Fig 10 C).

LNCaP Cells Proliferation Is Increased By GLP-1 Only When Co-Cultured With INS(832/13) Cells. To further confirm that a growth factor is released by GLP-1-treated INS(832/13) cells, co-culture experiments were conducted using the prostatic cancer LNCaP cell line. This cell type was chosen because it lacks a response to GLP-1 when cultured alone, whereas BTC increases its proliferation, as assessed by [3 H]- thymidine incorporation and BrdU incorporation assays (Fig. 10 A and B). However, when co-cultured with INS(832/13) cells, LNCaP cell proliferation was increased by GLP-1 (Fig 10 C), suggesting that INS(832/13) cells release a growth factor upon GLP-1 treatment. As shown on Fig 10 C, GLP-1-induced LNCaP cell proliferation was abolished by the metalloproteinase inhibitor GM6001 and an anti-BTC neutralizing antibody, strengthening the evidence that GLP-1 induces proteolytic cleavage of membrane-anchored BTC.

DISCUSSION

Because diabetes results in part from an impaired balance between β -cell proliferation and apoptosis, it becomes highly relevant to study the molecular mechanisms whereby insulinotropic hormones promote β -cell growth. This is particularly relevant for GLP-1 which is considered for diabetes treatment (5,6). Using complementary pharmacological, biochemical and molecular biology approaches, we provide evidence that GLP-1 transactivates the EGFR via a BTC-dependent mechanism and that GLP-1-induced EGFR transactivation is involved in PI-3K stimulation and β -cell proliferation induced by the glucocincretin.

Recently, several GPCR agonists have been shown to induce EGFR transactivation (21-23) by a mechanism that, in some instances, was shown to implicate c-Src (24,25). It has been hypothesized that c-Src activates some metalloproteinases, that would in turn process pro-active transmembrane growth factor precursors to release mature EGFR ligands (26). Upon ligand binding, the activated/dimerized EGFR can initiate a variety of signal transduction cascades comprising the PI-3K signaling pathways (21).

The experimental evidence supporting the model depicted in Fig 11 whereby GLP-1 activation of PI-3K signaling and β -cell proliferation involves EGFR transactivation can be summarized as follows. 1) The functional role of EGFR was studied using the pharmacological agents pertussis toxin, PP1 and AG1478, to inhibit Gi, EGFR and c-Src respectively. AG1478 and PP1 suppressed GLP-1-induced β -cell proliferation, providing evidence of the implication of the EGFR and c-Src in GLP-1-induced β -cell growth. 2) GLP-1 induced a transient phosphorylation of the EGFR that was sensitive to PP1 and AG1478, suggesting that GLP-1 is able to transactivate the EGFR via c-Src. 3) Both PP1 and AG1478 blocked the action of GLP-1 on PI-3K, suggesting that PI-3K activation by the glucocincretin occurs via c-Src and EGFR transactivation. 4) A dominant-negative EGFR construct lacking the tyrosine kinase activity suppressed the action of GLP-1 on INS(832/13) cell

proliferation. 5) GLP-1 decreased cell-surface associated BTC and this action of the glucocincretin was suppressed by PP1. 6) GLP-1-induced proliferation was completely suppressed by an anti-BTC neutralizing antibody and GM6001, a pan-specific metalloproteinase inhibitor. 7) The actions of GLP-1 and BTC on β -cell proliferation were found to be non-additive. 8) Finally, GLP-1-treatment induced LNCaP cell proliferation when co-cultured with INS(832/13) cells, while LNCaP cells did not respond to GLP-1 when cultured alone. The enhanced in LNCaP proliferation caused by GLP-1 in the co-culture system was abolished by GM6001 and an anti-BTC neutralizing antibody. These results are consistent with the view that GLP-1 induces EGFR transactivation via the production of BTC, although we cannot at this stage exclude the possibility that other EGF-like ligands participate in this process. Additional work is required to conclusively identify the EGFR ligand(s) and define the metalloproteinase(s) that mediate GLP-1 action on β -cell proliferation as well as directly prove that c-Src or a c-Src-like protein is involved in this process.

In accordance with the present study, EGFR signaling is thought to play a role in β -cell growth and islet development. Thus, mice lacking EGFR show disturbed formation of pancreatic islets (39) and EGF increases the proliferation of undifferentiated pancreatic embryonic cells *in vitro* (40). There are at least 4 members known in the EGFR family : c-erbB-1/EGFR, c-erbB2, c-erbB-3 and c-erbB4. A study by Huotari et al. showed that only the c-erbB-1/EGFR gene is expressed in the INS-1 cell line (27) and that paradoxically, while BTC showed mitogenic activity, EGF itself did not affect INS-1 proliferation (27). We also confirmed this observation in INS(832/13) cells (not shown). A proposed explanation for the different effects of EGF and BTC on INS cell proliferation is perhaps, as discussed before (27), that EGF and BTC do not interact with the same erbB dimers. For example, EGF signaling might require an erbB1/erbB2 or erbB3 dimer but since erbB2 and erbB3 are not expressed in INS cells, EGF would not be active. By contrast, an erbB1 homodimer might be the target of BTC but not of EGF. Our observations that GLP-1 and BTC do not have additive effects on [3 H]-thymidine incorporation, that an anti-BTC neutralizing antibody can suppress the GLP-1

proliferative effect and that GLP-1 reduces membrane bound BTC are compatible with the possibility that BTC is a natural ligand generated by β -cells following binding of GLP-1 to its receptor.

In conclusion, the data allow us to propose the model depicted on Fig 11 whereby GLP-1-induced EGFR transactivation, involving a c-Src-mediated event, metalloproteinase activation and BTC, plays a role in the pleiotropic effects (DNA synthesis, reduced apoptosis, gene expression, and insulin biosynthesis) of the glucocincretin.

AKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation Diabetes Center at McGill and University of Montreal and grants from the Canadian Institute of Health Research and the Canadian Diabetes Association (to MP). M.P. is a Canadian Institute of Health Research Scientist. J.B. was supported by a Quebec Diabetes Association fellowship and has recently been awarded a Canadian Institutes of Health Research Fellowship.

REFERENCES

1. Fehmann HC, Goke R, Goke B : Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr.Rev.* 16: 390-410, 1995
2. Holz GG, Kuhlreiber WM, Habener JF : Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* 361: 362-365, 1993
3. Drucker DJ : Glucagon-like peptides. *Diabetes* 47: 159-169, 1998
4. Widmann C, Burki E, Dolci W, Thorens B : Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of beta cell lines. *Mol.Pharmacol.* 45: 1029-1035, 1994
5. Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B, Efendic S : Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 326: 1316-1322, 1992
6. Holst JJ : Gut hormones as pharmaceuticals. From enteroglucagon to GLP-1 and GLP-2. *Regul.Pept.* 93: 45-51, 2000
7. Fehmann HC, Habener JF : Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-166, 1992
8. Skoglund G, Hussain MA, Holz GG : Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. *Diabetes* 49: 1156-1164, 2000
9. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M : Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases

transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 42: 856-864, 1999

10. Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C : Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol.Endocrinol.* 10: 1327-1334, 1996
11. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H : Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609, 1994
12. Oster A, Jensen J, Serup P, Galante P, Madsen OD, Larsson LI : Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *J.Histochem.Cytochem.* 46: 707-715, 1998
13. Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M : Protein kinase C ζ activation mediates glucagon-like peptide-1 induced pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes* 50: 2237-43, 2001
14. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM : Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49: 741-748, 2000
15. Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W : Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *FASEB J.* 12: 1173-1182, 1998
16. Susini S, Van HG, Li S, Prentki M, Schlegel W : Essentiality of intron control in the induction of c-fos by glucose and glucoincretin peptides in INS-1 beta-cells. *FASEB J.* 14: 128-136, 2000
17. Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C : Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that

exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42: 1678-1682, 1993

18. Thorens B : Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89: 8641-8645, 1992
19. Dillon JS, Tanizawa Y, Wheeler MB, Leng XH, Ligon BB, Rabin DU, Yoo-Warren H, Permutt MA, Boyd AE : Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology* 133: 1907-1910, 1993
20. Yada T, Itoh K, Nakata M : Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide and a rise in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increase cytosolic free Ca²⁺ in rat pancreatic beta-cells by enhancing Ca²⁺ channel activity. *Endocrinology* 133: 1685-1692, 1993
21. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A : Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 16: 7032-7044, 1997
22. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A : Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557-560, 1996
23. Li X, Lee JW, Graves LM, Earp HS : Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J.* 17: 2574-2583, 1998
24. Gao Y, Tang S, Zhou S, Ware JA : The thromboxane A₂ receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 296: 426-433, 2001

25. Eguchi S, Iwasaki H, Inagami T, Numaguchi K, Yamakawa T, Motley ED, Owada KM, Marumo F, Hirata Y : Involvement of PYK2 in angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 33: 201-206, 1999
26. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A : EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402: 884-888, 1999
27. Huotari MA, Palgi J, Otonkoski T : Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. *Endocrinology* 139: 1494-1499, 1998
28. Riese DJ, Bermingham Y, van RT, Buckley S, Plowman GD, Stern DF : Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene* 12: 345-353, 1996
29. Sasada R, Ono Y, Taniyama Y, Shing Y, Folkman J, Igarashi K : Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 190: 1173-1179, 1993
30. Dunbar AJ, Goddard C : Structure-function and biological role of betacellulin. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 32: 805-815, 2000
31. Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J : Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 259: 1604-1607, 1993
32. Miyagawa J, Hanafusa O, Sasada R, Yamamoto K, Igarashi K, Yamamori K, Seno M, Tada H, Nammo T, Li M, Yamagata K, Nakajima H, Namba M, Kuwajima M, Matsuzawa Y : Immunohistochemical localization of betacellulin, a new member of the EGF family, in normal human pancreas and islet tumor cells. *Endocr.J.* 46: 755-764, 1999

33. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB : Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49: 424-430, 2000
34. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB : Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-178, 1992
35. Hugl SR, White MF, Rhodes CJ : Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J.Biol.Chem.* 273: 17771-17779, 1998
36. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP : Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43: 725-730, 1987
37. Strauss PR, Sheehan JM, Kashket ER : Membrane transport by murine lymphocytes. II. The appearance of thymidine transport in cells from concanavalin A-stimulated mice. *J.Immunol.* 118: 1328-1334, 1977
38. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF : Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77, 1991
39. Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T : Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127: 2617-2627, 2000

40. Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R : Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 50: 1571-1579, 2001

FIGURES

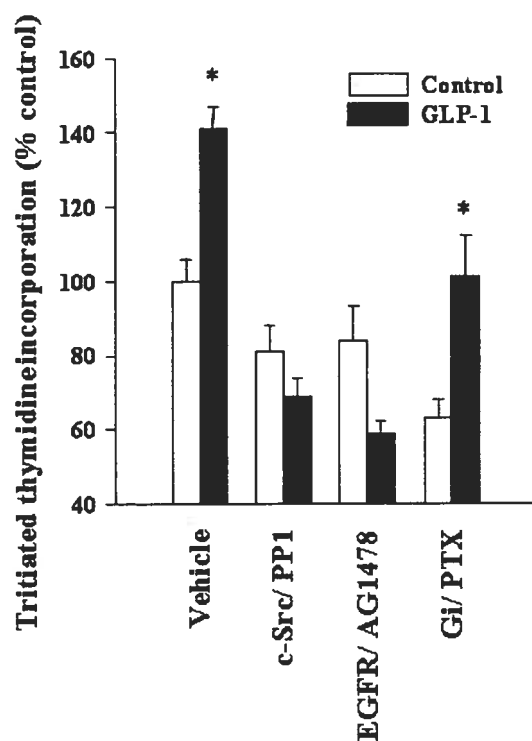


FIG 1. c-Src and EGFR inhibitors suppress GLP-1-induced DNA synthesis in INS(832/13) cells. Cells were cultured at 3 mM glucose for 24 h in serum free RPMI medium in the presence or absence of 10 nM GLP-1, with or without various pharmacological inhibitors (10 μ M PP1, 250 nM AG1478, 50 ng/ml pertussis toxin (PTX)). [3 H]-thymidine (1 μ Ci/well) was added during the final 4 h of the 24 h incubation period. Vehicle = DMSO 0.1% (v/v). Means values \pm SE of 3 experiments, each comprising 4 wells. *, $p < 0.01$.

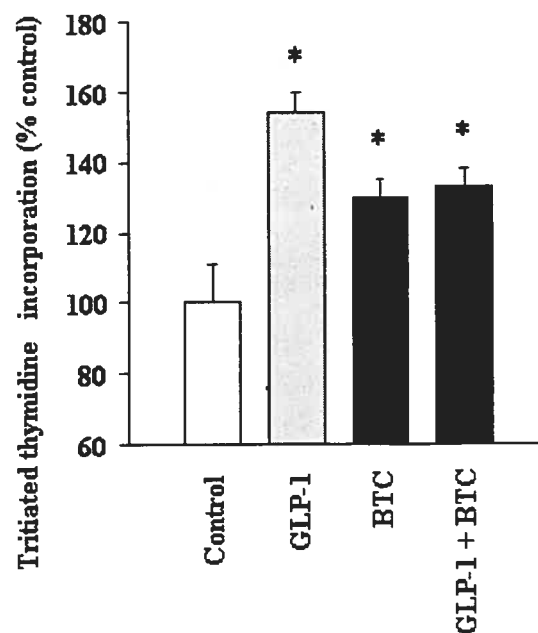


FIG 2. GLP-1- and betacellulin-induced INS(832/13)-cell proliferation are not additive. [^3H]-thymidine incorporation measurements were carried out as described in Fig 1. Cells were cultured at 3 mM glucose for 24 h in serum free RPMI medium in the presence or absence of 10 nM GLP-1 and/or 5 ng/ml betacellulin (BTC). Means values \pm SE of 3 experiments, each comprising 4 wells. *, $p < 0.05$.

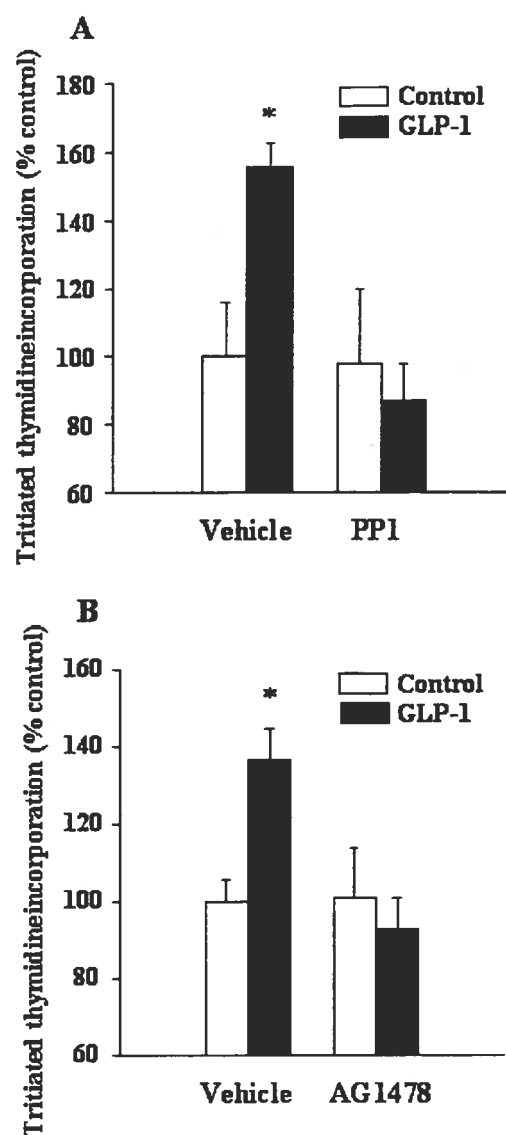


FIG 3. Effects of c-Src and EGFR inhibitors on GLP-1-induced proliferation in isolated rat pancreatic islets. Rat islets were cultured for 24 h at 3 mM glucose in serum free RPMI in the absence or presence of 10 nM GLP-1, with or without 10 μ M PP1 (panel A) or 250 nM AG1478 (panel B). Then, 6 μ Ci/well of [3 H]-thymidine were added and the islets were further incubated for 6 h. Data represent means \pm SE of 3 experiments. *, $p < 0.001$.

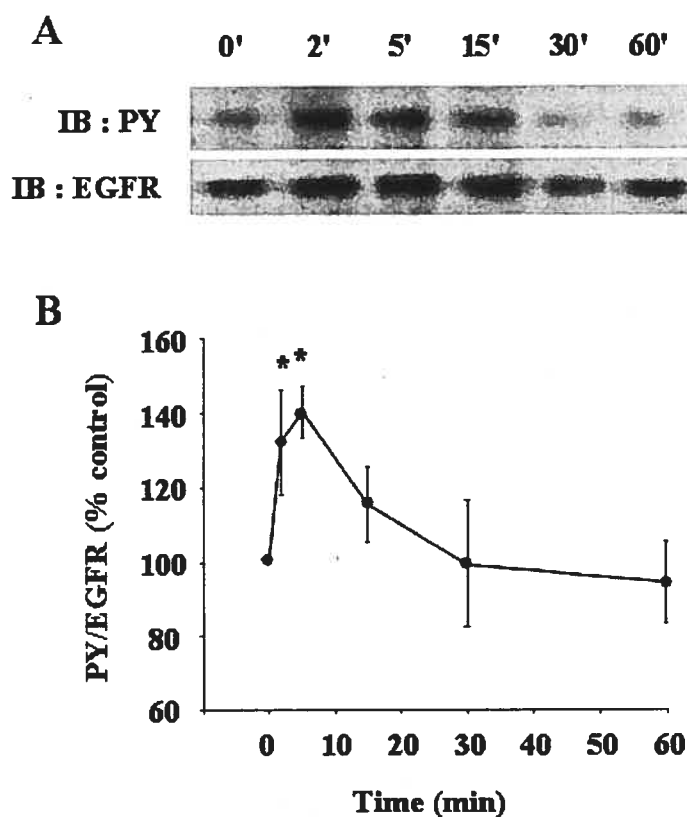


FIG 4. GLP-1 induces transient EGFR tyrosine phosphorylation in INS(832/13) cells. Cells were incubated at 3 mM glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1 for the indicated time periods. Cells were then lysed and EGFR was immunoprecipitated from total proteins extracts to perform Western blot analyses. A) A representative immunoblot for phosphotyrosine and EGFR is shown. IB, immunoblot; PY, phosphotyrosine. B) Western analysis of PY and EGFR were quantitated and the data expressed as PY/EGFR ratios (percent of the time zero control). Means \pm SE of 4 different experiments, each comprising duplicata. *, $p < 0.05$.

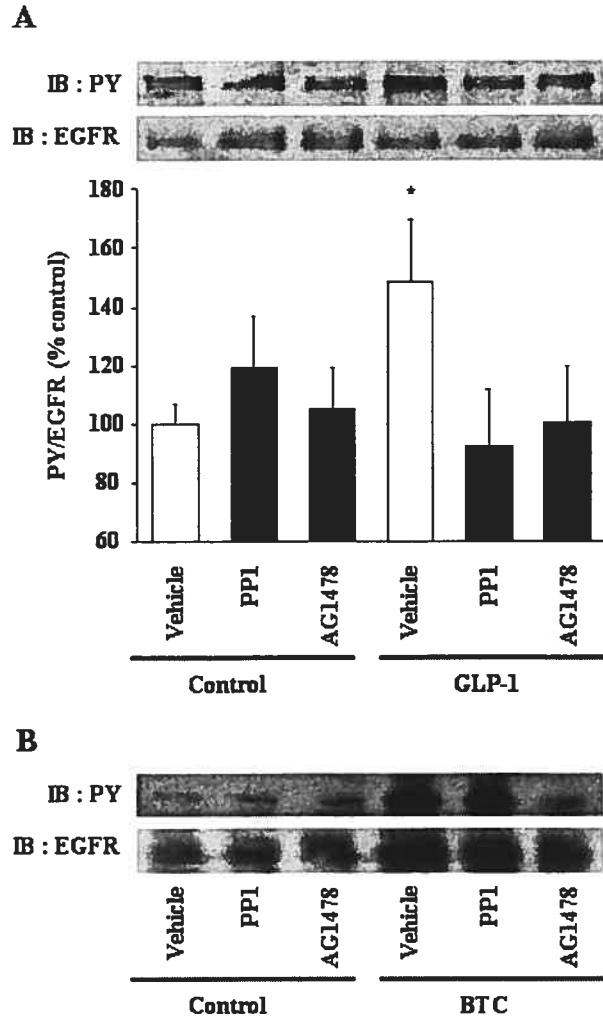


FIG 5. GLP-1 induces EGFR transactivation via a c-Src-dependent mechanism. INS cells were incubated for 5 min at 3 mM glucose in the presence or absence of 10 nM GLP-1 (panel A) or 5 ng/ml betacellulin (BTC) (panel B) with or without pharmacological inhibitor (10 μ M PP1 or 250 nM AG1478 added 30 min prior to incubations). Cells were then lysed and EGFR were immunoprecipitated from total protein extracts to perform Western blot analysis. Representative immunoblots for phosphotyrosine and for EGFR are shown. IB, immunoblot; PY, phosphotyrosine.

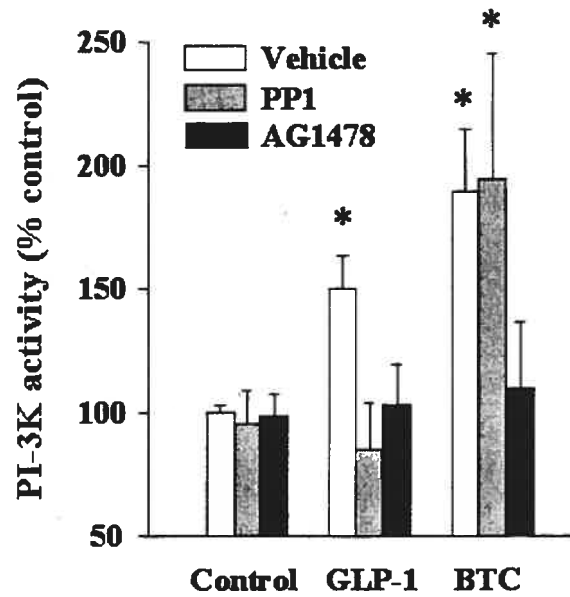


FIG 6. Effects of c-Src and EGFR inhibitors on GLP-1- and betacellulin-induced PI-3K activation. Cells were incubated for 5 min in 3 mM glucose KRBH in the absence or presence of 10 nM GLP-1 or 5 ng/ml betacellulin (BTC), with or without pharmacological inhibitors (10 μ M PP1 or 250 nM AG1478). PI3-K was assayed as described in "Methods". Data represent means \pm SE of 3 experiments. *, p at least <0.05.

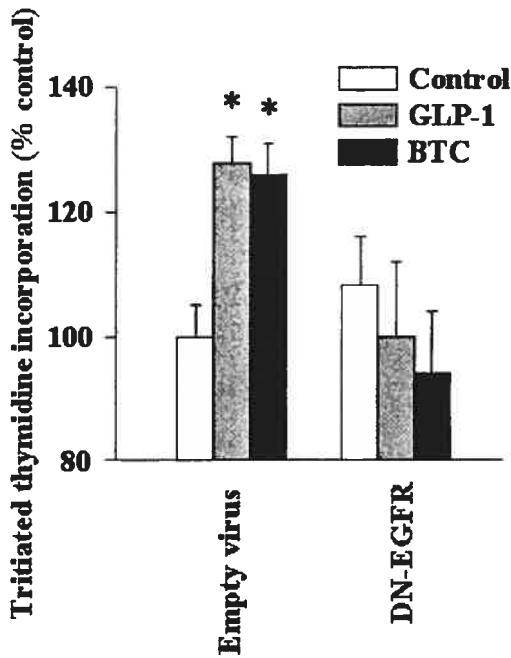


FIG 7. Effects of retroviral overexpression of a dominant negative EGFR on GLP-1-induced proliferation in INS(832/13) cells. Cells were infected as detailed in “Methods” for overexpression of a dominant-negative (DN) EGFR constructs or with the empty virus as control. 24 h post-infection, cells were washed and cultured at 3 mM glucose for 24 h in serum free RPMI medium in the presence or absence of 10 nM GLP-1 to perform [³H]- thymidine incorporation assays as described in Fig. 1. Means values ± SE of 3 separated experiments, each comprising 3-4 wells. *, p <0.02.

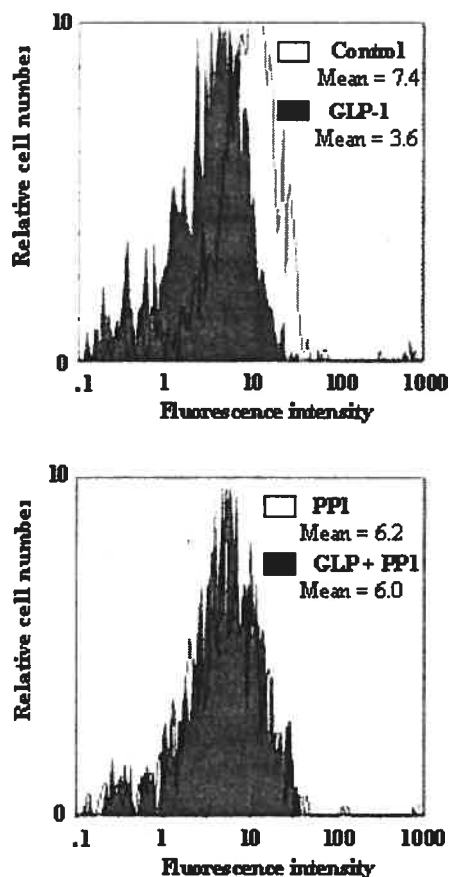


FIG 8. Flow cytometric analysis of cell-surface associated betacellulin. Cells were incubated for 5 min in 3 mM glucose KRBH in the absence or presence of 10 nM GLP-1, without (top panel) or with (bottom panel) 10 μ M PP1. Cells were then labeled for BTC content evaluation as described in “Methods” and FACS analyses were conducted. A representative experiment that has been repeated 3 times is shown.

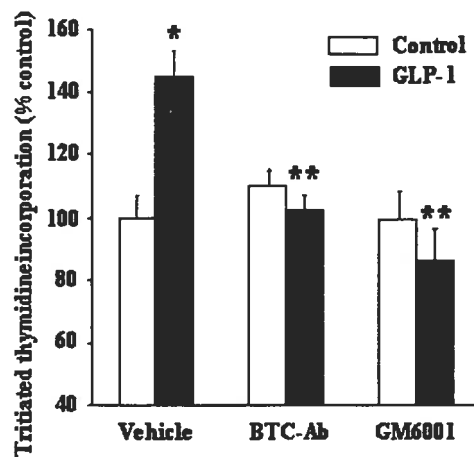


FIG 9. An anti-BTC neutralizing antibody and a metalloproteinase inhibitor suppress GLP-1-induced DNA synthesis in INS(832/13) cells. [³H]-thymidine incorporation measurements were carried out as described in Fig 1. Cells were cultured at 3 mM glucose for 24 h in RPMI medium in the absence or presence of 10 nM GLP-1 with or without an anti-BTC antibody (BTC-Ab) (0.25 μ g/mL) or 2.5 μ M GM6001 (Ilomastat), a pan-specific metalloproteinase inhibitor. Means values \pm SE of 3 experiments, each comprising 4 wells. *, significantly different from control, $p < 0.05$; **, significantly different from the GLP-1 treatment condition in the absence of inhibitor, $p < 0.001$.

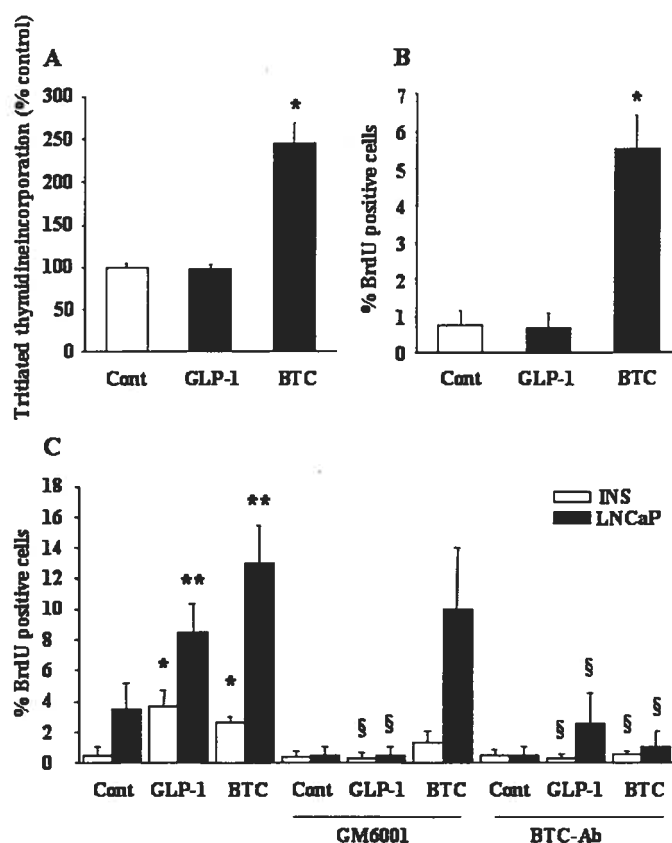


FIG 10. GLP-1 increases the proliferation of the prostatic cancer cell-line LNCaP when co-cultured with INS(832/13) cells. A, LNCaP cells were cultured in the absence or presence of GLP-1 (10 nM) or betacellulin (BTC) (5 ng/ml) as described for INS(832/13) cells, and [³H]-thymidine incorporation measurements were carried out as described in Fig 1. Means \pm SE of 3 experiments, each comprising 4 wells. *, $p < 0.001$. B, LNCaP cells were incubated with or without 10 nM GLP-1 or betacellulin (BTC) (5 ng/ml) and labeled with BrdU for the last hour of a 24 h incubation period. Cells were visualized under a fluorescence microscope for their immunofluorescence staining. Means values \pm SE of 3 experiments, each totalizing approximately 100 cells per condition. *, $p < 0.002$. C, INS cells and LNCaP cells were co-cultured at a 5:1 ratio and BrdU labelling and incorporation assay was conducted as described in B, in the absence or presence of 10 nM GLP-1 or 5 ng/ml

BTC with or without an anti-BTC neutralizing antibody (BTC-Ab) (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or 2.5 μM GM6001, a metalloproteinase inhibitor. Means values \pm SE of 3 experiments, each totalizing more than 200 cells per condition. *, significantly different from the INS control condition, $p < 0.01$; **, significantly different from the LNCaP control condition, p at least < 0.05 ; \S , significantly different from the corresponding conditions without inhibitor, p at least < 0.05 .

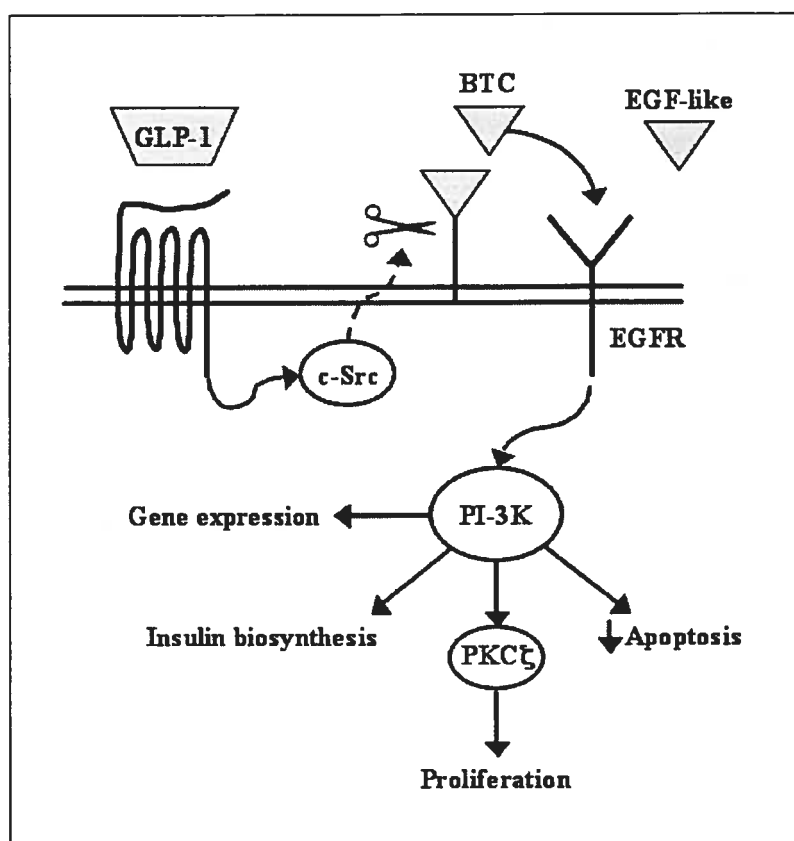


FIG 11. Model illustrating the mode of action of GLP-1 on PI-3K signaling and β -cell proliferation. EGF-like, EGF-like ligand; BTC, betacellulin; EGFR, EGF-receptor. See text for discussion.

Glucagon-Like Peptide-1 Prevents β -Cell Glucolipotoxicity Via Protein Kinase B/Akt

Jean Buteau*, **Wissal El-Assaad***, **Christopher J. Rhodes#**, **Lawrence Rosenberg¶**, **Erik Joly*** and **Marc Prentki*§**

From the *Molecular Nutrition Unit, Departments of Nutrition and Biochemistry, University of Montreal, the Centre de Recherche du CHUM and Institut du Cancer, Montreal, Quebec, Canada, the #Pacific Northwest Research Institute and Department of Pharmacology, University of Washington, Seattle, Washington, USA and the ¶Department of Surgery, McGill University and The Montreal General Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

Nous avons démontré au cours de nos études antérieures que le GLP-1 agit comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β en induisant la prolifération de cette dernière via la transactivation du récepteur à l'EGF et l'activation subséquente de la voie de signalisation PI-3K/PKC ζ . Un possible effet anti-apoptotique du GLP-1, conjuguée à son action sur la prolifération cellulaire, est une perspective attrayante qui ajouterait de l'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans un traitement du diabète.

Au cours de cette étude, nous démontrons que le GLP-1 prévient l'apoptose de la cellule β induite dans un contexte de glucotoxicité, de lipotoxicité et de glucolipotoxicité. L'effet anti-apoptotique du GLP-1 implique l'activation de PKB et de NF-kB, un facteur de transcription en aval de PKB.

Cette étude suggère que l'hormone gluco-incréatine joue un rôle clé dans la régulation de la masse de cellules β par divers mécanismes faisant intervenir la prolifération et la protection contre l'apoptose. De plus, elle ajoute de l'importance quant à l'utilisation du GLP-1 dans le traitement du diabète puisque la glucolipotoxicité

jouerait un rôle important dans la phase de décompensation de la cellule β . Enfin, elle révèle l'utilité du GLP-1 dans « l'expansion » et le maintien de la masse de cellules β en culture dans un programme de transplantation d'îlots.

Contribution des coauteurs :

W. El-Assaad : Mise au point des conditions de culture cellulaire

C. J. Rhodes : Préparation des adénovirus

L. Rosenberg : Isolation et purification d'îlots pancréatiques humains

E. Joly : Supervision du travail et participation aux études de RT-PCR

The abbreviations used are: BSA, bovine serum albumin; BP, base pair; CA, constitutively active; DN, dominant negative; DTT, dithiothreitol; EGFR, epidermal growth factor receptor; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FFA, free fatty acids; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GFP, green fluorescent protein; IAP, inhibitor of apoptosis protein; iNOS, inducible nitric oxide synthase; KRBH, Krebs-Ringer bicarbonate HEPES medium; MOI, multiplicity of infection; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PBS, phosphate buffered saline; PDX-1, pancreatic and duodenal homeobox gene-1; PI-3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TUNEL, TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling.

SUMMARY

We have provided evidence that glucagon-like peptide-1 (GLP-1), a potential therapeutic agent in the treatment of diabetes, activates phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)/protein kinase B (PKB) signaling in the pancreatic β -cell. Since this pathway promotes cell survival in a variety of systems, we have tested whether GLP-1 protects β -cells against elevated glucose- and/or free fatty acids (FFA)-induced cytotoxicity. GLP-1 prevented β -cell apoptosis induced by both elevated concentrations of glucose (glucotoxicity) and palmitate (lipotoxicity) singly or combined (glucolipotoxicity), in human pancreatic islets and INS832/13 cells. Overexpression of a dominant-negative PKB suppressed the anti-apoptotic action of GLP-1 in INS832/13 cells, whereas a constitutively active PKB prevented β -cell apoptosis induced by elevated glucose and palmitate. GLP-1 enhanced NF- κ B DNA binding activity and stimulated the expression of IAP-2 and Bcl-2, two anti-apoptotic genes under the control of NF- κ B. Inhibition of NF- κ B by BAY 11-7082 abolished GLP-1 prevention of glucolipotoxicity. The results demonstrate a potent protective effect of GLP-1 on β -cell gluco-, lipo-, and glucolipotoxicity, which is mediated via PKB activation and possibly its downstream targets NF- κ B.

INTRODUCTION

Calorigenic nutrients, in particular glucose and free fatty acids, are the principal regulators of pancreatic β -cell function (reviewed in (1-4)). On the one hand, short term exposure of the β -cell to elevated concentrations of glucose promotes insulin release and enhances insulin biosynthesis (1,5). However, on the longer term, chronic hyperglycemia causes β -cell dysfunction that is characterized by reduced insulin biosynthesis (6) and increased levels of apoptosis (so-called glucotoxicity) (7-11). Similarly, acute exposure of the β -cell to free fatty acids potentiates glucose-induced insulin secretion (12), whereas prolonged exposure to high concentrations of FFA also triggers β -cell apoptosis (lipotoxicity) (13-17). A recent study showed that protein kinase B (PKB) activation can rescue MIN cells from oleate cytotoxicity (18). We initially developed the concept of "glucolipotoxicity" proposing that elevated glucose and free fatty acids could have synergistic deleterious effects on the β -cell (2,3,19). Glucolipotoxicity might play an important role in the β -cell decompensation phase during the development of obesity-associated type 2 diabetes since the effect of post-prandial and subsequently persistent hyperglycemia added to the high levels of plasma free fatty acids and triglycerides could lead to β -cell apoptosis and impaired β -cell function (3,4).

Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide (GLP-1), a potent glucocretin hormone (20-22) secreted by the intestinal L-cells in response to fat meals and carbohydrates (23), is a potentially important drug in the treatment of type 2 diabetes in view of its ability to improve insulin secretion in both subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus (24,25). GLP-1 is also an insulinotropic agent through its ability to stimulate insulin gene expression and proinsulin biosynthesis (26). In addition, GLP-1 induces several immediate-early response genes and proto-oncogenes in β -cell that are implicated in cell growth/apoptosis control such as c-fos, c-jun, junD and nur77 (27,28). GLP-1 increases the DNA binding activity and the expression level of the β -cell specific transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) (29,30) which is implicated in the regulation of the expression of the insulin, GLUT2 and

glucokinase genes and β -cell differentiation (31-33). GLP-1 mobilizes intracellular Ca^{2+} (34,35) via cAMP guanine nucleotide exchange factor 2 (Epac) (36), an effect that may contribute to the insulinotropic action of the peptide. Moreover, this glucocretin hormone increases islet mass in mouse pancreas *in vivo* (30,37) and causes *in vitro* β -cell proliferation via a transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the subsequent activation of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)/protein kinase C ζ (PKC ζ) signaling pathway in β (INS-1)-cells (29,38,39). Finally, GLP-1 has recently been shown to delay β -cell apoptosis in Zucker diabetic rats, an animal model of diabetes (37), as well as in streptozotocin-treated mice and cytokines-treated rat islets *in vitro* (40).

The aim of the present study was to investigate whether GLP-1 prevents β -cell glucolipotoxicity and, if so, gain insight into the mechanism of its anti-apoptotic effect. The results indicate that GLP-1 potently prevents β -cell cytotoxicity in human islets and INS832/13 cells by a mechanism involving PKB and its downstream targets nuclear factor- κ B (NF- κ B).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents- Human glucagon-like peptide-1 fragment 7-36 amide was obtained from Bachem (Torrance, CA). RPMI 1640 and the cell culture supplements, including fetal calf serum (FCS), were purchased from Gibco BRL (Burlington, ONT). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA).

Human Islet Isolation and Culture- Human islets were isolated from 6 organ donors at the Department of Surgery, Montreal General Hospital, McGill University Health Center. Islets were separated from the surrounding exocrine tissue by enzymatic digestion with 2.5 mg/ml Liberase CI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) in Hank's balanced salt solution supplemented with 0.1mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim) at 37°C using a semiautomated technique. Purification was achieved by density gradient separation in a three-step discontinuous EuroFicoll gradient using a CORE 2991 Cell Processor (COBE BCT, Denver, CO). The purity was more than 90% as observed by dithizone staining. Islets were then cultured overnight in regular RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 10mM HEPES, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified (5% CO₂, 95% air). The next day, intact islets were either directly used and treated with the different substances to be tested or dispersed in single cells and small clusters of cells by trypsinization and attached on poly-ornithine glass coverslips as described before (Buteau 2000) before being incubated under various experimental conditions. Apoptosis was studied by three different methods measuring chromatin condensation, DNA fragmentation and release of histone-associated mono- and oligonucleosomes according to protocols described below. Both glucose- (basal 3 mM and stimulated 16 mM) and KCl (30 mM)-induced insulin secretion were assessed routinely on islets from donors after isolation to ensure the healthy state of the islets.

Cell Culture and Incubation- INS832/13 cells (41) (passages 36-70) were grown in monolayer cultures as described previously (42) in regular RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 1 mM

sodium pyruvate, 50 μ M β -mercaptoethanol at 37 °C in a humidified (5% CO₂, 95% air) atmosphere. This clone (832/13) of INS-1 cell was used because it shows better differentiation characteristics in term of glucose-stimulated insulin secretion than the original INS-1 cell line (41).

Dispersed human islet cells and INS832/13 cells were plated on poly-ornithine-treated glass coverslips at 80% confluency in 6-well plates as described before (38). Following a preincubation in complete RPMI medium containing 11 mM glucose and 10% serum for 24 h, cells were washed with PBS and incubated for 24 h at 5 or 25 mM glucose in RPMI containing 1% FCS (referred as incubation medium) in the presence of either 0.5% BSA or 0.4 mM palmitate bound to 0.5% BSA, with or without 10 nM GLP-1.

Fluorescence Microscopy Analysis of Cell DNA Staining with HOECHST 33342 and with TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL)- Apoptosis indexes were assessed by counting Hoechst 33342 (chromatin condensation) and TUNEL (DNA fragmentation) positive cells using a fluorescein in situ cell death detection kit from Roche according to manufacturer's protocol with few modification. In brief, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, washed with PBS and incubated in permeabilization solution containing 0.1% Triton X-100 in PBS for 2 min at room temperature. Cells were blocked with 1% BSA in PBS for 10 min, incubated for 1 h with TUNEL reaction mixture containing a mouse anti-insulin (10 μ g/ml) primary antibody (Sigma, St. Louis, MO) (in order to distinguish β -cells from non- β -cells). After several washes with PBS, cells were stained with a rhodamine-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove, CA). Hoechst staining was performed by exposing the slides to 0.5 mg/ml Hoechst 33342 for 10 min at room temperature. Slides were then washed several times with PBS and mounted with antifade. The fluorescence of Hoechst, TUNEL and bound anti-insulin antibodies was visualized under a fluorescence microscope at 400X magnification. At least 200 cells were analyzed for each experimental condition.

DNA Fragmentation Measurements- Fifty intact human islets of similar size or 80 % confluent INS832/13 cells were seeded and incubated for 24 h in 6-well

plates. DNA fragments were quantified using the Cell Death Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Plus Kit from Roche (Laval, QC) that allows the specific determination of mono- and oligonucleosomes generated by apoptotic cleavage of DNA. After the incubation period, human islets or INS832/13 cells were washed and incubated in a lysis buffer for 30 min at room temperature according to manufacturer's protocol. After a centrifugation (20,000xg for 10 min) to discard cell nuclei and unfragmented DNA, samples were placed in a streptavidin-coated microtiter plate and incubated with a mixture of biotin-labeled anti-histone and anti-DNA conjugated to peroxidase antibodies. After 3 washes, the amount of nucleosomes (quantified photometrically by peroxidase activities) was determined on a FLUOstar Optima microplate reader (BMG, Durham, NC) at 405 nm.

Adenovirus Infections- Dominant negative PKB (DN-PKB) and constitutively active PKB (CA-PKB) (18) overexpression was conducted as previously published for other adenoviral constructs (38). INS832/13 cells were seeded 2 days before use in 6-well plates and cultured in regular RPMI as described above. Cells were then infected with different adenoviral constructs (DN-PKB, CA-PKB, or green fluorescent protein (GFP) as control at a MOI of 10 pfu/cell for 4 h in 0.5 ml of regular RPMI medium containing 10 % FCS). 1.5 ml of the same RPMI medium was then added to each well and cells were allowed to rest for 20 h before being incubated under various conditions as described above.

Nuclear Extracts and Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)- Preparation of nuclear extracts and EMSA were performed as described elsewhere (29). Briefly, cells (40×10^6 per condition) previously grown in 225 cm² petri dishes were harvested using a rubber policeman, washed in cold PBS, sedimented at 3,500xg for 4 min and lysed in 1 ml of ice-cold buffer A (15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 0.5% Nonidet P-40). After a 10 min incubation on ice, nuclei were collected by centrifugation (1,000xg for 5 min) and washed with buffer A without Nonidet P-40. Nuclei were lysed in 10 µl of a buffer containing 2 mM KCl, 25 mM HEPES, 0.1% EDTA, and 1 mM dithiothreitol (DTT). After a 15 min incubation period on ice, 0.3 ml of a buffer containing 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 0.1% PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 0.1 mM

EDTA, and 11% glycerol was added to the nuclei preparation. Samples were centrifuged (16,000xg, 20 min at 4 °C) and the supernatants containing the nuclear proteins were used for protein determination, subsequently aliquoted (50µl), and kept frozen at -70°C for further analysis. The oligonucleotides used to assess the binding activities of NF-κB were purchased from ACGT (Toronto, ONT). A 24-mer oligonucleotide (GCCATGGGGGGATCCCCGAAGTCC) containing a NF-κB consensus recognition sequence (underlined) was used to measure NF-κB DNA binding activity. After annealing, the double-stranded oligonucleotides were end-labeled with [γ^{32} P]-ATP and 5 µg of protein extracts were incubated with a radiolabeled probe (20,000 cpm per sample) for 20 min at room temperature in a buffer containing 25 mM HEPES, 10% glycerol, 50 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40, and 1 mM DTT. A 50-fold molar excess of cold oligonucleotide was added with the labeled probe to assess the specificity of nuclear protein binding of the EMSA. Supershift assay was performed using anti-p50 and anti-p65 antibodies from SantaCruz (Santa Cruz, CA). Samples were analyzed on 4% nondenaturing polyacrylamide gels containing 0.01% Nonidet P-40 and relative intensities of shift bands were quantitated by densitometry.

RNA Isolation and Reverse Transcription-PCR Analysis- RT-PCR was performed to quantify mRNA expression of NF-κB-regulated genes. Total RNA was isolated and first strand cDNA were synthesized using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen Canada, Burlington, ON) and hexamers as described previously (43) from INS832/13 cells treated as mentioned above. Amplification of rat β-actin, IAP-2 and Bcl-2 were done using *taq* polymerase (Invitrogen Canada, Burlington, ON) and 1.5mM MgCl₂ in 50µl assay format, and using a PTC-100 thermocycler from MJ Research (Watertown, MA) set with the following parameters: β-Actin, 94°C for 30s, 63°C for 40s, 72°C for 40s and 28 cycles; IAP-2 and Bcl-2, 94°C for 40sec, 52°C for 40sec, 72°C for 40sec, and 29 cycles. To ensure working in the linearity of the amplification, the number of cycles used for each genes under study was selected according to a pilot experiment performed with cDNAs derived from cells having similar expression levels. The primer sequences and their respective PCR product lengths were as follows : β-actin, forward (5'-

GTGCCCATCTATGAGGGTTACGCG-3'), reverse (5'-
 GGAACCGCTCATTGCCGATAGTG-3'), fragment (275bp); IAP-2, forward (5'-
 TTGCTTGGAGTACACATACAC-3'), reverse (5'-
 CAGCTCTACTAAGACTACAG-3'), fragment (382bp); Bcl-2, forward (5'-
 AGATCGTGATGAAGTACATCC-3'), reverse (5'-
 TAGCGACGAGAGAAGTCATC-3'), fragment (277bp). After amplification, 5 μ l of
 PCR products was subjected to electrophoresis on 1.0% agarose gels followed by
 Southern blotting on Zeta-probe GT membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules,
 CA). A specific oligonucleotide probe for each gene under study was end-labeled
 with T4 polynucleotide kinase (Amersham Biosciences, Montreal, QC) and γ^{32} P-ATP
 (Amersham Biosciences, Montreal, QC), and used to hybridize the Southern blots.
 The probes were: β -actin (5'-TCATGCCATCCTGCGTCTGGACCT-3'); IAP-2 (5'-
 CTGTCTGTTGACCAGATG-3'); Bcl-2 (5'-AGTGGGATACTGGAGAT-3').
 Southern blots were extensively washed and analyzed by autoradiography. For each
 gene studied, only one specific signal at the expected length was detected. Signals
 were quantified by densitometry analysis of the autoradiograms. IAP-2 and Bcl-2
 expression levels were normalized for β -actin expression.

Preparation of FFA bound to BSA- The sodium salt of palmitic acid was
 dissolved at 37 °C overnight in KRBH containing 5% fatty-acid free BSA to obtain a
 5 mM stock solution. The molar ratio of fatty acid to BSA is 6:1. At the end of the
 incubation, the stock solution was filtered through a 0.2 μ m filter. Then, the
 concentration of palmitate was measured with a commercially available kit (Wako
 Chemicals, Richmond, VA) and adjusted to 0.4 mM with 0.5% KRBH.

Calculations and statistics- Data are expressed as means \pm SE and statistical
 significance was evaluated by analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni post-
 test. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

GLP-1 protects human islet cells and INS832/13 cells from gluco-, lipo-, and glucolipotoxicity- To test the possible anti-apoptotic effect of GLP-1 on β -cell glucolipotoxicity, dispersed human islet cells were exposed for a period of 24 h to 5 or 25 mM glucose with or without 0.4 mM palmitate in the presence or absence of 10 nM GLP-1 (Fig 1). The effect of GLP-1 on glucose- and fatty acid-induced apoptosis was investigated by different techniques. Chromatin condensation was assessed by HOECHST 33342 staining, and DNA fragmentation was studied by TUNEL and ELISA assays. Fig 1A shows the percentages of apoptotic cells as determined by HOECHST staining in dispersed human islet cells. The use of dispersed islet cells allows the identification of individual β -cells and thus the quantification of apoptosis among the different populations of islet cells. In general, the percentages of apoptotic cells were similar in all populations of cells (β - and non- β -cells). It can also be observed that exposing the cells to 0.4 mM palmitate increased basal cell death to 30% compared to 18% under basal condition. The addition of GLP-1 completely prevented lipotoxicity. The relatively high basal level of apoptosis is similar to that reported previous studies in isolated intact human islets (9%) (14) or after dispersion (22%) (10) and might be due in part to the stress imposed by the dissociation process and central necrosis of islets following their isolation. High glucose concentration (25mM) caused a slight but not statistically significant increase in cell death. Again, GLP-1 treatment decreased islet cells apoptosis in presence of 25 mM glucose but the result was not statistically significant. The combination of both high glucose and palmitate increased cell death to 50%, revealing a synergistic action of the two calorogenic nutrients, consistently with the glucolipotoxicity concept (3). GLP-1 treatment also prevented β -cell glucolipotoxicity as cell death decreased to 20%.

Fig 1B shows the results for determination of apoptosis as evaluated by TUNEL assay in dispersed human islet cells cultured as described above. The results were qualitatively similar than those obtained with HOECHST staining.

The effect of GLP-1 on glucolipotoxicity was also investigated in intact human islets by measuring the fragmentation of DNA using an ELISA assay that

allows determination of mono- and oligonucleosomes generated specifically by apoptotic cleavage of DNA (Fig 1C). With respect to the action of GLP-1 on the tested glucolipotoxicity situation, data were similar to those obtained in FIG 1A and B with isolated islet cells, indicating that GLP-1 prevented glucolipotoxicity in intact human islets.

Due to the low availability of human islet tissue and the requirement of high amount of biological material to perform some biochemical analyses related to signal transduction, INS832/13 cells were used to gain further insight into the molecular mechanism by which GLP-1 could exerts its anti-apoptotic effect with respect to toxicity induced by chronic elevated glucose and palmitate. As for human islet cells, GLP-1 treatment decreased INS832/13 cells apoptosis induced by both elevated glucose and palmitate, singly or combined (Fig 1D). The results indicate that INS832/13 cell line is a suitable model for the study of the molecular mechanism by which GLP-1 prevents glucolipotoxicity.

The anti-apoptotic action of GLP-1 on β -cell glucolipotoxicity is mediated via the PKB signaling pathway- PKB has been identified as an important component of pro-survival signaling pathways (44) and more relevant, a constitutively active PKB construct has been shown to prevent lipotoxicity induced by oleate in INS-1 cells (18). As we and others previously showed that GLP-1 increases PKB activity in β -cells (38,45), we therefore tested a possible implication of PKB in the GLP-1 anti-apoptotic action on β -cell glucolipotoxicity. Under the present experimental conditions, the following values of PKB activity were observed in the absence or presence of GLP-1 (10 nM) following a 15 min incubation period. Basal (3 mM glucose): 100 ± 7 %; GLP-1: 176 ± 37 %, $p < 0.02$. Adenoviral constructs were used to increase the expression level of various PKB mutant proteins (DN-PKB or CA-PKB) in INS832/13 cells before investigating the anti-apoptotic action of GLP-1 by HOECHST staining (Fig 2). GFP was used as control. The results in Fig 2 show that GLP-1 completely rescued from lipo-, gluco-, and glucolipotoxicity in control INS832/13 cells infected with an adenovirus encoding the GFP. Overexpressing a DN-PKB slightly increased basal level of apoptosis but totally counteracted the anti-apoptotic action of GLP-1 on lipo-, gluco-, and glucolipotoxicity. In contrast, the

CA-PKB construct completely abolished INS832/13 cells apoptosis at 5 mM glucose as well as at 25 mM glucose in the presence of 0.4 mM palmitate. The addition of GLP-1 did not further decreased apoptosis. The data strongly support the view that the anti-apoptotic action of GLP-1 on glucolipotoxicity implicates PKB activation and signaling via its downstream targets.

A role for NF- κ B in the anti-apoptotic action of GLP-1- NF- κ B has been documented to be a downstream target of PI-3K/PKB signaling in several systems. The effect of GLP-1 on NF- κ B DNA binding activity was assessed by EMSA (Fig 3). The results show that GLP-1 treatment of INS832/13 cells increased NF- κ B DNA binding activity by about 80% after a 2 h incubation period at either high or low glucose, with or without palmitate. Neither palmitate nor glucose significantly changed basal and GLP-1-induced NF- κ B DNA binding activity. Both anti-p50 and anti p-65 antibodies partially reduced the intensity of the shifted band when used in a supershift assay (not shown), suggesting that the NF- κ B complex could implicate a variety of dimerization partners.

In an attempt to determine whether GLP-1-induced increased in NF- κ B DNA binding activity could account for the anti-apoptotic action of GLP-1, an irreversible pharmacological inhibitor of I κ B phosphorylation (BAY 11-7082) was used. Thus, inhibition of I κ B phosphorylation and degradation results in the inactivation of NF- κ B. As shown in Fig. 4, BAY 11-7082 increased basal level of apoptosis as well as apoptosis induced by the combined presence of elevated glucose and palmitate. Such potentiation of stimuli-induced apoptosis with inhibition of NF- κ B has been previously reported in other cell systems (46-49). This result suggests that the inhibition of NF- κ B by the pharmacological inhibitor BAY 11-7082 may "sensitize" cells to potential injuries. The presence of BAY 11-7082 totally abolished the preventive effect of GLP-1 on glucolipotoxicity. Similar observations were made when INS832/13 cells were treated with high glucose or palmitate alone where the addition of BAY 11-7082 suppressed GLP-1 anti-apoptotic effect in two separate experiments (data not shown).

We next investigated the effect of GLP-1 on the expression level of IAP-2 and Bcl-2, two key anti-apoptotic genes whose expression has been shown to be under

the control NF- κ B (50,51). Fig 5 shows that GLP-1 treatment increased the expression level of both IAP-2 and Bcl-2, regardless the glucose concentration and the presence of pamate.

DISCUSSION

Using complementary pharmacological, biochemical and molecular biology approaches, we provide evidence that GLP-1, a glucocretin hormone that is considered for diabetes treatment (24,25) prevents glucose- and palmitate-induced apoptosis in the β -cell by a mechanism involving PKB and its downstream target NF- κ B.

Recent studies have investigated the effect of chronic elevated glucose and FFA on β -cell function (4). On the one hand, long-term exposure of the β -cell to high glucose induces glucose desensitization, depletion of the readily releasable pool of insulin and may cause apoptosis (glucotoxicity) (52). On the second hand, long-term exposure of β -cell to FFA increases basal insulin release but inhibits glucose-induced insulin secretion (53). FFA also reduces glucose-induced insulin gene expression (54) and induces β -cell apoptosis (lipotoxicity) (55). Prentki and Corkey have proposed the glucolipotoxicity concept whereby glucose and fatty acids synergize in causing β -cell malfunction, due to the fact that high glucose inhibits fat oxidation and consequently lipid detoxification (1,2). The present study shows that GLP-1 prevents β -cell gluco-, lipo-, and glucolipotoxicity in human islets as well as in INS832/13 cells.

Recent studies by our group and others have shown that GLP-1, via the transactivation of the EGF receptor, activates the PI-3K/PKB signaling pathway (29,38,39,45), a cascade of signal transduction that has been shown to prevent apoptosis in several systems. Therefore, we aimed at investigating the implication of PKB in GLP-1 anti-apoptotic action. The overexpression of a dominant-negative PKB construct in INS832/13 cells suppressed the anti-apoptotic action of GLP-1 on gluco-, lipo-, and glucolipotoxicity. Overexpressing a constitutively active form of PKB abolished the cytotoxic effect of glucose and palmitate. This supports the view that GLP-1 prevents glucolipotoxicity, at least in part, via the activation of PKB and its downstream targets. Consistently with this result, PKB has been shown to play an important role in the regulation of β -cell mass. Indeed, two recent studies have demonstrated that transgenic mice expressing a constitutively active form of PKB

displayed significant increase in β -cell mass as compared to control animals (56,57). Moreover, these transgenic mice were protected from streptozotoin-induced diabetes. Both of these studies reported an increased β -cell neogenesis and at least in one of them, an increased β -cell proliferation (56). The present study, along with a previous one (18), shows an important role of PKB in the prevention of β -cell apoptosis. Therefore we suggest that PKB could play a key role in the regulation of β -cell mass via a complex mechanism that not only implies neogenesis and β -cell replication but in addition the prevention of apoptosis.

We have also examined the effects of GLP-1 on NF- κ B, a downstream target of PKB that plays a role in the control of apoptosis. The NF- κ B family of transcription factors is comprised of several proteins that act as homo- and heterodimers. In vertebrates, this family includes p50, p52, Rel-A (also known as p65), c-Rel and Rel-B. In most cells, NF- κ B complexes are present in the cytoplasm in their latent form, bound to the inhibitor I κ B. PKB, as well as other kinases rapidly phosphorylate I κ B to induce its ubiquitination and degradation by the 26S proteasome, releasing the active form of NF- κ B. Interestingly, I κ B is also a potential target for PKC ζ (58) that has been shown to be activated by GLP-1 (38). Upon its activation, NF- κ B will translocate to the nucleus to promote expression of stress-inducible genes that can be either pro- or anti-apoptotic depending on cell system and stimuli (reviewed in (59-62)). For instance, NF- κ B binding sites have been found in the promoter regions of pro-apoptotic genes like inducible nitric oxide synthase (iNOS) (63), cytokines (64), Fas and Fas-Ligand (65). Example of anti-apoptotic proteins whose expression are increased by NF- κ B are caspase inhibitors IAP-1, IAP-2 and XIAP (50), mitochondria membrane stabilizers, such as Bcl-2 (51), Bcl-xl and Bfl-1 (66), and cell-cycle regulatory proteins like cyclin D1 (67,68). The selectivity on the transcriptional response to NF- κ B will depend in part on the combinatorial response with other signaling pathway/transcription factors (61). In the present study, we show that GLP-1 activates NF- κ B independently of the glucose concentration or the presence of palmitate. Also, a pharmacological inhibitor of NF- κ B suppressed GLP-1 anti-apoptotic action and sensitized INS832/13 cells to subsequent stress (glucolipototoxicity). Such potentiation of stimuli-induced apoptosis by inhibition of

NF- κ B has been previously reported in various cell systems. Indeed, similar observations were made with the expression of a super-repressor form of I κ B (46,48,49) and the use of a pharmacological inhibitor as well as an inhibitory double-stranded oligonucleotide decoy for NF- κ B (47) that all increased percentages of cell death in response to a variety of stimuli. Thus, the data presented here suggest that NF- κ B is necessary for INS832/13-cell survival upon high glucose and FFA treatment as well as for GLP-1 anti-apoptotic response. In an attempt to identify the target genes of GLP-1-induced NF- κ B DNA binding activity, we have investigated the effect of GLP-1 on IAP-2 and Bcl-2 gene expression. GLP-1 treatment increased the expression level of both NF- κ B potential targets IAP-2 and Bcl-2. Although, additional work is required to conclusively define the exact role of NF- κ B in the protection against glucolipotoxicity, the data presented here suggest that GLP-1 may prevent β -cell glucolipotoxicity via the activation of NF- κ B DNA binding activity that would lead to an increase in IAP-2 and Bcl-2 gene expression.

In conclusion, the data demonstrate that GLP-1 prevents glucose- and palmitate-induced apoptosis, singly or combined, in human islet cells as well as in INS832/13 cells by a mechanisms that could imply PKB activation, enhanced NF- κ B DNA binding activity, and possibly increased IAP-2 and Bcl-2 gene expression. The anti-apoptotic action of GLP-1, added to its incretin effect, increases interests into its utilization as a therapeutical agent in the treatment of type 2 diabetes since GLP-1 could prevent β -cell apoptosis due to glucolipotoxicity that is thought to account for β -cell decompensation in the etiology of obesity-associated type 2 diabetes.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation Diabetes Center at McGill and University of Montreal and grants from the Canadian Institute of Health Research and the Canadian Diabetes Association (to MP). M.P. is a Canadian Institute of Health Research Scientist. J.B. was supported by a Canadian Institutes of Health Research Fellowship.

REFERENCES

1. Prentki, M. (1996) *Eur J Endocrinol* 134, 272-286
2. Prentki, M., and Corkey, B. E. (1996) *Diabetes* 45, 273-283
3. Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., and Roduit, R. (2002) *Diabetes* 51 Suppl 3, S405-413
4. Poitout, V., and Robertson, R. P. (2002) *Endocrinology* 143, 339-342
5. Alarcon, C., Wicksteed, B., Prentki, M., Corkey, B. E., and Rhodes, C. J. (2002) *Diabetes* 51, 2496-2504
6. Marshak, S., Leibowitz, G., Bertuzzi, F., Socci, C., Kaiser, N., Gross, D. J., Cerasi, E., and Melloul, D. (1999) *Diabetes* 48, 1230-1236
7. Donath, M. Y., Gross, D. J., Cerasi, E., and Kaiser, N. (1999) *Diabetes* 48, 738-744
8. Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P. A., and Donath, M. Y. (2002) *J Clin Invest* 110, 851-860
9. Efanova, I. B., Zaitsev, S. V., Zhivotovsky, B., Kohler, M., Efendic, S., Orrenius, S., and Berggren, P. O. (1998) *J Biol Chem* 273, 33501-33507
10. Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., Usellini, L., Nano, R., Bonini, P., Bertuzzi, F., Marlier, L. N., Davalli, A. M., Carandente, O., Pontiroli, A. E., Melino, G., Marchetti, P., Lauro, R., Sesti, G., and Folli, F. (2001) *Diabetes* 50, 1290-1301
11. Laybutt, D. R., Weir, G. C., Kaneto, H., Lebet, J., Palmiter, R. D., Sharma, A., and Bonner-Weir, S. (2002) *Diabetes* 51, 1793-1804
12. Warnotte, C., Gilon, P., Nenquin, M., and Henquin, J. C. (1994) *Diabetes* 43, 703-711
13. Maestre, I., Jordan, J., Calvo, S., Reig, J. A., Cena, V., Soria, B., Prentki, M., and Roche, E. (2003) *Endocrinology* 144, 335-345
14. Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patane, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M., Bergamini, E., Mosca, F., Di Mario, U., Del Prato, S., and Marchetti, P. (2002) *Diabetes* 51, 1437-1442

15. Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Levi, M., and Unger, R. H. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2498-2502
16. Briaud, I., Harmon, J. S., Kelpe, C. L., Segu, V. B., and Poitout, V. (2001) *Diabetes* 50, 315-321
17. Maedler, K., Spinas, G. A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., and Donath, M. Y. (2001) *Diabetes* 50, 69-76
18. Wrede, C. E., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., Briaud, I., and Rhodes, C. J. (2002) *J Biol Chem* 277, 49676-49684
19. Prentki, M., Roduit, R., Lameloise, N., Corkey, B. E., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (2001) *Can J Diab Care* 25, 36-46
20. Fehmann, H. C., Goke, R., and Goke, B. (1995) *Endocr Rev* 16, 390-410
21. Holz, G. G. t., Kuhlreiber, W. M., and Habener, J. F. (1993) *Nature* 361, 362-365
22. Thorens, B., and Waeber, G. (1993) *Diabetes* 42, 1219-1225
23. Drucker, D. J. (2001) *Endocrinology* 142, 521-527
24. Gutniak, M., Orskov, C., Holst, J. J., Ahren, B., and Efendic, S. (1992) *N Engl J Med* 326, 1316-1322
25. Holst, J. J. (2002) *Diabetes Metab Res Rev* 18, 430-441
26. Fehmann, H. C., and Habener, J. F. (1992) *Endocrinology* 130, 159-166
27. Susini, S., Roche, E., Prentki, M., and Schlegel, W. (1998) *Faseb J* 12, 1173-1182
28. Susini, S., Van Haasteren, G., Li, S., Prentki, M., and Schlegel, W. (2000) *Faseb J* 14, 128-136
29. Buteau, J., Roduit, R., Susini, S., and Prentki, M. (1999) *Diabetologia* 42, 856-864
30. Stoffers, D. A., Kieffer, T. J., Hussain, M. A., Drucker, D. J., Bonner-Weir, S., Habener, J. F., and Egan, J. M. (2000) *Diabetes* 49, 741-748
31. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994) *Nature* 371, 606-609
32. Oster, A., Jensen, J., Serup, P., Galante, P., Madsen, O. D., and Larsson, L. I. (1998) *J Histochem Cytochem* 46, 707-715

33. Waeber, G., Thompson, N., Nicod, P., and Bonny, C. (1996) *Mol Endocrinol* 10, 1327-1334
34. Holz, G. G., Leech, C. A., Heller, R. S., Castonguay, M., and Habener, J. F. (1999) *J Biol Chem* 274, 14147-14156
35. Tsuboi, T., da Silva Xavier, G., Holz, G. G., Jouaville, L. S., Thomas, A. P., and Rutter, G. A. (2003) *Biochem J* 369, 287-299
36. Kang, G., Chepurny, O. G., and Holz, G. G. (2001) *J Physiol* 536, 375-385
37. Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U., and Perfetti, R. (2002) *Endocrinology* 143, 4397-4408
38. Buteau, J., Foisy, S., Rhodes, C. J., Carpenter, L., Biden, T. J., and Prentki, M. (2001) *Diabetes* 50, 2237-2243
39. Buteau, J., Foisy, S., Joly, E., and Prentki, M. (2003) *Diabetes* 52, 124-132
40. Li, Y., Hansotia, T., Yusta, B., Ris, F., Halban, P. A., and Drucker, D. J. (2003) *J Biol Chem* 278, 471-478
41. Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and Newgard, C. B. (2000) *Diabetes* 49, 424-430
42. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992) *Endocrinology* 130, 167-178
43. Roduit, R., Morin, J., Masse, F., Segall, L., Roche, E., Newgard, C. B., Assimacopoulos-Jeannet, F., and Prentki, M. (2000) *J Biol Chem* 275, 35799-35806
44. Cross, T. G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M., and Lord, J. M. (2000) *Exp Cell Res* 256, 34-41
45. Trumper, K., Trumper, A., Trusheim, H., Arnold, R., Goke, B., and Horsch, D. (2000) *Ann N Y Acad Sci* 921, 242-250
46. Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R., and Verma, I. M. (1996) *Science* 274, 787-789
47. Sumitomo, M., Tachibana, M., Nakashima, J., Murai, M., Miyajima, A., Kimura, F., Hayakawa, M., and Nakamura, H. (1999) *J Urol* 161, 674-679
48. Wang, C. Y., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S., Jr. (1996) *Science* 274, 784-787

49. Muenchen, H. J., Lin, D. L., Walsh, M. A., Keller, E. T., and Pienta, K. J. (2000) *Clin Cancer Res* 6, 1969-1977
50. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr. (1998) *Science* 281, 1680-1683
51. Mattson, M. P., and Camandola, S. (2001) *J Clin Invest* 107, 247-254
52. Poitout, V., and Robertson, R. P. (1996) *Annu Rev Med* 47, 69-83
53. Segall, L., Lameloise, N., Assimacopoulos-Jeannet, F., Roche, E., Corkey, P., Thumelin, S., Corkey, B. E., and Prentki, M. (1999) *Am.J.Physiol.* 277, E521-E528
54. Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G., and Thorens, B. (1997) *J Biol Chem* 272, 30261-30269
55. Unger, R. H. (1995) *Diabetes* 44, 863-870
56. Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M., and Permutt, M. A. (2001) *J Clin Invest* 108, 1631-1638
57. Tuttle, R. L., Gill, N. S., Pugh, W., Lee, J. P., Koeberlein, B., Furth, E. E., Polonsky, K. S., Naji, A., and Birnbaum, M. J. (2001) *Nat Med* 7, 1133-1137
58. Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M. T., Alcami, J., and Paya, C. V. (1993) *Mol.Cell Biol.* 13, 4770-4775
59. Baldwin, A. S. (2001) *J Clin Invest* 107, 241-246
60. Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999) *Oncogene* 18, 6910-6924
61. Pahl, H. L. (1999) *Oncogene* 18, 6853-6866
62. Chen, F., Castranova, V., and Shi, X. (2001) *Am J Pathol* 159, 387-397
63. Taylor, B. S., de Vera, M. E., Ganster, R. W., Wang, Q., Shapiro, R. A., Morris, S. M., Jr., Billiar, T. R., and Geller, D. A. (1998) *J Biol Chem* 273, 15148-15156
64. Hiscott, J., Marois, J., Garoufalos, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G., and et al. (1993) *Mol Cell Biol* 13, 6231-6240
65. Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A., and Ju, S. T. (1998) *J Immunol* 161, 3469-3473

66. Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J., and Cheng, G. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9136-9141
67. Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. (1999) *Mol Cell Biol* 19, 2690-2698
68. Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., and Baldwin, A. S., Jr. (1999) *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799

FIGURES

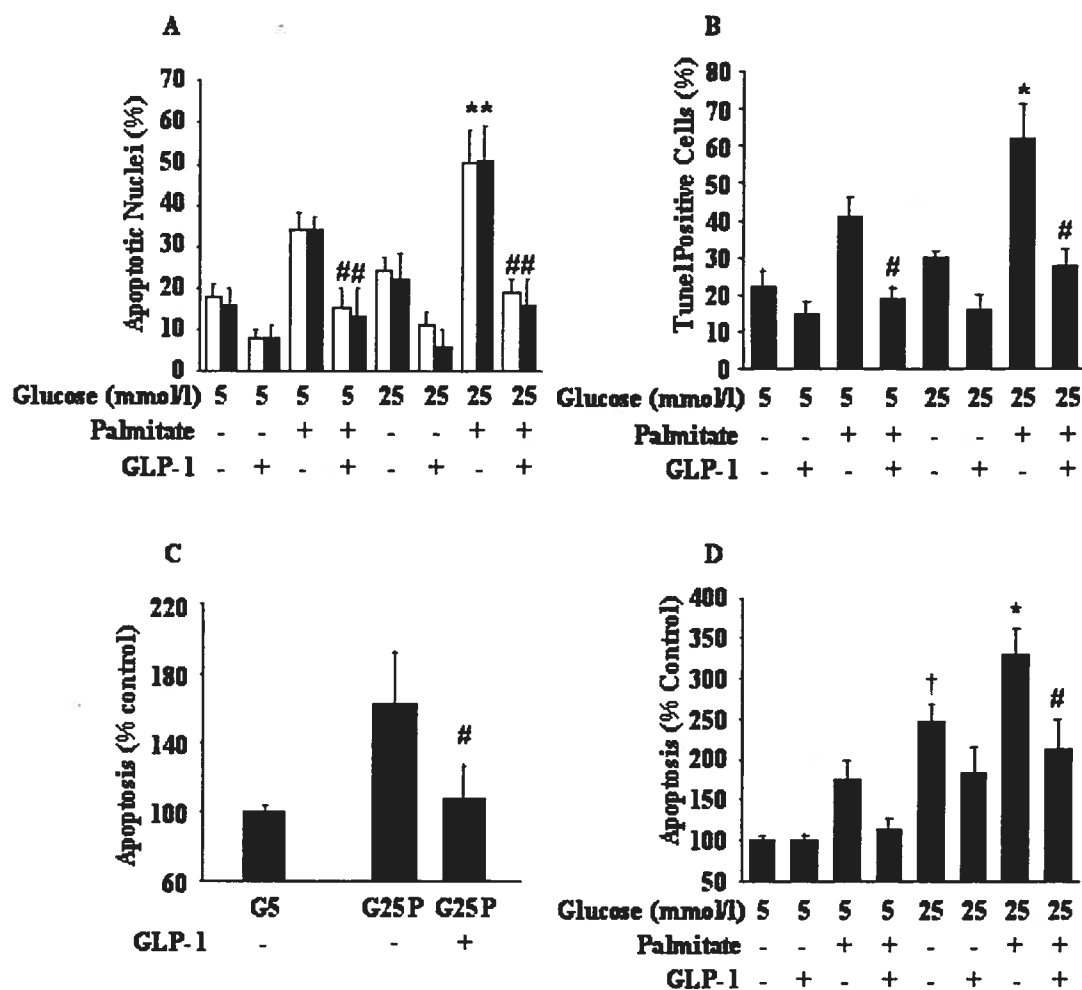


Fig.1. GLP-1 prevents gluco-, lipo- and glucolipototoxicity in human pancreatic β -cells and INS832/13 cells. Human islet cells were attached onto coverslips and incubated for 24 h at 5 or 25 mmol/l glucose in incubation culture medium as described in "Materials and Methods" with either 0.5% BSA or 0.4 mmol/l palmitate complexed to 0.5% BSA, in the presence or absence of 10 nmol/l GLP-1. The quantification of apoptosis was assessed by HOECHST (A) or TUNEL (B) staining and the β -cell population was identified by insulin immunostaining as described in

“Materials and Methods”. Representative images of microscopy are provided in a previous paper [20]. **(A)** White (□) and black (■) bars correspond to total islet cells and β -cells, respectively. Mean values \pm SE of 3 separated experiments are shown. At least 200 cells were analyzed for each experimental condition. *, $p < 0.05$ compared to 5 mM glucose and to 25 mM glucose without palmitate; #, $p < 0.05$ compared to corresponding condition without GLP-1. **(B)** Mean values \pm SE of 3 separated experiments for total islet cells are shown. At least 200 cells were analyzed for each experimental condition. *, $p < 0.001$ compared 5 mM glucose and 25 mM glucose without palmitate; #, $p < 0.05$ compared to corresponding condition without GLP-1. **(C)** Intact human islets were treated for 24 h as described above and apoptosis was investigated by ELISA as described in “Materials and Methods”. G5, 5 mmol/l glucose; G25P, 25 mmol/l glucose + 0.4 mmol/l palmitate. Means values \pm SE of 3 separated experiments are shown. #, $p < 0.05$ compared to the corresponding condition without GLP-1. **(D)** INS832/13 cells were incubated for 24 h at 5 mmol/l or 25 mmol/l glucose in incubation culture medium with either 0.5% BSA or 0.4 mmol/l palmitate bound to 0.5% BSA in presence or absence of 10 nmol/l GLP-1. Apoptosis was assessed by ELISA as described in “Experimental procedures”. Means values \pm SE of 3 separated experiments. *, $p < 0.05$ compared to 5mM glucose in absence or presence of palmitate and 25 mM glucose without palmitate; #, $p < 0.01$ compared to corresponding condition without GLP-1; †, $p < 0.001$ compared to 5 mmol/l glucose.

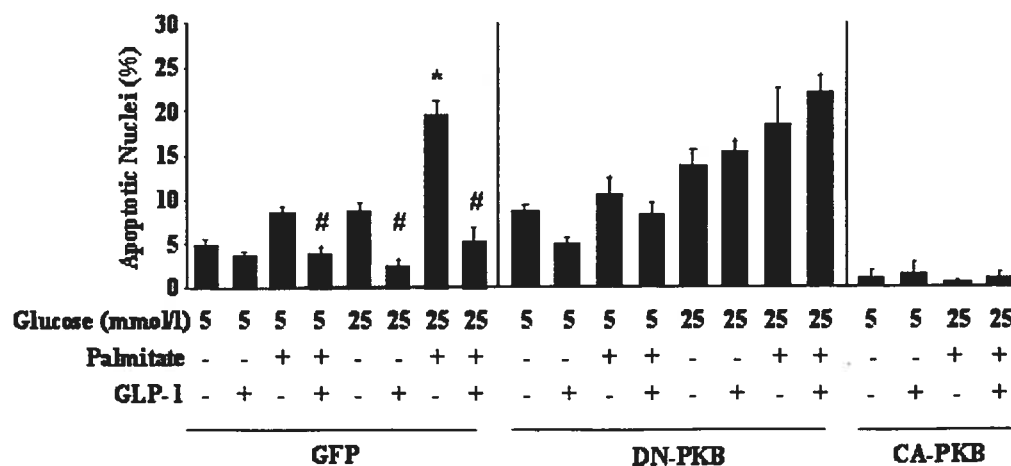


FIG 2. Adenoviral overexpression of a dominant-negative PKB suppresses the anti-apoptotic action of GLP-1. INS(832/13) cells were infected as detailed in “Experimental procedures” for overexpression of a dominant-negative (DN-PKB) and a constitutively active (CA-PKB) PKB constructs or for GFP as control. 24 h post-infection, cells were washed and cultured as described in Fig 1A for assessing the percentages of dead cells by HOECHST staining. Means values \pm SE of 3 separated experiments in which at least 100 cells were analyzed for each experimental condition. *, $p < 0.001$ compared to 5mM glucose in absence or presence of palmitate and 25 mM glucose without palmitate; #, $p < 0.05$ compared to corresponding condition without GLP-1.

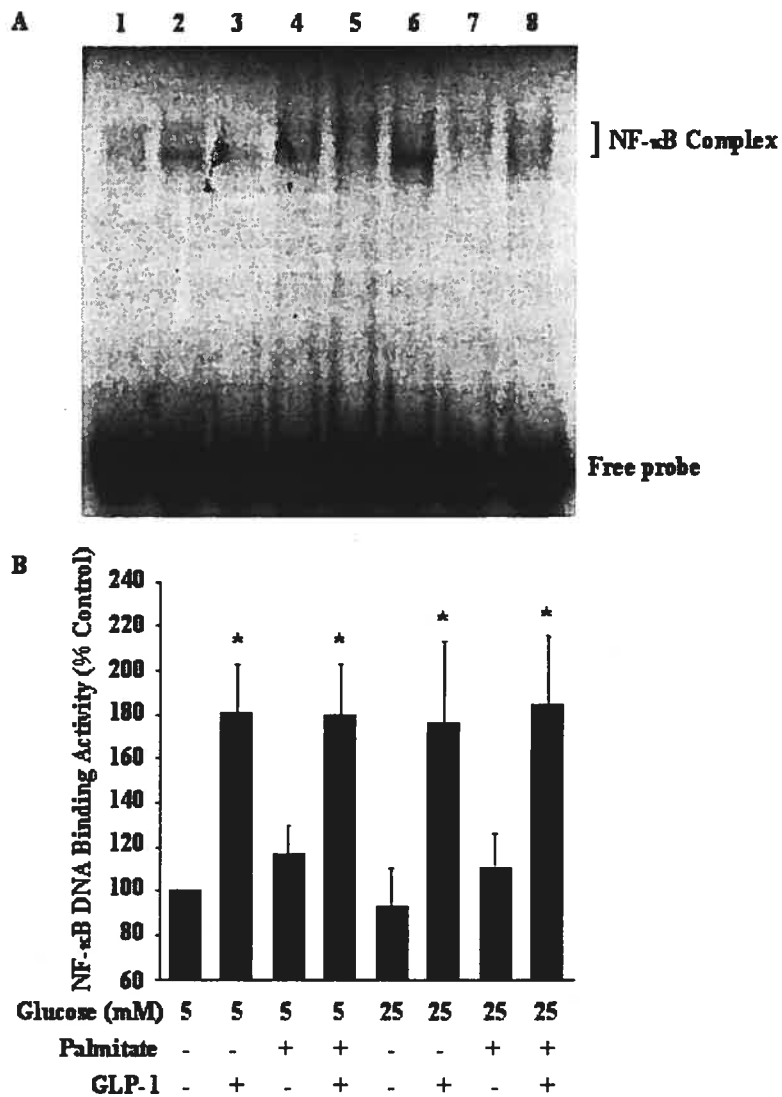


FIG 3. GLP-1 increases NF- κ B DNA binding activity. A, representative DNA retardation assay performed with nuclear extracts of INS832/13 cells cultured for 2 h at 5 or 25 mM glucose in KRBH medium with either 0.4 mM palmitate complexed to 0.5% BSA or with 0.5% BSA in the presence or absence of 10 nM GLP-1. A probe

containing a consensus NF- κ B responsive element was used to assess NF- κ B DNA binding activity. Lane 1, 5 mM glucose; lane 2, 5 mM glucose + GLP-1; lane 3, 5 mM glucose + palmitate; lane 4, 5 mM glucose + palmitate + GLP-1; lane 5, 25 mM glucose; lane 6, 25 mM glucose + GLP-1; lane 7, 25 mM glucose + palmitate; lane 8, 25 mM glucose + palmitate + GLP-1. B, quantification of the corresponding DNA retardation assays is shown. Data represent means \pm SE of 4 experiments. *, $p < 0.05$ compared to the corresponding condition without GLP-1.

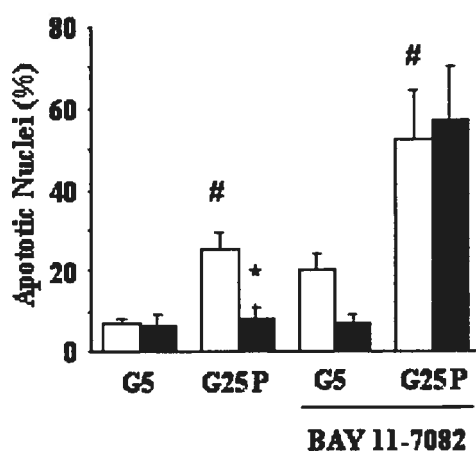


FIG 4. NF- κ B inhibition suppresses the anti-apoptotic action of GLP-1. INS832/13 cells were cultured for 24 h at 5 mM glucose or 25 mM glucose, with or without 0.4 mM palmitate complexed to 0.5% BSA or with 0.5% BSA, in the presence or absence of 10 nM GLP-1 and 20 μ M BAY 11-7082 for 24 h. Apoptosis levels were quantified by Hoechst staining. G5, 5 mM glucose; G25P, 25 mM glucose + 0.4 mM palmitate. Means values \pm SE of 3 separated experiments in which at least 100 cells were analyzed for each experimental condition. *, $p < 0.01$ compared to corresponding condition without GLP-1; #, $p < 0.05$ compared to corresponding G5 condition.

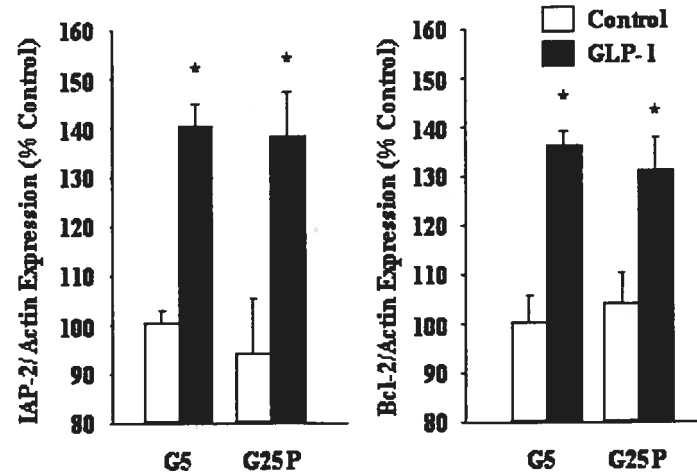


FIG 5. **GLP-1 increases the expression level of IAP-2 and Bcl-2.** INS cells were incubated for 6 h as described in Fig 1. RNA was then extracted and the expression levels of IAP-2 and Bcl-2 were analyzed by RT-PCR. G5, 5 mM glucose; G25P, 25 mM glucose + 0.4 mM palmitate. Means values \pm SE of 3 separated experiments. *, $p < 0.05$.

DISCUSSION

Nous avons démontré que le GLP-1, une hormone gluco-incréatine et un agent thérapeutique prometteur dans le traitement du diabète, peut agir comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β . De plus, le GLP-1 prévient la glucolipotoxicité de la cellule β via son action anti-apoptotique. Ces résultats suggèrent que le GLP-1, en plus de ses actions gluco-incréatine et insulinothrompique, jouerait un rôle important dans la régulation de la masse de cellules β via ses propriétés mitogéniques et anti-apoptotiques. Nos résultats suggèrent que l'activation de la voie de signalisation de la PI-3K par le GLP-1 serait impliquée dans l'effet pléiotropique de l'hormone gluco-incréatine (biosynthèse d'insuline, expression de gènes du métabolisme, prolifération, protection contre l'apoptose, etc.).

Le GLP-1 : un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β

Dans un premier temps, nos résultats indiquent que le GLP-1 augmente la prolifération de la cellule β d'une manière dose-dépendante et non-additive au glucose. Le fait que l'action du GLP-1 et du glucose sur la prolifération cellulaire ne soient pas additives suggère un mécanisme commun à l'action proliférative des deux agents. Ce résultat contraste avec l'action gluco-incréatine du GLP-1 puisque ce dernier agit à de hautes concentrations en glucose pour promouvoir la sécrétion d'insuline. L'usage d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à la PI-3K (wortmannine et LY294002) indique que l'effet prolifératif du GLP-1 implique la voie de transduction de signaux de la PI-3K. Curieusement, l'effet prolifératif du GLP-1 ne semble pas dépendre de la hausse en AMPc et de l'activation de la PKA puisque des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à cette voie n'ont pas supprimé l'effet prolifératif du GLP-1. Ce résultat permet d'expliquer la différence entre l'action du GLP-1 sur la prolifération (qui est indépendante du glucose) et celle sur la sécrétion d'insuline (qui est dépendante du glucose). Ainsi, l'activation de la PI-3K par le GLP-1 est indépendante de la concentration de glucose et participe à la prolifération de la cellule β alors que l'activation de la voie AMPc/PKA agirait en

synergie avec la hausse des niveaux de calcium intracellulaire induite par le glucose pour promouvoir la sécrétion d'insuline. Plusieurs groupes de recherche ont tenté d'identifier les voies de signalisation indépendantes de AMPc/PKA pouvant participer à l'effet pléiotropique du GLP-1. Alors que nos résultats suggèrent que la voie de la PI-3K semble être essentielle pour une variété d'effets biologiques du GLP-1, incluant la prolifération et la biosynthèse d'insuline, un autre groupe a identifié Epac comme étant un acteur principal dans la réponse sécrétoire induite par le GLP-1 (Kang, G. *et al.* 2001).

Le GLP-1 active le facteur de transcription PDX-1

Nos résultats démontrent aussi pour la première fois que le GLP-1 augmente l'activité de la PI-3K. L'activation de la PI-3K par le GLP-1 mène à l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1. PDX-1 est un facteur de transcription spécifique à la cellule β qui joue un rôle important dans la différenciation du pancréas endocrine (Offield, M. F. *et al.* 1996) de même que dans l'expression du gène de l'insuline (Watada, H. *et al.* 1996), de la glucokinase (Watada, H. *et al.* 1996) et de GLUT2 (Waeber, G. *et al.* 1996). L'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de PDX-1 en réponse au GLP-1 est associée à une augmentation de son ARNm et de celui de l'insuline. Ce résultat suggère que PDX-1 pourrait jouer un rôle dans l'effet insulinothopique du GLP-1. L'activité de liaison à l'ADN de PDX-1 corrèle avec la prolifération de la cellule β alors que celle du facteur de transcription AP-1 contraste avec cette dernière. L'activité du facteur de transcription AP-1 corrèle plutôt avec l'expression de certains gènes à réponse précoce (*c-fos*, *c-jun* et *junB*), tel que rapporté dans une étude précédente de notre groupe de recherche (Susini, S. *et al.* 2000). Ces résultats suggèrent que l'action du GLP-1 sur la prolifération serait indépendante de l'expression des gènes à réponse précoce et de l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1 mais pourrait impliquer une augmentation de l'activité de PDX-1. On retrouve d'autres évidences dans la littérature d'un rôle potentiel de PDX-1 dans la prolifération de la cellule β (Sharma, A. *et al.* 1999). Toutefois, nous sommes conscients que de nombreuses autres

expériences seraient nécessaires afin de prouver l'implication de PDX-1 dans la transduction du signal prolifératif du GLP-1.

Le GLP-1 induit la prolifération via l'activation de la PKC ζ

Par la suite, nous avons tenté de définir les cibles en aval de la PI-3K pouvant participer à l'effet prolifératif du GLP-1 sur la cellule β . Nous avons donc étudié l'effet du GLP-1 sur les principales voies de transduction de signaux situées en aval de la PI-3K et qui étaient déjà reconnues pour participer à des événements mitogéniques, soit PKB, ERK1/2, p38 MAPK et PKC ζ . Nos résultats démontrent que le GLP-1 active PKB, ERK 1/2 et p38 MAPK d'une manière non-additive au glucose. Ces résultats corrént avec la prolifération de la cellule β . De plus le GLP-1 induit la translocation au noyau de la PKC ζ , dans les cellules β dispersées d'îlots de rats et la lignée cellulaire INS832/13. Notre étude pharmacologique indique que l'effet prolifératif du GLP-1 est supprimé par un inhibiteur peptidique spécifique aux aPKCs de même que le SB203580 (un inhibiteur de la voie p38 MAPK). Toutefois, le SB203580 a diminué la prolifération basale de la cellule β , ce qui peut signifier un effet non-spécifique de l'inhibiteur. D'autre part, des inhibiteurs spécifiques à la voie ERK 1/2 et aux cPKCs n'ont pas modifié de manière significative l'effet prolifératif du GLP-1. Ces résultats suggèrent que l'effet prolifératif du GLP-1 pourrait impliquer la PKC ζ et la p38 MAPK et non pas ERK1/2 et les cPKCs. La surexpression d'un mutant PKC ζ dominant-négatif dans la lignée cellulaire INS a supprimé l'effet prolifératif du GLP-1 alors que la surexpression d'une construction PKC ζ constitutivement active a augmenté la prolifération cellulaire, confirmant avec une approche de biologie moléculaire nos résultats obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. Notre étude n'exclut toutefois pas un possible rôle de PKB dans l'effet prolifératif du GLP-1. En effet, son activité corréle avec la prolifération cellulaire mais il n'y a pas d'agent pharmacologique disponible commercialement inhibant de manière spécifique PKB. De nombreuses expériences seraient nécessaires afin de clarifier le rôle de p38 MAPK et de PKB dans l'action proliférative du GLP-1. On pourrait entre autres envisager la surexpression de diverses constructions (type

sauvage, dominant-négatif et constitutivement actif) de ces kinases et en étudier l'effet sur la prolifération induite par le GLP-1.

On connaît peu de choses sur les cibles en aval de PKC ζ permettant d'expliquer l'effet prolifératif du GLP-1. Toutefois, il est généralement admis que PKC ζ est impliquée dans la transduction de signaux mitogéniques et anti-apoptotiques. Il est intéressant de noter que PDX-1 est une cible potentielle de PKC ζ (Furukawa, N. *et al.* 1999) et de p38 MAPK (Macfarlane, W. M. *et al.* 1994), deux kinases activées par le GLP-1. NF-kB est aussi un facteur de transcription situé en aval de PKC ζ (Diaz-Meco, M. T. *et al.* 1993) (et de PKB). Suite à son activation, il peut augmenter l'expression de la cycline D1 pour réguler la progression dans le cycle cellulaire et celle de nombreux gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x1, survivine et les IAPs).

Le GLP-1 transactive le récepteur à l'EGF pour augmenter l'activité de la PI-3K et promouvoir la prolifération de la cellule β

Par la suite, nous avons tenté d'identifier le mécanisme moléculaire par lequel le GLP-1 active la PI-3K. En effet, la voie de signalisation de la PI-3K est reconnue pour être en aval des récepteurs à activité tyrosine-kinase alors que le récepteur au GLP-1 fait partie de la famille des RCPGs. Nos résultats démontrent que le GLP-1 active la voie de la PI-3K et augmente la prolifération de la cellule β via la transactivation du récepteur à l'EGF. Cette transactivation du récepteur à l'EGF induite par le GLP-1 implique l'activation de c-Src, d'une métalloprotéinase et la maturation protéolytique subséquente de la betacelluline. Les évidences qui supportent un tel modèle proviennent des observations suivantes : 1) La prolifération induite par le GLP-1 est supprimée par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à c-Src (PP1) et au récepteur à l'EGF (AG1478), ce qui suggère une implication de c-Src et du récepteur à l'EGF dans l'effet prolifératif du GLP-1. 2) L'effet prolifératif du GLP-1 n'est pas additif à celui de la BTC, un ligand naturel pour le récepteur à l'EGF, ce qui suggère un mécanisme commun aux deux agents prolifératifs. 3) Le GLP-1 active de manière transitoire le récepteur à l'EGF tel que démontré par

immunobuvardage de type western évaluant la phosphorylation du récepteur à l'EGF. Cette phosphorylation du récepteur à l'EGF par le GLP-1 est inhibée par le PP1, ce qui suggère que c-Src est situé en amont du récepteur à l'EGF. 4) L'activation de la PI-3K par le GLP-1 est inhibée par le PP1 et l'AG1478, suggérant que l'activation de la PI-3K par le GLP-1 requiert la transactivation du récepteur à l'EGF par un mécanisme qui implique c-Src. 5) La prolifération induite par le GLP-1 est supprimée par la surexpression d'un récepteur à l'EGF tronqué dans sa partie cytoplasmique et qui agit comme un dominant-négatif. 6) Le traitement au GLP-1 diminue les niveaux de BTC à la surface des cellules d'une manière sensible au PP1. Ceci suggère un clivage de la BTC en réponse au GLP-1 et indique que c-Src serait situé en amont de la métalloprotéinase responsable du clivage de la BTC. 7) La prolifération de la cellule β en réponse au GLP-1 est abolie par un inhibiteur pan-spécifique des métalloprotéinases (GM6001) et un anticorps neutralisant la BTC dans le milieu. Ce résultat démontre l'implication du processus de maturation par clivage de la BTC dans l'effet prolifératif du GLP-1. 8) Le GLP-1 active la prolifération des cellules LNCaP (une lignée cancéreuse de la prostate qui n'exprime pas le récepteur au GLP-1 mais qui expriment le récepteur à l'EGF) lorsque ces dernières sont co-cultivées avec des cellules INS832/13. Cette prolifération induite chez les LNCaP est supprimée par le GM6001 et un anticorps neutralisant la BTC. Ceci suggère que les cellules INS832/13 libèrent un facteur de croissance pouvant agir de manière juxtacrine en réponse au GLP-1. L'effet inhibiteur du GM6001 et de l'anticorps neutralisant la BTC sur la prolifération induite dans les cellules LNCaP permet de croire que le clivage de la BTC pourrait être impliqué dans l'effet prolifératif du GLP-1 sur les cellules LNCaP co-cultivées en présence de cellules INS832/13.

Notre étude suggère donc un rôle important du récepteur à l'EGF dans la prolifération de la cellule β en réponse au GLP-1. On retrouve dans la littérature plusieurs publications proposant un rôle important du récepteur à l'EGF dans la régulation de la masse de cellules β . Une étude démontre que la signalisation du récepteur à l'EGF induit la prolifération de cellules pancréatiques embryonnaires (Cras-Meneur, C. *et al.* 2001). De plus, des souris déficientes pour le récepteur à

l'EGF présentent un développement anormal des îlots (Miettinen, P. J. *et al.* 2000). Une autre étude portant sur l'effet prolifératif de divers ligands naturels pour le récepteur à l'EGF démontre que la BTC agit comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β et nos résultats confirment cette observation. La BTC est un membre de la famille EGF qui, en plus de promouvoir la prolifération de la cellule β (Shing, Y. *et al.* 1993; Huotari, M. A. *et al.* 1998; Li, L. *et al.* 2001), augmente l'activité de la PI-3K et l'expression du gène de l'insuline (Watada, H. *et al.* 1996). Aussi, puisque la BTC est reconnue pour induire la néogénèse des cellules β (Mashima, H. *et al.* 1996; Yamamoto, K. *et al.* 2000), il est tentant de proposer que l'effet du GLP-1 sur la différenciation des cellules β pourrait faire intervenir le clivage de la BTC.

Notre étude ne permet toutefois pas l'identification de l'isoforme des métalloprotéinases impliquée dans ce processus. Des travaux effectués en collaboration avec le Dr Dempsey à Seattle sont présentement en cours afin d'identifier cette isoforme responsable du clivage de la betacelluline en réponse au GLP-1.

Le GLP-1, une hormone anti-apoptotique pour la cellule pancréatique β

Plusieurs études ont récemment étudié l'effet de l'exposition chronique à de hautes concentration en glucose et en acides gras libres sur la fonction de la cellule β (Poitout, V. and Robertson, R. P. 2002). D'un coté, les niveaux élevés de glucose causent une désensibilisation de la cellule β au glucose, diminue les niveaux d'insuline emmagasinée et augmente l'apoptose (glucotoxicité) (Poitout, V. and Robertson, R. P. 1996). De l'autre coté, les acides gras libres diminuent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Segall, L. *et al.* 1999), réduisent l'expression du gène de l'insuline (Gremlich, S. *et al.* 1997) et induisent l'apoptose de la cellule β (lipotoxicité) (Unger, R. H. 1995). Les Drs Prentki et Corkey ont proposé le concept de glucolipotoxicité où le glucose et les acides gras libres agiraient en synergie pour causer la dysfonction de la cellule β (Prentki, M. 1996; Prentki, M. and Corkey, B. E.

1996). Une explication probable à ce phénomène, au niveau moléculaire, suggère que le glucose inhibe l'oxydation des acides gras et diminue donc la détoxification de la cellule β . La dysfonction de la cellule β induite dans un contexte de glucolipotoxicité pourrait jouer un rôle important dans la phase de décompensation de la cellule β et le développement du diabète de type 2 associé à l'obésité. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle le GLP-1 pourrait protéger les cellules pancréatique β de l'apoptose induite par de hautes concentrations en glucose et en acides gras libres. Nos résultats, obtenus par des approches combinés de pharmacologie, de biochimie et de biologie moléculaire, démontrent que le GLP-1 prévient la gluco-, la lipo- et la glucolipotoxicité dans la cellule INS832/13 et des îlots humains.

Le rôle de PKB dans la régulation de la masse de cellules β

Puisque le GLP-1 augmente l'activité de la voie de transduction du signal PI-3K/PKB et que cette voie est reconnue pour participer à la transduction de signaux anti-apoptotiques dans une variété de systèmes cellulaires, nous avons examiné la possible implication de la PKB dans l'effet anti-apoptotique du GLP-1 sur la cellule β . La surexpression d'un mutant PKB dominant-négatif a supprimé l'effet anti-apoptotique du GLP-1 sur la gluco-, la lipo- et la glucolipotoxicité. La surexpression d'une forme constitutivement active de PKB a aboli l'effet cytotoxique du glucose et du palmitate. Ces résultats suggèrent que l'activation de PKB par le GLP-1 jouerait un rôle dans l'effet anti-apoptotique de l'hormone gluco-incrétine. Il est intéressant de constater que plusieurs études démontrent le rôle important de PKB dans la régulation de la masse de cellules β . Deux études récentes portant sur des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de PKB ont démontré que les animaux transgéniques affichaient une masse de cellules β augmentée en comparaison au animaux témoins (Bernal-Mizrachi, E. *et al.* 2001; Tuttle, R. L. *et al.* 2001). De plus, les souris transgéniques étaient résistantes au diabète induit par la streptozotocine. Ces deux publications rapportent une augmentation de la néogénèse de cellules β et l'une d'elles démontrent aussi une prolifération de la cellule β accrue (Bernal-Mizrachi, E. *et al.* 2001). Une publication récente a aussi démontré le rôle de

PKB dans la protection des cellules β de l'apoptose induite par l'oléate (Wrede, C. E. *et al.* 2002). Nos résultats, en compagnie de toutes ces études, suggèrent que PKB jouerait un rôle clé dans la régulation de la masse de cellules β par un mécanisme complexe qui implique à la fois la néogénèse, la prolifération et la protection de l'apoptose.

Un rôle anti-apoptotique pour NF-kB

Nous avons aussi étudié l'effet du GLP-1 sur l'activité de liaison à l'ADN du complexe NF-kB, un facteur de transcription en aval de PKB qui est impliqué dans le contrôle de l'apoptose. La famille des facteurs de transcription NF-kB comprend plusieurs membres qui agissent sous forme d'homo- et d'hétéro-dimères. Chez les vertébrés, cette famille inclut p50, p52, Rel-A (aussi appelé p65), c-Rel et Rel-B. Le complexe NF-kB est généralement présent sous sa forme latente dans le cytoplasme où il est séquestré par l'inhibiteur I κ B. PKB, de même que d'autres protéine kinase, peuvent phosphoryler I κ B pour induire son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Ceci a pour effet de libérer NF-kB sous sa forme active et NF-kB est alors transloquée au noyau. Il est intéressant de constater que I κ B est aussi une cible potentielle de PKC ζ (Diaz-Meco, M. T. *et al.* 1993) une kinase activée par le GLP-1 tel que rapporté ci-dessus. Suite à sa translocation au noyau, NF-kB augmente l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques en fonction du stimulus et du contexte cellulaire (Barkett, M. and Gilmore, T. D. 1999; Pahl, H. L. 1999; Baldwin, A. S. 2001; Chen, F. *et al.* 2001). Les gènes pro-apoptotiques dont l'expression est régulée par NF-kB sont : iNOS (Taylor, B. S. *et al.* 1998), plusieurs cytokines (Hiscott, J. *et al.* 1993), Fas et Fas-Ligand (Matsui, K. *et al.* 1998). Les gènes anti-apoptotiques dont l'expression est régulée par NF-kB sont : les inhibiteurs de caspase IAP-1, IAP-2 et XIAP (Wang, C. Y. *et al.* 1998); les stabilisateurs de la membrane mitochondriale Bcl-2 (Mattson, M. P. and Camandola, S. 2001), Bcl-x1 et Bfl-1 (Lee, H. H. *et al.* 1999); et des facteurs de progression du cycle cellulaire telle que la cycline D1 (Guttridge, D. C. *et al.* 1999; Hinz, M. *et al.* 1999). La sélection entre la réponse pro- ou anti-apoptotique va dépendre, d'une part, des interactions avec les

autres voies de signalisation et, d'autres part, des membres de la famille NF-kB impliqués dans la composition du complexe (Pahl, H. L. 1999). On connaît peu de choses sur le rôle de NF-kB dans la cellule β . Dans la littérature, on lui accorde généralement une action pro-apoptotique puisque son activité est augmentée par certaines cytokines. Toutefois, jusqu'à tout récemment, personne n'avait défini son rôle exact dans le détail et l'hypothèse selon laquelle l'activation de NF-kB en réponse aux cytokines pouvait constituer une défense de la cellule β face au stress via son action anti-apoptotique était toujours plausible. Or, une récente étude rapportent justement que l'activation de NF-KB prévient l'apoptose induite par différentes toxines et cytokines dans la cellule β (Chang, I. *et al.* 2003).

Nos résultats démontrent que le GLP-1 active NF-kB d'une manière indépendante du glucose et du palmitate. De plus, un inhibiteur pharmacologique de NF-kB a supprimé l'action anti-apoptotique du GLP-1 et a sensibilisé la cellule β au stress induit par la glucolipotoxicité. Ces résultats suggèrent que NF-kB pourrait jouer un rôle dans l'effet anti-apoptotique du GLP-1 sur la glucolipotoxicité. Par la suite, nous avons tenté d'identifier les gènes induits par NF-kB pouvant participer à l'effet anti-apoptotique du GLP-1. Nous avons donc étudié l'effet du GLP-1 sur l'expression des gènes IAP-2 et Bcl-2. Nos résultats indiquent que le GLP-1 augmente l'expression de IAP-2 et de Bcl-2, deux gènes anti-apoptotiques dont l'expression peut être sous le contrôle de NF-kB. Nous sommes conscients que des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de prouver hors de tout doute que l'expression des gènes IAP-2 et Bcl-2 en réponse au GLP-1 est dépendante de l'activation de NF-kB. Toutefois, nos résultats sont compatibles avec un modèle selon lequel le GLP-1 préviendrait l'apoptose de la cellule β via l'activation de PKB et l'activation subséquente de NF-kB qui augmenterait l'expression des gènes IAP-2 et Bcl-2.

En somme, le GLP-1 favorise à la fois la prolifération cellulaire et la survie de la cellule β via l'activation de la voie de signalisation de la PI-3K. L'action physiologique du GLP-1 peut dépendre du contexte cellulaire (*cross-talks* entre diverses voies de signalisation, combinaisons de différents facteurs de transcription,

etc.) et il est même probable qu'il puisse exercer ses effets sur la prolifération et la survie cellulaire simultanément.

Les principales limitations de l'étude

Une des principales limitations de notre étude provient du fait que la majorité des résultats ont été obtenus à l'aide d'une lignée cellulaire, soit la lignée pancréatique β INS. La lignée cellulaire INS utilisée au cours de cette étude a été choisie parce qu'elle présente un meilleur stade de différenciation que les autres lignées pancréatiques β en ce qui a trait à la sécrétion d'insuline et à la réponse aux facteurs de croissance (voir la section 3.5 – Les lignées cellulaires pancréatiques β). En ce sens, la confirmation des principaux résultats dans des îlots de rat et humains s'avérerait importante pour la signification physiologique de notre étude. Il est aussi pertinent de souligner que les conclusions clés de nos travaux, soit l'action du GLP-1 sur l'expression de PDX-1, la prolifération et la survie de la cellule β , ont été observées lors d'études *in vivo* par différents groupes de recherche (Xu, G. *et al.* 1999; Stoffers, D. A. *et al.* 2000; Li, Y. *et al.* 2003). La grande disponibilité du matériel biologique constitue le principal avantage de l'utilisation d'une lignée cellulaire. Ainsi, l'emploi de la lignée cellulaire INS a permis l'avancement des connaissances en ce qui a trait à la transduction de signaux en réponse au GLP-1, en permettant l'exécution d'analyses biochimiques qui requièrent une grande quantité de matériel, ce qui n'est pas possible avec les îlots. De plus, les îlots constituent une population cellulaire hétérogène. Les lignées cellulaires constituent des modèles imparfaits bien qu'utiles. Il est important de confirmer les résultats obtenus dans du tissu normal (cultures primaires) et idéalement dans un modèle animal.

Une autre faiblesse de notre étude provient du fait que l'analyse statistique des trois premiers articles est inappropriée puisque des comparaisons multiples ont été effectuées par un test de *t*. Un test ANOVA suivi d'une analyse de contrastes aurait plutôt dû être utilisé. Ceci a été fait pour le quatrième manuscrit. L'usage d'une méthode d'analyse inappropriée a pour conséquence de limiter les conclusions d'une

étude puisqu'il faut considérer que certains effets rapportés ne soient pas vraiment significatifs.

Le GLP-1 : un agent thérapeutique prometteur pour le traitement du diabète

L'effet anti-apoptotique du GLP-1, combiné à ses actions gluco-incrétime, proiférative et insulino-tropique, ajoute beaucoup d'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans un traitement (et pour la prévention) du diabète. En effet, le GLP-1 était auparavant majoritairement étudié en vertu de ses propriétés sur la sécrétion d'insuline. On considérait principalement qu'un traitement au GLP-1 serait utile lors de la phase tardive de la maladie alors que le patient éprouve déjà des excursions hyperglycémiques. Nos travaux portant sur la régulation de la masse de cellules β par le GLP-1 suggèrent qu'un traitement au GLP-1 serait aussi bénéfique lors de la phase pré-diabétique via l'augmentation et la préservation de la masse de cellules β . Ainsi, le GLP-1 pourrait favoriser la réponse compensatoire de la cellule β lors de la phase pré-diabétique en augmentant la prolifération, en prévenant l'apoptose induite par de hautes concentrations de glucose et d'acides gras libres, de même qu'en augmentant l'expression et l'activité de PDX-1 pour promouvoir la biosynthèse d'insuline. Enfin, les actions proliférative et anti-apoptotique du GLP-1 accordent de l'importance quant à l'utilisation du GLP-1 dans un contexte « d'expansion » et de survie de la masse de cellules β en culture à des fins de transplantations d'îlots.

La principale inquiétude quant à l'utilisation du GLP-1 dans un traitement du diabète provient du fait que son effet prolifératif pourrait favoriser la progression tumorale. Toutefois, un tel effet du GLP-1 (ou de ses analogues) lors d'essais cliniques n'a pas été décrit dans la littérature à ce jour. Il faut mentionner que l'usage du GLP-1 présente toutefois certains avantages face à d'autres facteurs de croissance actuellement employés dans le traitement de diverses maladies : 1) Le GLP-1 et ses analogues sont utilisés à une concentration physiologique correspondant à des niveaux de GLP-1 circulant suite à un repas. Le fait que le GLP-1 soit employé à une dose physiologique s'avère rassurant. 2) Le récepteur au GLP-1 n'est exprimé que

dans quelques tissus (le cerveau, le poumon, le rein, le tractus gastro-intestinal et le cœur), ce qui diminue l'étendue des effets secondaires potentiels. De plus, le rôle physiologique du GLP-1 sur certains tissus, tels les poumons ou le cœur, n'a pas été identifié et n'implique pas nécessairement une augmentation de la prolifération. 3) L'effet prolifératif du GLP-1 sur la cellule β s'exerce de manière auto- ou juxtacrine via le clivage de la betacelluline. Ceci limite une fois de plus le champ d'action du GLP-1. 4) Enfin, la demi-vie très courte du GLP-1 limite encore une fois son action. Toutefois, ceci s'avère plus ou moins vrai pour les analogues au GLP-1 qui ont généralement une demi-vie prolongée. Afin d'évaluer le véritable risque que représente un traitement au GLP-1 sur la progression tumorale, il faut se demander dans quelle mesure le GLP-1 est vraiment un facteur limitant quant à la prolifération et à la survie des cellules tumorales...

CONCLUSION

En conclusion, le GLP-1 agit comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β en augmentant la prolifération de cette dernière via la transactivation du récepteur à l'EGF et l'activation subséquente de la voie PI-3K/PKC ζ . De plus, le GLP-1 augmente l'activité de liaison à l'ADN de PDX-1, un facteur de transcription important pour la cellule β , pour augmenter la biosynthèse d'insuline. Enfin, le GLP-1 prévient la glucolipotoxicité dans la cellule β via l'activation de PKB et de ses cibles en aval. Ces résultats ajoutent beaucoup d'intérêt quant à l'utilisation du GLP-1 dans le traitement du diabète.

PERSPECTIVES DU PROJET

Les perspectives de ce projet sont nombreuses. Cette section s'attardera sur la description des expériences jugées prioritaires afin de mieux définir les mécanismes moléculaires par lesquels le GLP-1 exerce des effets prolifératif et anti-apoptotique sur la cellule β .

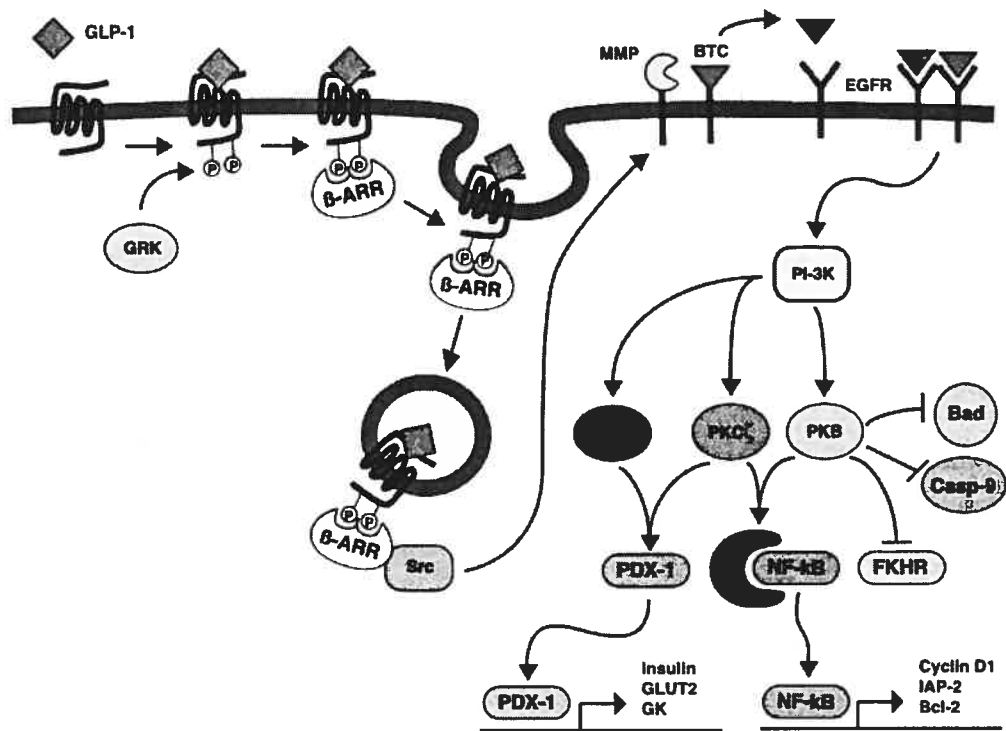


Figure 13 : Illustration des principales hypothèses de travail concernant l'activation de voies de signalisation participant à l'effet prolifératif et anti-apoptotique du GLP-1 sur la cellule β . Voir texte pour discussion. GLP-1, *glucagon-like peptide-1*; GRK, *G protein-coupled receptor kinase*; β -ARR, β -arrestine ; MMP, *métalloprotéinase*; BTC, *betacelluline*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; PI-3K, *phosphatidyl inositol-3 kinase*; PKC, *protéine kinase C*; PKB, *protéine kinase B*; Casp-9, *caspase-9*; PDX-1, *pancreatic and duodenum homeobox*

protein-1; I κ B, inhibiteur-kB; NF-kB, *nuclear factor-kB*; FKHR, facteur de transcription forkhead; GK, glucokinase; IAP-2, *inhibitor of apoptosis protein-2*.

1) Définir le mécanisme moléculaire précis par lequel le GLP-1 active le récepteur à l'EGF.

Nos travaux ont démontré que le GLP-1 transactive le récepteur à l'EGF pour activer la voie de la PI-3K, promouvoir la prolifération et prévenir l'apoptose de la cellule β . Bien que nous ayons fourni des évidences selon lesquelles la protéine c-Src et le clivage de la BTC seraient impliqués dans le processus, le mécanisme moléculaire par lequel le GLP-1 transactive le récepteur à l'EGF demeure inconnu. L'hypothèse suivante (illustrée à la Figure 13), qui concerne la voie de transduction menant de l'activation du récepteur au GLP-1 à celui de l'EGF, mérite d'être testée : GLP-1R —> arrestines —> c-Src/c-Src-like —> métalloprotéinase(s) —> BTC —> récepteur à l'EGF.

Implication des arrestines: Les arrestines ont pour rôle l'internalisation et la désensibilisation des RCPGs. Toutefois, de récentes études ont démontré de nouvelles fonctions signalétiques aux arrestines. En effet, les arrestines peuvent être responsables de l'activation de c-Src et d'autres protéines kinases en les recrutant. L'implication des arrestines dans le recrutement de c-Src sera étudié par la technologie de *bioluminescence resonance energy transfer* (BRET). Le BRET détermine les interactions protéine/protéine en mesurant le transfert d'énergie entre un donneur couplé à une luciférase et un accepteur couplé à la *green fluorescent protein* (GFP). Ainsi, des constructions GLP-1R-luciférase, arrestine-GFP, c-Src-luciférase seront exprimées dans des cellules INS832/13. Suite à une stimulation au GLP-1, un transfert d'énergie validerait l'hypothèse énoncée ci-dessus selon laquelle l'activation de c-Src et la transactivation du récepteur à l'EGF impliqueraient les arrestines. Dans le cas contraire, il faudrait envisager une autre hypothèse qui pourrait par exemple impliquer directement la sous-unité $\beta\gamma$ de Gs ou Epac.

Implication de c-Src : Notre étude pharmacologique suggère un rôle de c-Src dans la transactivation du récepteur à l'EGF par le GLP-1 puisque le PP1, un inhibiteur spécifique à c-Src et aux protéines c-Src-like, a supprimé l'effet du GLP-1 sur la prolifération de la cellule β et sur l'activation du récepteur à l'EGF. Toutefois, il serait important de valider notre approche pharmacologique à l'aide d'une approche moléculaire plus spécifique. Tout d'abord, l'activation de c-Src sera évaluée par immunobuvardage de type western à l'aide d'anticorps reconnaissant sa forme phosphorylée. Les membranes seront aussi incubées avec des anticorps reconnaissant c-Src sous sa forme non-phosphorylée afin de vérifier le chargement égal des protéines. Des résultats préliminaires indiquent que le GLP-1 augmente la phosphorylation de c-Src. Ce résultat est compatible avec un rôle possible de c-Src dans l'action du GLP-1. Ensuite, un mutant c-Src dominant-négatif sera surexprimé dans la cellule β et son effet sur la prolifération de même que la transactivation du récepteur à l'EGF en réponse au GLP-1 sera étudié.

Implication des métalloprotéinase dans le clivage de la BTC: Notre étude pharmacologique a démontré l'implication potentielle des métalloprotéinases dans la transactivation du récepteur à l'EGF par le GLP-1. Toutefois, nous n'avons pas identifié quelle(s) isoforme(s) étaient responsables du clivage de la BTC. Les protéines ADAM 9, 10 et 17 sont toutes des métalloprotéinases déjà reconnues pour participer à des processus de transactivation. L'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à ces isoformes de même que la surexpression de dominants-négatifs ADAM 9, 10 et 17 à l'aide de virus recombinants dans les cellules INS832/13 permettront l'identification des isoformes impliquées. De plus, notre collaborateur à Seattle, le Dr Dempsey, possède des lignées cellulaires déficientes pour ces isoformes précises de métalloprotéinases qui seront utilisées afin de confirmer les résultats obtenus par l'approche pharmacologique. Puisque les formes mutantes des métalloprotéinases ne se replient pas toujours correctement dans le réticulum endoplasmique, une alternative envisagée serait l'emploi de RNAi (RNA inhibiteur) pour induire la dégradation spécifique des ARNm des ADAMs candidats.

2) Définir de manière détaillée les événements tardifs impliqués dans l'effet prolifératif et anti-apoptotique du GLP-1

Nos travaux ont démontré que PKC ζ et PKB, deux cibles en aval de la PI-3K, jouent un rôle clé respectivement dans l'action proliférative et anti-apoptotique du GLP-1 sur la cellule β . Toutefois, les événements tardifs, situés en aval de la PI-3K n'ont pas été totalement élucidés. Les hypothèses de travail détaillées ci-dessous sont illustrées à la Figure 13.

Les événements tardifs de la prolifération : Il serait intéressant de clarifier le rôle de p38 MAPK et de PKB dans la prolifération induite par le GLP-1. Nos résultats précédents obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques suggèrent un rôle potentiel de p38 MAPK dans l'effet prolifératif du GLP-1. De plus l'activité de ces deux kinases corrèle avec la prolifération de la cellule β . Des constructions mutantes de p38 MAPK et de PKB de type dominant négatif seront surexprimées dans la cellule β à l'aide d'adénovirus recombinants dans un essai de prolifération cellulaire. Une inhibition de l'effet du GLP-1 sur la prolifération de la cellule β par la surexpression d'une forme mutante de l'une de ces deux kinases indiquera la participation de cette kinase à la transduction du signal prolifératif induit par le GLP-1. Advenant l'implication de PKB dans l'effet prolifératif du GLP-1, l'effet du GLP-1 sur les différentes cibles de PKB reconnues pour participer à la transduction de signaux prolifératifs sera étudié. Ainsi, l'état de phosphorylation de TOR et de p70S6K sera étudié par immunobuvardage de type Western. Enfin, il serait intéressant d'étudier la participation de la PKC ϵ dans l'effet prolifératif du GLP-1 puisque cette PKCn est située en aval de PKC ζ . L'implication de PKC ϵ dans la prolifération de la cellule β en réponse au GLP-1 sera étudiée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, de la technologie des ARNi et d'adénovirus recombinants permettant la surexpression de différents mutants de la protéine (type sauvage, dominant négatif, constitutivement actif). Des résultats préliminaires obtenus à partir d'essais de prolifération dans la cellule INS832/13 en présence et en

absence d'inhibiteurs pharmacologiques (calphostin C et peptides inhibiteurs) suggèrent l'implication d'une PKC α dans l'effet prolifératif du GLP-1.

Les événements tardifs de la protection de l'apoptose : Notre étude pharmacologique suggère un rôle de NF- κ B dans l'effet anti-apoptotique du GLP-1. Il serait intéressant de valider nos résultats par la surexpression d'un I κ B super-répresseur. Aussi, il est intéressant de vérifier l'effet du GLP-1 sur les différentes cibles de PKB reconnues pour participer à la transduction de signaux anti-apoptotiques. Ainsi, l'état de phosphorylation de Bad, des facteurs de transcription de type Forkhead et de la caspase-9 sera étudié par immunobuvardage de type Western.

3) Étudier l'effet du GLP-1 sur le métabolisme du glucose et des acides gras.

On connaît bien peu de choses à propos de l'action du GLP-1 sur le métabolisme des nutriments dans la cellule β . Toutefois, une récente publication démontre que le GLP-1 augmente la lipolyse dans la cellule β et suggère que ce phénomène pourrait être impliqué dans l'effet gluco-incrétime de l'hormone. Il est logique de penser que le métabolisme du glucose et des acides gras pourrait agir de concert avec les voies de signalisation « classiques » pour participer à l'effet pléiotropique du GLP-1 (sécrétion d'insuline, expression génique, prolifération et apoptose). Ainsi, la souris *knock-out* pour le gène de la HSL que nous avons dans le laboratoire est un bon modèle pour vérifier la possible participation de la lipolyse à l'action gluco-incrétime du GLP-1. Une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au GLP-1 dans des îlots isolés de souris HSL $-/-$ suggérerait l'implication de la HSL dans l'action gluco-incrétime du GLP-1. Des agents pharmacologiques inhibant la lipolyse (tel que l'Orlistat) pourraient ensuite être utilisés. L'effet du GLP-1 sur la partition des lipides sera étudié. Les flux d'oxydation et d'estérification des acides gras seront mesurés en présence et en absence de GLP-1 à différentes concentrations de glucose. Ensuite, les niveaux de triglycérides, de diacylglycérols et de phospholipides seront mesurés après différentes périodes d'incubation de cellules β en présence de GLP-1 et ce, à différentes concentrations de glucose. Les niveaux de glycogène seront aussi mesurés

en présence et en absence de GLP-1. Nous vérifierons si ces changements biochimiques corréleront avec les actions du GLP-1 sur la sécrétion d'insuline, la prolifération cellulaire et la protection de l'apoptose. Enfin, des mesures d'activités de certaines enzymes clés du métabolisme du glucose et des acides gras seront effectuées afin de confirmer les résultats obtenus par différentes analyses biochimiques. Cette étude corrélatrice permettra de vérifier l'implication du métabolisme du glucose et de la partition des lipides dans l'action pléiotropique du GLP-1.

4) Utiliser la technologie des puces à ADN afin de déterminer le profil d'expression génique en réponse au GLP-1

La technologie des micropuces à ADN, en devenant de plus en plus accessible et abordable, s'affirme comme une technologie de pointe dans le domaine de la recherche en génomique. Il serait intéressant d'utiliser cette technologie pour étudier le patron d'expression de plusieurs milliers de gènes en réponse au GLP-1. Ce genre d'étude permettra l'identification de gènes candidats pouvant participer à l'action du GLP-1 en fonction de nos connaissances actuelles sur la signalisation induite par le GLP-1 dans la cellule β . Aussi, cette technologie pourrait révéler de nouveaux mécanismes participant à l'effet pléiotropique du GLP-1 et suggérer de nouvelles fonctions biologiques pour le GLP-1. Bien entendu, une attention particulière sera portée aux gènes reconnus pour participer à la régulation d'événements de prolifération et de différenciation, de même que la prévention de l'apoptose. Les résultats obtenus par l'analyse des micropuces à ADN seront confirmés par des immunobuvardages de type northern ou par RT-PCR.

5) Utiliser la technologie de la protéomique pour identifier les modifications post-traductionnelles induites par le GLP-1

Les limitations de l'approche génomique proviennent du fait que des changements au niveau de l'expression d'un gène ne se traduisent pas nécessairement par des

changements au niveau de la concentration en protéines. De plus, la génomique ne nous renseigne pas quant aux modifications post-traductionnelles et à la localisation des protéines, des événements qui influencent directement l'activité d'une protéine. La protéomique, qui est donc un complément utile à l'approche génomique, représente donc une alternative intéressante pour étudier les mécanismes d'action du GLP-1 sur la cellule β . La technologie de la protéomique pourrait permettre d'étudier les modifications post-traductionnelles et de déterminer le profil de phosphorylation de plusieurs kinases en réponse au GLP-1.

Analyse protéomique des modifications post-traductionnelles en réponse au GLP-1 par électrophorèse en 2 dimensions (2D) et spectrométrie de masse

Des échantillons obtenus par fractionnement cellulaire de cellules β , incubées en présence ou en absence de GLP-1, pourraient être soumis à une électrophorèse-2D, séparant les protéines en fonction de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire. Suite à une analyse par autoradiographie qui compare l'intensité et la position des « spots », ceux qui seront modifiés par un traitement au GLP-1 seront extraits, digérés et soumis à une analyse par spectrométrie de masse. Ce genre d'étude permet d'étudier les différences au niveau de la concentration d'une protéine donnée, dans sa localisation cellulaire et renseigne quant aux modifications post-traductionnelles subies par cette protéine. On pourrait aussi avoir recours à des approches jugées plus sensibles telle que l'analyse protéomique par chromatographie liquide-2D. Bien qu'il soit difficile de prédire les résultats obtenus par ce type d'expérience, il est permis de croire que l'analyse protéomique permettra une avancée des connaissances quant aux modifications post-traductionnelles induites par le GLP-1 et pouvant participer à l'effet pléiotropique de l'hormone gluco-incréatine.

Déterminer le profil de phosphorylation des kinases en réponse au GLP-1

Les techniques naissantes dans le domaine de la protéomique permettent maintenant l'étude simultanée de l'activation de plusieurs kinases impliquées dans différentes

voies de signalisation. Ainsi, pour gagner rapidement de l'information sur les voies de signalisation activées en réponse au GLP-1, on aura recours à ce type de technologie. Un profil d'activation de kinases permet de déterminer la localisation cellulaire, les niveaux de phosphorylation de même que l'activité de quelques dizaines de kinases. Une telle approche permettra l'identification de nouveaux candidats pouvant participer à l'effet pléiotropique de l'hormone et pourrait même permettre de formuler de nouvelles hypothèses sur de nouveaux effets biologiques du GLP-1. Bien entendu, les résultats obtenus seront confirmés par immunobuvardage de type western et par des études de localisation cellulaire par microscopie en immunofluorescence.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsen, N. and Nishimura, E. (1995). "Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids." *Endocrinology* **136**(4): 1572-8.
- Accili, D. (2001). "A kinase in the life of the beta cell." *J Clin Invest* **108**(11): 1575-6.
- Accili, D., Kido, Y., Nakae, J., Lauro, D. and Park, B. C. (2001). "Genetics of type 2 diabetes: insight from targeted mouse mutants." *Curr Mol Med* **1**(1): 9-23.
- Agero, H., Jensen, L. B., Elbrond, B., Rolan, P. and Zdravkovic, M. (2002). "The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men." *Diabetologia* **45**(2): 195-202.
- Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1999). "Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels." *Endocr Rev* **20**(2): 101-35.
- Ahren, B., Simonsson, E., Larsson, H., Landin-Olsson, M., Torgeirsson, H., Jansson, P. A., Sandqvist, M., Bavenholm, P., Efendic, S., Eriksson, J. W., Dickinson, S. and Holmes, D. (2002). "Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes." *Diabetes Care* **25**(5): 869-75.
- Alarcon, C., Wicksteed, B., Prentki, M., Corkey, B. E. and Rhodes, C. J. (2002). "Succinate is a preferential metabolic stimulus-coupling signal for glucose-induced proinsulin biosynthesis translation." *Diabetes* **51**(8): 2496-504.
- Alcazar, O., Qiu-yue, Z., Gine, E. and Tamarit-Rodriguez, J. (1997). "Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid." *Diabetes* **46**(7): 1153-1158.
- Alessenko, A. V., Platonova, L. V., Sakevarashvili, G. R., Khrenov, A. V., Shingarova, L. N., Shono, N. I. and Galperin, E. I. (1999). "Role of endogenous TNF-alpha and sphingosine in induced DNA synthesis in

- regenerating rat liver after partial hepatectomy." *Biochemistry (Mosc.)* **64**(8): 890-895.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." *Curr Biol* **7**(4): 261-9.
- Altshuler, D., Hirschhorn, J. N., Klannemark, M., Lindgren, C. M., Vohl, M. C., Nemesh, J., Lane, C. R., Schaffner, S. F., Bolk, S., Brewer, C., Tuomi, T., Gaudet, D., Hudson, T. J., Daly, M., Groop, L. and Lander, E. S. (2000). "The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes." *Nat Genet* **26**(1): 76-80.
- Amrani, A., Verdaguer, J., Anderson, B., Utsugi, T., Bou, S. and Santamaria, P. (1999). "Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice." *J Clin Invest* **103**(8): 1201-9.
- Anderson, B., Park, B. J., Verdaguer, J., Amrani, A. and Santamaria, P. (1999). "Prevalent CD8(+) T cell response against one peptide/MHC complex in autoimmune diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9311-6.
- Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R. and Hawkins, P. T. (1998). "Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B." *Curr.Biol.* **8**(12): 684-691.
- Antinozzi, P. A., Segall, L., Prentki, M., McGarry, J. D. and Newgard, C. B. (1998). "Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion. A re-evaluation of the long-chain acyl-CoA hypothesis." *J Biol Chem* **273**(26): 16146-54.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A. and Wollheim, C. B. (1992). "Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines." *Endocrinology* **130**(1): 167-78.
- Ashcroft, F. M., Ashcroft, S.J.H. (1992). "Insulin: molecular biology to pathology. Oxford University Press, New York."

- Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Roche, E., Esser, V., McGarry, J. D. and Prentki, M. (1997). "Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic beta-cell line INS-1." *J Biol Chem* **272**(3): 1659-64.
- Ausserer, W. A., Bourrat-Floeck, B., Green, C. J., Laderoute, K. R. and Sutherland, R. M. (1994). "Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress." *Mol. Cell Biol.* **14**(8): 5032-5042.
- Bailey, C. J. and Turner, R. C. (1996). "Metformin." *N Engl J Med* **334**(9): 574-9.
- Baldwin, A. S. (2001). "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB." *J Clin Invest* **107**(3): 241-6.
- Bandyopadhyay, G., Standaert, M. L., Galloway, L., Moscat, J. and Farese, R. V. (1997). "Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes." *Endocrinology* **138**(11): 4721-31.
- Barkett, M. and Gilmore, T. D. (1999). "Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6910-24.
- Bartoov-Shifman, R., Hertz, R., Wang, H., Wollheim, C. B., Bar-Tana, J. and Walker, M. D. (2002). "Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha." *J Biol Chem* **277**(29): 25914-9.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. and Tsichlis, P. N. (1991). "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region." *Science* **254**(5029): 274-7.
- Bergman, R. N. and Ader, M. (2000). "Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *Trends Endocrinol Metab* **11**(9): 351-6.
- Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M. and Permutt, M. A. (2001). "Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia." *J Clin Invest* **108**(11): 1631-8.

- Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin, R. S. and Moscat, J. (1993). "Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction." *Cell* **74**(3): 555-563.
- Bjorklund, A. and Grill, V. (1999). "Enhancing effects of long-term elevated glucose and palmitate on stored and secreted proinsulin-to-insulin ratios in human pancreatic islets." *Diabetes* **48**(7): 1409-1414.
- Boden, G. (1997). "Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM." *Diabetes* **46**(1): 3-10.
- Boden, G., Chen, X., Rosner, J. and Barton, M. (1995). "Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization." *Diabetes* **44**(10): 1239-1242.
- Boj, S. F., Parrizas, M., Maestro, M. A. and Ferrer, J. (2001). "A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14481-6.
- Bollheimer, L. C., Skelly, R. H., Chester, M. W., McGarry, J. D. and Rhodes, C. J. (1998). "Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation." *J.Clin.Invest.* **101**(5): 1094-1101.
- Bonner-Weir, S. (2000a). "Islet growth and development in the adult." *J Mol Endocrinol* **24**(3): 297-302.
- Bonner-Weir, S. (2000b). "Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth." *Endocrinology* **141**(6): 1926-9.
- Bonner-Weir, S., Baxter, L. A., Schuppin, G. T. and Smith, F. E. (1993). "A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development." *Diabetes* **42**(12): 1715-1720.
- Bonner-Weir, S. and Sharma, A. (2002). "Pancreatic stem cells." *J Pathol* **197**(4): 519-26.
- Bonny, C., Roudit, R., Gremlich, S., Nicod, P., Thorens, B. and Waeber, G. (1997). "The loss of GLUT2 expression in the pancreatic beta-cells of diabetic db/db

- mice is associated with an impaired DNA-binding activity of islet-specific trans-acting factors." *Mol Cell Endocrinol* **135**(1): 59-65.
- Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L. and Yaniv, M. (1997). "Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun." *EMBO J.* **16**(7): 1695-1709.
- Bouwens, L. (1998). "Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas." *Microsc.Res.Tech.* **43**(4): 332-336.
- Briaud, I., Harmon, J. S., Kelpe, C. L., Segu, V. B. and Poitout, V. (2001). "Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids." *Diabetes* **50**(2): 315-21.
- Briaud, I., Rouault, C., Reach, G. and Poitout, V. (1999). "Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels." *Metabolism* **48**(3): 319-23.
- Brun, T., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B. E. and Prentki, M. (1997). "Long-chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line INS-1." *Diabetes* **46**(3): 393-400.
- Brun, T., Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B. E., Kim, K. H. and Prentki, M. (1996). "Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling." *Diabetes* **45**(2): 190-8.
- Bruning, J. C., Michael, M. D., Winnay, J. N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L. J. and Kahn, C. R. (1998). "A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance." *Mol Cell* **2**(5): 559-69.
- Bullock, B. P., Heller, R. S. and Habener, J. F. (1996). "Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor." *Endocrinology* **137**(7): 2968-78.
- Bunemann, M. and Hosey, M. M. (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." *J Physiol* **517** (Pt 1): 5-23.
- Buteau, J., Foisy, S., Joly, E. and Prentki, M. (2003). "Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor." *Diabetes* **52**(1): 124-32.

- Buteau, J., Foisy, S., Rhodes, C. J., Carpenter, L., Biden, T. J. and Prentki, M. (2001). "Protein kinase C ζ activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation." *Diabetes* **50**(10): 2237-43.
- Buteau, J., Roduit, R., Susini, S. and Prentki, M. (1999). "Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells." *Diabetologia* **42**(7): 856-64.
- Campbell, R. K. (1998). "Glimepiride: role of a new sulfonylurea in the treatment of type 2 diabetes mellitus." *Ann Pharmacother* **32**(10): 1044-52.
- Campos, R. V., Lee, Y. C. and Drucker, D. J. (1994). "Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse." *Endocrinology* **134**(5): 2156-64.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* **296**(5573): 1655-7.
- Cantley, L. C. and Neel, B. G. (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**(8): 4240-4245.
- Cardozo, A. K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T. and Eizirik, D. L. (2001). "A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells." *J Biol Chem* **276**(52): 48879-86.
- Carpenter, L., Cordery, D. and Biden, T. J. (2002). "Inhibition of protein kinase C delta protects rat INS-1 cells against interleukin-1beta and streptozotocin-induced apoptosis." *Diabetes* **51**(2): 317-24.
- Carraway, K. L., 3rd and Sweeney, C. (2001). "Localization and modulation of ErbB receptor tyrosine kinases." *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 125-30.
- Castillo, A. I., Tolon, R. M. and Aranda, A. (1998). "Insulin-like growth factor-1 stimulates rat prolactin gene expression by a Ras, ETS and phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism." *Oncogene* **16**(15): 1981-1991.

- Chang, I., Kim, S., Kim, J. Y., Cho, N., Kim, Y. H., Kim, H. S., Lee, M. K., Kim, K. W. and Lee, M. S. (2003). "Nuclear Factor kappaB Protects Pancreatic beta-Cells From Tumor Necrosis Factor-alpha-Mediated Apoptosis." *Diabetes* **52**(5): 1169-75.
- Cheatham, B. and Kahn, C. R. (1995). "Insulin action and the insulin signaling network." *Endocr.Rev.* **16**(2): 117-142.
- Chen, F., Castranova, V. and Shi, X. (2001). "New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation." *Am J Pathol* **159**(2): 387-97.
- Chepurny, O. G., Hussain, M. A. and Holz, G. G. (2002). "Exendin-4 as a stimulator of rat insulin I gene promoter activity via bZIP/CRE interactions sensitive to serine/threonine protein kinase inhibitor Ro 31-8220." *Endocrinology* **143**(6): 2303-13.
- Chick, W. L., Warren, S., Chute, R. N., Like, A. A., Lauris, V. and Kitchen, K. C. (1977). "A transplantable insulinoma in the rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(2): 628-32.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S. and Toker, A. (1998). "Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1." *Curr Biol* **8**(19): 1069-77.
- Clark, S. A., Burnham, B. L. and Chick, W. L. (1990). "Modulation of glucose-induced insulin secretion from a rat clonal beta-cell line." *Endocrinology* **127**(6): 2779-88.
- Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L. and Pipeleers, D. G. (2001). "Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation." *Diabetes* **50**(8): 1771-7.
- Corkey, B. E., Deeney, J. T., Yaney, G. C., Tornheim, K. and Prentki, M. (2000). "The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction." *J Nutr* **130**(2S Suppl): 299S-304S.
- Cousin, S. P., Hugl, S. R., Myers, J. M., White, M. F., Reifel-Miller, A. and Rhodes, C. J. (1999). "Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no

- crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling." *Biochem.J.* **344 Pt 3:649-58**: 649-658.
- Cras-Meneur, C., Elghazi, L., Czernichow, P. and Scharfmann, R. (2001). "Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation." *Diabetes* **50(7)**: 1571-9.
- Crespin, S. R., Greenough, W. B. and Steinberg, D. (1973). "Stimulation of insulin secretion by long-chain free fatty acids. A direct pancreatic effect." *J.Clin.Invest.* **52(8)**: 1979-1984.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378(6559)**: 785-789.
- Cross, T. G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M. and Lord, J. M. (2000). "Serine/threonine protein kinases and apoptosis." *Exp Cell Res* **256(1)**: 34-41.
- Darnell, J. E., Jr (1996). "Reflections on STAT3, STAT5, and STAT6 as fat STATs." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93(13)**: 6221-6224.
- Daub, H., Wallasch, C., Lanckenau, A., Herrlich, A. and Ullrich, A. (1997). "Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor." *EMBO J.* **16(23)**: 7032-7044.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* **379(6565)**: 557-60.
- de Courten, M. and Zimmet, P. (1997). "Screening for non-insulin-dependent diabetes mellitus: where to draw the line? [editorial; comment]." *Diabet.Med.* **14(2)**: 95-98.
- Deacon, C. F., Johnsen, A. H. and Holst, J. J. (1995). "Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo." *J Clin Endocrinol Metab* **80(3)**: 952-7.

- Deeney, J. T., Gromada, J., Hoy, M., Olsen, H. L., Rhodes, C. J., Prentki, M., Berggren, P. O. and Corkey, B. E. (2000a). "Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells)." *J Biol Chem* **275**(13): 9363-8.
- Deeney, J. T., Prentki, M. and Corkey, B. E. (2000b). "Metabolic control of beta-cell function." *Semin Cell Dev Biol* **11**(4): 267-75.
- DeFronzo, R. A. (1988). "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM." *Diabetes* **37**(6): 667-87.
- DeFronzo, R. A. (1997). "Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis." *Neth.J.Med.* **50**(5): 191-197.
- DeFronzo, R. A. (1999). "Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus." *Ann Intern Med* **131**(4): 281-303.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G. (1997). "Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt." *Science* **278**(5338): 687-689.
- Desvergne, B., IJpenberg, A., Devchand, P. R. and Wahli, W. (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling." *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **65**(1-6): 65-74.
- Dhanasekaran, N., Tsim, S. T., Dermott, J. M. and Onesime, D. (1998). "Regulation of cell proliferation by G proteins." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1383-94.
- Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M. T., Alcami, J. and Paya, C. V. (1993). "A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation." *Mol.Cell Biol.* **13**(8): 4770-4775.
- Dobbins, R. L., Chester, M. W., Daniels, M. B., McGarry, J. D. and Stein, D. T. (1998a). "Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans." *Diabetes* **47**(10): 1613-1618.
- Dobbins, R. L., Chester, M. W., Stevenson, B. E., Daniels, M. B., Stein, D. T. and McGarry, J. D. (1998b). "A fatty acid- dependent step is critically important

- for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion." *J.Clin.Invest.* **101**(11): 2370-2376.
- Docherty, K. and Clark, A. R. (1994). "Nutrient regulation of insulin gene expression." *Faseb J* **8**(1): 20-7.
- Donath, M. Y., Gross, D. J., Cerasi, E. and Kaiser, N. (1999). "Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes." *Diabetes* **48**(4): 738-44.
- Drucker, D. J. (1998). "Glucagon-like peptides." *Diabetes* **47**(2): 159-169.
- Drucker, D. J. (2001a). "Development of glucagon-like peptide-1-based pharmaceuticals as therapeutic agents for the treatment of diabetes." *Curr Pharm Des* **7**(14): 1399-412.
- Drucker, D. J. (2001b). "Minireview: the glucagon-like peptides." *Endocrinology* **142**(2): 521-7.
- Duval, C., Auge, N., Frisach, M. F., Casteilla, L., Salvayre, R. and Negre-Salvayre, A. (2002). "Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase." *Biochem J* **367**(Pt 3): 889-94.
- Efanova, I. B., Zaitsev, S. V., Zhivotovsky, B., Kohler, M., Efendic, S., Orrenius, S. and Berggren, P. O. (1998). "Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca^{2+} concentration." *J Biol Chem* **273**(50): 33501-7.
- Efrat, S., Linde, S., Kofod, H., Spector, D., Delannoy, M., Grant, S., Hanahan, D. and Baekkeskov, S. (1988). "Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 9037-41.
- Efrat, S., Surana, M. and Fleischer, N. (1991). "Glucose induces insulin gene transcription in a murine pancreatic beta-cell line." *J Biol Chem* **266**(17): 11141-3.
- Eguchi, S., Iwasaki, H., Inagami, T., Numaguchi, K., Yamakawa, T., Motley, E. D., Owada, K. M., Marumo, F. and Hirata, Y. (1999). "Involvement of PYK2 in

- angiotensin II signaling of vascular smooth muscle cells." *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 201-206.
- Eitel, K., Staiger, H., Rieger, J., Mischak, H., Brandhorst, H., Brendel, M. D., Bretzel, R. G., Haring, H. U. and Kellerer, M. (2003). "Protein kinase C delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells." *Diabetes* **52**(4): 991-7.
- Eizirik, D. L., Bendtzen, K. and Sandler, S. (1991). "Short exposure of rat pancreatic islets to interleukin-1 beta induces a sustained but reversible impairment in beta-cell function: influence of protease activation, gene transcription, and protein synthesis." *Endocrinology* **128**(3): 1611-1616.
- El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M.-L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaibo, G., Rosenberg, L. and Prentki, M. "Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic β -cell death." *Endocrinology* **In Press**.
- Elbrond, B., Jakobsen, G., Larsen, S., Agerso, H., Jensen, L. B., Rolan, P., Sturis, J., Hatorp, V. and Zdravkovic, M. (2002). "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects." *Diabetes Care* **25**(8): 1398-404.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C. C., Ramachandran, C., Gresser, M. J., Tremblay, M. L. and Kennedy, B. P. (1999). "Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene [see comments]." *Science* **283**(5407): 1544-1548.
- Eto, K., Yamashita, T., Matsui, J., Terauchi, Y., Noda, M. and Kadowaki, T. (2002). "Genetic manipulations of fatty acid metabolism in beta-cells are associated with dysregulated insulin secretion." *Diabetes* **51 Suppl 3**: S414-20.
- Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B. and Prentki, M. (2000). "Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion." *Diabetes* **49**(5): 718-26.

- Farilla, L., Hui, H., Bertolotto, C., Kang, E., Bulotta, A., Di Mario, U. and Perfetti, R. (2002). "Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats." *Endocrinology* **143**(11): 4397-408.
- Federici, M., Hribal, M., Perego, L., Ranalli, M., Caradonna, Z., Perego, C., Usellini, L., Nano, R., Bonini, P., Bertuzzi, F., Marlier, L. N., Davalli, A. M., Carandente, O., Pontiroli, A. E., Melino, G., Marchetti, P., Lauro, R., Sesti, G. and Folli, F. (2001). "High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program." *Diabetes* **50**(6): 1290-301.
- Fehmann, H. C., Goke, R. and Goke, B. (1995). "Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide." *Endocr. Rev* **16**(3): 390-410.
- Fehmann, H. C. and Habener, J. F. (1992). "Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells." *Endocrinology* **130**(1): 159-66.
- Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., Barshack, I., Seijffers, R., Kopolovic, J., Kaiser, N. and Karasik, A. (2000). "Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia." *Nat Med* **6**(5): 568-72.
- Ferguson, S. S., Barak, L. S., Zhang, J. and Caron, M. G. (1996). "G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins." *Can J Physiol Pharmacol* **74**(10): 1095-110.
- Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S. and Caron, M. G. (1998). "Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization." *Life Sci* **62**(17-18): 1561-5.
- Fernandes, A., King, L. C., Guz, Y., Stein, R., Wright, C. V. and Teitelman, G. (1997). "Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets." *Endocrinology* **138**(4): 1750-1762.

- Filippa, N., Sable, C. L., Filloux, C., Hemmings, B. and Van Obberghen, E. (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase." *Mol Cell Biol* **19**(7): 4989-5000.
- Flamez, D., Gilon, P., Moens, K., Van Breusegem, A., Delmeire, D., Scrocchi, L. A., Henquin, J. C., Drucker, D. J. and Schuit, F. (1999). "Altered cAMP and Ca²⁺ signaling in mouse pancreatic islets with glucagon-like peptide-1 receptor null phenotype." *Diabetes* **48**(10): 1979-86.
- Flores, L. E., Garcia, M. E., Borelli, M. I., Del Zotto, H., Alzugaray, M. E., Maiztegui, B. and Gagliardino, J. J. (2003). "Expression of islet neogenesis-associated protein in islets of normal hamsters." *J Endocrinol* **177**(2): 243-8.
- Forman, B. M., Chen, J. and Evans, R. M. (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**(9): 4312-4317.
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. and Toker, A. (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." *Science* **275**(5300): 665-8.
- Freedman, N. J. and Lefkowitz, R. J. (1996). "Desensitization of G protein-coupled receptors." *Recent Prog Horm Res* **51**: 319-51; discussion 352-3.
- Froguel, P., Vaxillaire, M., Sun, F., Velho, G., Zouali, H., Butel, M. O., Lesage, S., Vionnet, N., Clement, K., Fougères, F. and et al. (1992). "Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus." *Nature* **356**(6365): 162-4.
- Fuchtenbusch, M., Standl, E. and Schatz, H. (2000). "Clinical efficacy of new thiazolidinediones and glinides in the treatment of type 2 diabetes mellitus." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **108**(3): 151-63.
- Furukawa, H., Carroll, R. J., Swift, H. H. and Steiner, D. F. (1999). "Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6." *Diabetes* **48**(7): 1395-1401.

- Furukawa, N., Shirotani, T., Araki, E., Kaneko, K., Todaka, M., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Motoshima, H., Yoshizato, K., Kishikawa, H. and Shichiri, M. (1999). "Possible involvement of atypical protein kinase C (PKC) in glucose-sensitive expression of the human insulin gene: DNA-binding activity and transcriptional activity of pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) are enhanced via calphostin C-sensitive but phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and Go 6976-insensitive pathway." *Endocr.J.* **46**(1): 43-58.
- Gagliardino, J. J., Del Zotto, H., Massa, L., Flores, L. E. and Borelli, M. I. (2003). "Pancreatic duodenal homeobox-1 and islet neogenesis-associated protein: a possible combined marker of activateable pancreatic cell precursors." *J Endocrinol* **177**(2): 249-59.
- Gao, Y., Tang, S., Zhou, S. and Ware, J. A. (2001). "The thromboxane A2 receptor activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C-dependent Gi coupling and Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **296**(2): 426-433.
- Gazdar, A. F., Chick, W. L., Oie, H. K., Sims, H. L., King, D. L., Weir, G. C. and Lauris, V. (1980). "Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6): 3519-23.
- Gembal, M., Gilon, P. and Henquin, J. C. (1992). "Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells." *J Clin Invest* **89**(4): 1288-95.
- German, M. S., Moss, L. G. and Rutter, W. J. (1990). "Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures." *J Biol Chem* **265**(36): 22063-6.
- Giannoukakis, N., Rudert, W. A., Trucco, M. and Robbins, P. D. (2000). "Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor." *J Biol Chem* **275**(47): 36509-13.
- Gloyn, A. L., Weedon, M. N., Owen, K. R., Turner, M. J., Knight, B. A., Hitman, G., Walker, M., Levy, J. C., Sampson, M., Halford, S., McCarthy, M. I., Hattersley, A. T. and Frayling, T. M. (2003). "Large-scale association studies

- of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes." *Diabetes* **52**(2): 568-72.
- Goldfine, I. D., Iwamoto, Y., Pezzino, V., Trischitta, V., Purrello, F. and Vigneri, R. (1984). "Effects of biguanides and sulfonylureas on insulin receptors in cultured cells." *Diabetes Care* **7 Suppl 1**: 54-8.
- Gonzalez, A., Andre-Schmutz, I., Carnaud, C., Mathis, D. and Benoist, C. (2001). "Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes." *Nat Immunol* **2**(12): 1117-25.
- Gotoh, M., Maki, T., Satomi, S., Porter, J., Bonner-Weir, S., O'Hara, C. J. and Monaco, A. P. (1987). "Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection." *Transplantation* **43**(5): 725-30.
- Greenspan, F. S. (1991). "Basic and clinical endocrinology: Pancretic hormones and diabetes mellitus." 3rd ed. Lange Medical Book, Appleton & Lange.
- Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G. and Thorens, B. (1997). "Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels." *J Biol Chem* **272**(48): 30261-9.
- Guay, D. R. (1998). "Repaglinide, a novel, short-acting hypoglycemic agent for type 2 diabetes mellitus." *Pharmacotherapy* **18**(6): 1195-204.
- Guerre-Millo, M., Rouault, C., Poulain, P., Andre, J., Poitout, V., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Fruchart, J. C., Reach, G. and Staels, B. (2001). "PPAR-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance." *Diabetes* **50**(12): 2809-14.
- Gutniak, M., Orskov, C., Holst, J. J., Ahren, B. and Efendic, S. (1992). "Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus." *N Engl J Med* **326**(20): 1316-22.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. and Baldwin, A. S., Jr. (1999). "NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5785-99.

- Guyton, A. C., and Hall, J.E. (1996). "Textbook of medical physiology." 9th ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Habener, J. F. and Stoffers, D. A. (1998). "A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus." *Proc. Assoc. Am. Physicians.* **110**(1): 12-21.
- Hanahan, D. (1985). "Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes." *Nature* **315**(6015): 115-22.
- Hansen, S. K., Parrizas, M., Jensen, M. L., Pruhova, S., Ek, J., Boj, S. F., Johansen, A., Maestro, M. A., Rivera, F., Eiberg, H., Andel, M., Lebl, J., Pedersen, O., Ferrer, J. and Hansen, T. (2002). "Genetic evidence that HNF-1alpha-dependent transcriptional control of HNF-4alpha is essential for human pancreatic beta cell function." *J Clin Invest* **110**(6): 827-33.
- Harrigan, R. A., Nathan, M. S. and Beattie, P. (2001). "Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity, and treatment." *Ann Emerg Med* **38**(1): 68-78.
- Harris, R. C., Chung, E. and Coffey, R. J. (2003). "EGF receptor ligands." *Exp Cell Res* **284**(1): 2-13.
- Heimberg, H., Heremans, Y., Jobin, C., Leemans, R., Cardozo, A. K., Darville, M. and Eizirik, D. L. (2001). "Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis." *Diabetes* **50**(10): 2219-24.
- Hellerstrom, C., Andersson, A., Swenne, I., Welsh, N. and Sjöholm, A. (1988). "Pathogenesis of NIDDM. Ravens Press. New York. pp. 79-91."
- Henry, R. R. (1997). "Thiazolidinediones." *Endocrinol Metab Clin North Am* **26**(3): 553-73.
- Henry, R. R., Wiest-Kent, T. A., Scheaffer, L., Kolterman, O. G. and Olefsky, J. M. (1986). "Metabolic consequences of very-low-calorie diet therapy in obese non-insulin-dependent diabetic and nondiabetic subjects." *Diabetes* **35**(2): 155-64.

- Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I. and Bar-Tana, J. (1998). "Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha." *Nature* **392**(6675): 512-516.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. and Strauss, M. (1999). "NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition." *Mol Cell Biol* **19**(4): 2690-8.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D'Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., Bensi, G. and et al. (1993). "Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop." *Mol Cell Biol* **13**(10): 6231-40.
- Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M. and Newgard, C. B. (2000). "Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion." *Diabetes* **49**(3): 424-30.
- Holst, J. J. (2000). "Gut hormones as pharmaceuticals. From enteroglucagon to GLP-1 and GLP-2." *Regul Pept* **93**(1-3): 45-51.
- Holst, J. J. (2002). "Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1." *Diabetes Metab Res Rev* **18**(6): 430-41.
- Holz, G. G., Leech, C. A., Heller, R. S., Castonguay, M. and Habener, J. F. (1999). "cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca²⁺ signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37)." *J Biol Chem* **274**(20): 14147-56.
- Holz, G. G. t., Kuhlreiber, W. M. and Habener, J. F. (1993). "Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37)." *Nature* **361**(6410): 362-5.
- Hori, Y., Rulifson, I. C., Tsai, B. C., Heit, J. J., Cahoy, J. D. and Kim, S. K. (2002). "Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 16105-10.
- Horikawa, Y., Iwasaki, N., Hara, M., Furuta, H., Hinokio, Y., Cockburn, B. N., Lindner, T., Yamagata, K., Ogata, M., Tomonaga, O., Kuroki, H., Kasahara,

- T., Iwamoto, Y. and Bell, G. I. (1997). "Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY." *Nat Genet* **17**(4): 384-5.
- Hosokawa, H., Corkey, B. E. and Leahy, J. L. (1997). "Beta-cell hypersensitivity to glucose following 24-h exposure of rat islets to fatty acids." *Diabetologia* **40**(4): 392-397.
- Hugl, S. R., White, M. F. and Rhodes, C. J. (1998). "Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells." *J.Biol.Chem.* **273**(28): 17771-17779.
- Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X. and Perfetti, R. (2003). "Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway." *Endocrinology* **144**(4): 1444-55.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992). "The regulation of transcription by phosphorylation." *Cell* **70**(3): 375-387.
- Huotari, M. A., Miettinen, P. J., Palgi, J., Koivisto, T., Ustinov, J., Harari, D., Yarden, Y. and Otonkoski, T. (2002). "ErbB signaling regulates lineage determination of developing pancreatic islet cells in embryonic organ culture." *Endocrinology* **143**(11): 4437-46.
- Huotari, M. A., Palgi, J. and Otonkoski, T. (1998). "Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen." *Endocrinology* **139**(4): 1494-1499.
- Hussain, M. A. and Habener, J. F. (2000). "Glucagon-like peptide 1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* **274**(3): 616-9.
- Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M. and Shima, K. (1996). "Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **224**(2): 597-604.

- Iwasaki, H., Eguchi, S., Ueno, H., Marumo, F. and Hirata, Y. (1999). "Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor." *Endocrinology* **140**(10): 4659-68.
- Jarrett, R. J. and Cohen, N. M. (1967). "Intestinal hormones and plasma-insulin. Some observations on glucagon, secretin, and gastrin." *Lancet* **2**(7521): 861-3.
- Jiang, F. X. and Harrison, L. C. (2002). "Extracellular Signals and Pancreatic [beta]-cell Development: A Brief Review." *Mol Med* **8**(12): 763-70.
- Jonas, J. C., Laybutt, D. R., Steil, G. M., Trivedi, N., Pertusa, J. G., Van de Casteele, M., Weir, G. C. and Henquin, J. C. (2001). "High glucose stimulates early response gene c-Myc expression in rat pancreatic beta cells." *J Biol Chem* **276**(38): 35375-81.
- Jonas, J. C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patane, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S. and Weir, G. C. (1999). "Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes." *J.Biol.Chem.* **274**(20): 14112-14121.
- Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F. and Hemmings, B. A. (1991). "Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10): 4171-5.
- Jonsson, J., Ahlgren, U., Edlund, T. and Edlund, H. (1995). "IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development." *Int J Dev Biol* **39**(5): 789-98.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. and Edlund, H. (1994). "Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice." *Nature* **371**(6498): 606-9.
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W. and Burgess, A. W. (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." *Exp Cell Res* **284**(1): 31-53.
- Juhl, C. B., Hollingdal, M., Sturis, J., Jakobsen, G., Agerso, H., Veldhuis, J., Porksen, N. and Schmitz, O. (2002). "Bedtime administration of NN2211, a long-

- acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes." *Diabetes* **51**(2): 424-9.
- Kahn, C. R. (1994). "Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes." *Diabetes* **43**(8): 1066-84.
- Kahn, S. E. (2003). "The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes." *Diabetologia*.
- Kaiser, N., Corcos, A. P., Sarel, I. and Cerasi, E. (1991). "Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: modulation of B-cell function by chronic exposure to high glucose." *Endocrinology* **129**(4): 2067-76.
- Kaiser, N., Leibowitz, G. and Nesher, R. (2003). "Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus." *J Pediatr Endocrinol Metab* **16**(1): 5-22.
- Kanai, F., Ito, K., Todaka, M., Hayashi, H., Kamohara, S., Ishii, K., Okada, T., Hazeki, O., Ui, M. and Ebina, Y. (1993). "Insulin-stimulated GLUT4 translocation is relevant to the phosphorylation of IRS-1 and the activity of PI3-kinase." *Biochem Biophys Res Commun* **195**(2): 762-8.
- Kang, G., Chepurny, O. G. and Holz, G. G. (2001). "cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in INS-1 pancreatic beta-cells." *J Physiol* **536**(Pt 2): 375-85.
- Karin, M. (1992). "Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease." *FASEB J.* **6**(8): 2581-2590.
- Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." *J. Biol. Chem.* **270**(28): 16483-16486.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997). "AP-1 function and regulation." *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(2): 240-246.
- Kataoka, K., Han, S. I., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M. and Handa, H. (2002). "MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene." *J Biol Chem* **277**(51): 49903-10.
- Keller, S. R., Lamphere, L., Lavan, B. E., Kuhne, M. R. and Lienhard, G. E. (1993). "Insulin and IGF-I signaling through the insulin receptor substrate 1." *Mol. Reprod. Dev.* **35**(4): 346-351.

- Kemp, D. M. and Habener, J. F. (2001). "Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) activation of insulin gene promoter inhibited by p38 mitogen-activated protein kinase." *Endocrinology* **142**(3): 1179-87.
- Kido, Y., Burks, D. J., Withers, D., Bruning, J. C., Kahn, C. R., White, M. F. and Accili, D. (2000). "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2." *J Clin Invest* **105**(2): 199-205.
- Kieffer, T. J., McIntosh, C. H. and Pederson, R. A. (1995). "Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." *Endocrinology* **136**(8): 3585-96.
- Kim, J. G., Baggio, L. L., Bridon, D. P., Castaigne, J. P., Robitaille, M. F., Jette, L., Benquet, C. and Drucker, D. J. (2003). "Development and characterization of a glucagon-like Peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like Peptide 1 receptor in vivo." *Diabetes* **52**(3): 751-9.
- King, D. L. and Chick, W. L. (1976). "Pancreatic beta cell replication: effects of hexose sugars." *Endocrinology* **99**(4): 1003-1009.
- King, D. L., Kitchen, K. C. and Chick, W. L. (1978). "Pancreatic beta-cell replication: relation to insulin secretion." *Endocrinology* **103**(4): 1321-1327.
- King, H. (1993). "Diabetes and the World Health Organization. Progress towards prevention and control." *Diabetes Care* **16**(1): 387-390.
- Klip, A., Ramlal, T., Bilan, P. J., Cartee, G. D., Gulve, E. A. and Holloszy, J. O. (1990). "Recruitment of GLUT-4 glucose transporters by insulin in diabetic rat skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* **172**(2): 728-36.
- Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M. and Heitz, P. U. (1985). "Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited." *Surv.Synth.Pathol.Res.* **4**(2): 110-125.
- Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Younan, P., Imaeda, H., Maeda, M. and Chan, L. (2003). "NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice." *Nat Med* **9**(5): 596-603.
- Kondo, T., Matsuda, T., Kitano, T., Takahashi, A., Tashima, M., Ishikura, H., Umehara, H., Domae, N., Uchiyama, T. and Okazaki, T. (2000). "Role of c-

- jun expression increased by heat shock- and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shock-induced apoptosis." *J.Biol.Chem.* **275**(11): 7668-7676.
- Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Ye, J. M., Thompson, A. L. and Furler, S. M. (2001). "The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109 Suppl 2**: S189-201.
- Kreymann, B., Williams, G., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (1987). "Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man." *Lancet* **2**(8571): 1300-4.
- Kristinsson, S. Y., Thorolfsdottir, E. T., Talseth, B., Steingrimsson, E., Thorsson, A. V., Helgason, T., Hreidarsson, A. B. and Arngrimsson, R. (2001). "MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1alpha and a novel mutation in NeuroD1." *Diabetologia* **44**(11): 2098-103.
- Kulkarni, R. N., Bruning, J. C., Winnay, J. N., Postic, C., Magnuson, M. A. and Kahn, C. R. (1999a). "Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes." *Cell* **96**(3): 329-339.
- Kulkarni, R. N., Winnay, J. N., Daniels, M., Bruning, J. C., Flier, S. N., Hanahan, D. and Kahn, C. R. (1999b). "Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines." *J.Clin.Invest.* **104**(12): R69-R75.
- Lacy, P. E. and Kostianovsky, M. (1967). "Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas." *Diabetes* **16**(1): 35-9.
- Lameloise, N., Muzzin, P., Prentki, M. and Assimakopoulos-Jeannet, F. (2001). "Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?" *Diabetes* **50**(4): 803-9.
- Larsen, P. J., Fledelius, C., Knudsen, L. B. and Tang-Christensen, M. (2001). "Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats." *Diabetes* **50**(11): 2530-9.

- Larsson, O., Deeney, J. T., Branstrom, R., Berggren, P. O. and Corkey, B. E. (1996). "Activation of the ATP-sensitive K⁺ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity." *J.Biol.Chem.* **271**(18): 10623-10626.
- Lavergne, C., Breant, B. and Rosselin, G. (1992). "Modulation of growth-related gene expression and growth inhibition by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-elevating agents in the insulin-producing cell line beta TC1." *Endocrinology* **131**(5): 2351-2356.
- Lawrence, M. C., Bhatt, H. S. and Easom, R. A. (2002). "NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1." *Diabetes* **51**(3): 691-8.
- Laybutt, R., Hasenkamp, W., Groff, A., Grey, S., Jonas, J. C., Kaneto, H., Sharma, A., Bonner-Weir, S. and Weir, G. (2001). "beta-cell adaptation to hyperglycemia." *Diabetes* **50 Suppl 1**: S180-1.
- Le Good, J., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P. and Parker, P. J. (1998). "Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1." *Science* **281**(5385): 2042-2045.
- Lee, H. H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. and Cheng, G. (1999). "NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9136-41.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J. H., McGarry, J. D. and Unger, R. H. (1994). "Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**(23): 10878-10882.
- Lefebvre, A. M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J. C., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R. and Auwerx, J. (1998). "Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice." *Nat Med* **4**(9): 1053-7.
- Leibiger, B., Moede, T., Schwarz, T., Brown, G. R., Kohler, M., Leibiger, I. B. and Berggren, P. O. (1998). "Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9307-12.

- Leibowitz, G., Yuli, M., Donath, M. Y., Nesher, R., Melloul, D., Cerasi, E., Gross, D. J. and Kaiser, N. (2001). "beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes." *Diabetes* **50 Suppl 1**: S113-7.
- Lemberger, T., Braissant, O., Juge-Aubry, C., Keller, H., Saladin, R., Staels, B., Auwerx, J., Burger, A. G., Meier, C. A. and Wahli, W. (1996). "PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways." *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **804:231-51**: 231-251.
- Leserer, M., Gschwind, A. and Ullrich, A. (2000). "Epidermal growth factor receptor signal transactivation." *IUBMB Life* **49(5)**: 405-9.
- Li, L., Seno, M., Yamada, H. and Kojima, I. (2001). "Promotion of beta-cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats." *Endocrinology* **142(12)**: 5379-85.
- Li, Y., Hansotia, T., Yusta, B., Ris, F., Halban, P. A. and Drucker, D. J. (2003). "Glucagon-like Peptide-1 Receptor Signaling Modulates beta Cell Apoptosis." *J Biol Chem* **278(1)**: 471-8.
- Lian, J. B., Stein, G. S., Bortell, R. and Owen, T. A. (1991). "Phenotype suppression: a postulated molecular mechanism for mediating the relationship of proliferation and differentiation by Fos/Jun interactions at AP-1 sites in steroid responsive promoter elements of tissue-specific genes." *J.Cell Biochem.* **45(1)**: 9-14.
- Liang, Y., Buettger, C., Berner, D. K. and Matschinsky, F. M. (1997). "Chronic effect of fatty acids on insulin release is not through the alteration of glucose metabolism in a pancreatic beta-cell line (beta HC9)." *Diabetologia* **40(9)**: 1018-1027.
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L. and Hung, M. C. (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." *Nat Cell Biol* **3(9)**: 802-8.
- Ling, Z., Kiekens, R., Mahler, T., Schuit, F. C., Pipeleers-Marichal, M., Sener, A., Kloppel, G., Malaisse, W. J. and Pipeleers, D. G. (1996). "Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta-cells." *Diabetes* **45(12)**: 1774-82.

- Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese, R. V., Jr., Ory, D. S. and Schaffer, J. E. (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3077-82.
- Logothetopoulos, J., Valiquette, N. and Cvet, D. (1983). "Glucose stimulation of beta-cell DNA replication in the intact rat and in pancreatic islets in suspension culture. Effects of alpha-ketoisocaproic acid, dibutyryl cyclic AMP, and 3-isobutyl-1-methylxanthine in the in vitro system." *Diabetes* **32**(12): 1172-1176.
- Lozano, J., Berra, E., Municio, M. M., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L. and Moscat, J. (1994). "Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase." *J. Biol. Chem.* **269**(30): 19200-19202.
- Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patane, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M., Bergamini, E., Mosca, F., Di Mario, U., Del Prato, S. and Marchetti, P. (2002). "Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated." *Diabetes* **51**(5): 1437-42.
- Luttrell, L. M. (2002). "Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein-coupled receptors." *Can J Physiol Pharmacol* **80**(5): 375-82.
- Luttrell, L. M., Daaka, Y. and Lefkowitz, R. J. (1999). "Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors." *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 177-83.
- Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." *J Cell Sci* **115**(Pt 3): 455-65.
- MacDougall, L. K., Domin, J. and Waterfield, M. D. (1995). "A family of phosphoinositide 3-kinases in Drosophila identifies a new mediator of signal transduction." *Curr. Biol.* **5**(12): 1404-1415.
- Macfarlane, W. M., Read, M. L., Gilligan, M., Bujalska, I. and Docherty, K. (1994). "Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor

- IUF1 in a phosphorylation-dependent manner." *Biochem.J.* **303**(Pt 2): 625-631.
- Macfarlane, W. M., Smith, S. B., James, R. F., Clifton, A. D., Doza, Y. N., Cohen, P. and Docherty, K. (1997). "The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells." *J.Biol.Chem.* **272**(33): 20936-20944.
- Madrid, L. V., Mayo, M. W., Reuther, J. Y. and Baldwin, A. S., Jr. (2001). "Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38." *J Biol Chem* **276**(22): 18934-40.
- Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G. A. and Donath, M. Y. (2003). "Monounsaturated Fatty Acids Prevent the Deleterious Effects of Palmitate and High Glucose on Human Pancreatic beta-Cell Turnover and Function." *Diabetes* **52**(3): 726-33.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P. A. and Donath, M. Y. (2002). "Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets." *J Clin Invest* **110**(6): 851-60.
- Maedler, K., Spinas, G. A., Dytar, D., Moritz, W., Kaiser, N. and Donath, M. Y. (2001). "Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function." *Diabetes* **50**(1): 69-76.
- Maehama, T. and Dixon, J. E. (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J.Biol.Chem.* **273**(22): 13375-13378.
- Maestre, I., Jordan, J., Calvo, S., Reig, J. A., Cena, V., Soria, B., Prentki, M. and Roche, E. (2003). "Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1." *Endocrinology* **144**(1): 335-45.
- Magnan, C., Collins, S., Berthault, M. F., Kassis, N., Vincent, M., Gilbert, M., Penicaud, L., Ktorza, A. and Assimacopoulos-Jeannet, F. (1999). "Lipid

- infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose." *J.Clin.Invest.* **103**(3): 413-419.
- Malecki, M. T., Jhala, U. S., Antonellis, A., Fields, L., Doria, A., Orban, T., Saad, M., Warram, J. H., Montminy, M. and Krolewski, A. S. (1999). "Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus." *Nat Genet* **23**(3): 323-8.
- Mandrup-Poulsen, T. (1990). "Cytokine-mediated beta-cell destruction--the molecular effector mechanism causing IDDM?" *J Autoimmun* **3 Suppl 1**: 121-2.
- Mandrup-Poulsen, T. (1996). "The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM." *Diabetologia* **39**(9): 1005-29.
- Mandrup-Poulsen, T. (2001). "beta-cell apoptosis: stimuli and signaling." *Diabetes* **50 Suppl 1**: S58-63.
- Marie, S., Diaz-Guerra, M. J., Miquerol, L., Kahn, A. and Iynedjian, P. B. (1993). "The pyruvate kinase gene as a model for studies of glucose-dependent regulation of gene expression in the endocrine pancreatic beta-cell type." *J Biol Chem* **268**(32): 23881-90.
- Mashima, H., Shibata, H., Mine, T. and Kojima, I. (1996). "Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor." *Endocrinology* **137**(9): 3969-76.
- Masiello, P., Novelli, M., Bombara, M., Fierabracci, V., Vittorini, S., Prentki, M. and Bergamini, E. (2002). "The antilipolytic agent 3,5-dimethylpyrazole inhibits insulin release in response to both nutrient secretagogues and cyclic adenosine monophosphate agonists in isolated rat islets." *Metabolism* **51**(1): 110-4.
- Mason, T. M., Goh, T., Tchipashvili, V., Sandhu, H., Gupta, N., Lewis, G. F. and Giacca, A. (1999). "Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats." *Diabetes* **48**(3): 524-530.
- Mathias, S., Pena, L. A. and Kolesnick, R. N. (1998). "Signal transduction of stress via ceramide." *Biochem.J.* **335**(Pt 3): 465-480.

- Mathis, D., Vence, L. and Benoist, C. (2001). "beta-Cell death during progression to diabetes." *Nature* **414**(6865): 792-8.
- Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A. and Ju, S. T. (1998). "Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma." *J Immunol* **161**(7): 3469-73.
- Matthaei, S., Stumvoll, M., Kellerer, M. and Haring, H. U. (2000). "Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance." *Endocr Rev* **21**(6): 585-618.
- Mattson, M. P. and Camandola, S. (2001). "NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders." *J Clin Invest* **107**(3): 247-54.
- Maudsley, S., Pierce, K. L., Zamah, A. M., Miller, W. E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R. J. and Luttrell, L. M. (2000). "The beta(2)-adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem* **275**(13): 9572-80.
- McDonald, P. H. and Lefkowitz, R. J. (2001). "Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions." *Cell Signal* **13**(10): 683-9.
- McGarry, J. D. and Dobbins, R. L. (1999). "Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion." *Diabetologia* **42**(2): 128-38.
- Melloul, D., Marshak, S. and Cerasi, E. (2002a). "Regulation of insulin gene transcription." *Diabetologia* **45**(3): 309-26.
- Melloul, D., Marshak, S. and Cerasi, E. (2002b). "Regulation of pdx-1 gene expression." *Diabetes* **51 Suppl 3**: S320-5.
- Melloul, D., Tsur, A. and Zangen, D. (2002c). "Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX-1) in health and disease." *J Pediatr Endocrinol Metab* **15**(9): 1461-72.
- Mentlein, R., Gallwitz, B. and Schmidt, W. E. (1993). "Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum." *Eur J Biochem* **214**(3): 829-35.

- Miettinen, P. J., Huotari, M., Koivisto, T., Ustinov, J., Palgi, J., Rasilainen, S., Lehtonen, E., Keski-Oja, J. and Otonkoski, T. (2000). "Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors." *Development* **127**(12): 2617-27.
- Miller, C. P., McGehee, R. E., Jr. and Habener, J. F. (1994). "IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene." *Embo J* **13**(5): 1145-56.
- Miller, W. E. and Lefkowitz, R. J. (2001). "Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 139-45.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y. and Yamamura, K. (1990). "Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms." *Endocrinology* **127**(1): 126-32.
- Moens, K., Flamez, D., Van Schravendijk, C., Ling, Z., Pipeleers, D. and Schuit, F. (1998). "Dual glucagon recognition by pancreatic beta-cells via glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors." *Diabetes* **47**(1): 66-72.
- Moscat, J. and Diaz-Meco, M. T. (2000). "The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters." *EMBO Rep* **1**(5): 399-403.
- Movassat, J., Beattie, G. M., Lopez, A. D. and Hayek, A. (2002). "Exendin 4 up-regulates expression of PDX 1 and hastens differentiation and maturation of human fetal pancreatic cells." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(10): 4775-81.
- Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Malstrom, S. E., Tschlis, P. N. and Rosen, N. (1998). "Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway." *J Biol Chem* **273**(45): 29864-72.
- Naslund, E., Skogar, S., Efendic, S. and Hellstrom, P. M. (2002). "Glucagon-like peptide-1 analogue LY315902: effect on intestinal motility and release of insulin and somatostatin." *Regul Pept* **106**(1-3): 89-95.
- Nicholson, K. M. and Anderson, N. G. (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cell Signal* **14**(5): 381-95.

- Nie, Y., Nakashima, M., Brubaker, P. L., Li, Q. L., Perfetti, R., Jansen, E., Zambre, Y., Pipeleers, D. and Friedman, T. C. (2000). "Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats." *J Clin Invest* **105**(7): 955-65.
- Nielsen, J. H. (1985). "Dissociation between insulin secretion and DNA synthesis in cultured pancreatic islets." *Biomed.Biochim.Acta* **44**(1): 161-166.
- O'Dea, K. (1991). "Westernisation, insulin resistance and diabetes in Australian aborigines." *Med.J.Aust.* **155**(4): 258-264.
- Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., Hogan, B. L. and Wright, C. V. (1996). "PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum." *Development* **122**(3): 983-995.
- Olbrot, M., Rud, J., Moss, L. G. and Sharma, A. (2002). "Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6737-42.
- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. and Spiegel, S. (1999). "Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival." *J.Cell Biol.* **147**(3): 545-558.
- Olson, L. K., Sharma, A., Peshavaria, M., Wright, C. V., Towle, H. C., Rodertson, R. P. and Stein, R. (1995). "Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**(20): 9127-9131.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6853-66.
- Parekh, D., Ziegler, W., Yonezawa, K., Hara, K. and Parker, P. J. (1999). "Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon." *J Biol Chem* **274**(49): 34758-64.
- Parekh, D. B., Ziegler, W. and Parker, P. J. (2000). "Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation." *EMBO J.* **19**(4): 496-503.

- Permutt, M. A. and Kipnis, D. M. (1972a). "Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation." *J Biol Chem* **247**(4): 1194-9.
- Permutt, M. A. and Kipnis, D. M. (1972b). "Insulin biosynthesis. II. Effect of glucose on ribonucleic acid synthesis in isolated rat islets." *J Biol Chem* **247**(4): 1200-7.
- Phillips, M. S., Liu, Q., Hammond, H. A., Dugan, V., Hey, P. J., Caskey, C. J. and Hess, J. F. (1996). "Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat [letter]." *Nat. Genet.* **13**(1): 18-19.
- Piechaczyk, M. and Blanchard, J. M. (1994). "c-fos proto-oncogene regulation and function." *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* **17**(2): 93-131.
- Pierce, K. L. and Lefkowitz, R. J. (2001). "Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Neurosci* **2**(10): 727-33.
- Pierce, K. L., Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2001). "New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades." *Oncogene* **20**(13): 1532-9.
- Pilkis, S. J. and Granner, D. K. (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." *Annu Rev Physiol* **54**: 885-909.
- Piro, S., Anello, M., Di Pietro, C., Lizzio, M. N., Patane, G., Rabuazzo, A. M., Vigneri, R., Purrello, M. and Purrello, F. (2002). "Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress." *Metabolism* **51**(10): 1340-7.
- Poitout, V. and Robertson, R. P. (1996). "An integrated view of beta-cell dysfunction in type-II diabetes." *Annu Rev Med* **47**: 69-83.
- Poitout, V. and Robertson, R. P. (2002). "Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* **143**(2): 339-42.
- Poitout, V., Stout, L. E., Armstrong, M. B., Walseth, T. F., Sorenson, R. L. and Robertson, R. P. (1995). "Morphological and functional characterization of beta TC-6 cells--an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice." *Diabetes* **44**(3): 306-13.

- Polak, M., Bouchareb-Banaei, L., Scharfmann, R. and Czernichow, P. (2000). "Early pattern of differentiation in the human pancreas." *Diabetes* **49**(2): 225-32.
- Pour, P. M. (1994). "Pancreatic centroacinar cells. The regulator of both exocrine and endocrine function." *Int.J.Pancreatol.* **15**(1): 51-64.
- Prentki, M. (1996). "New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion." *Eur J Endocrinol* **134**(3): 272-86.
- Prentki, M. and Corkey, B. E. (1996). "Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?" *Diabetes* **45**(3): 273-83.
- Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W. and Roduit, R. (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." *Diabetes* **51 Suppl 3**: S405-13.
- Prentki, M., Tornheim, K. and Corkey, B. E. (1997). "Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion." *Diabetologia* **40 Suppl 2**: S32-41.
- Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001). "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification." *Endocr Relat Cancer* **8**(1): 11-31.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. and Ullrich, A. (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." *Nature* **402**(6764): 884-8.
- Rabinovitch, A., Blondel, B., Murray, T. and Mintz, D. H. (1980). "Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate stimulates islet B cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures." *J.Clin.Invest.* **66**(5): 1065-1071.
- Rabinovitch, A., Quigley, C., Russell, T., Patel, Y. and Mintz, D. H. (1982). "Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet (beta-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures." *Diabetes* **31**(2): 160-164.
- Rafaeloff, R., Pittenger, G. L., Barlow, S. W., Qin, X. F., Yan, B., Rosenberg, L., Duguid, W. P. and Vinik, A. I. (1997). "Cloning and sequencing of the

- pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters." *J Clin Invest* **99**(9): 2100-9.
- Rafiq, I., da Silva, X. G., Hooper, S. and Rutter, G. A. (2000). "Glucose-stimulated preproinsulin gene expression and nuclear trans-location of pancreatic duodenum homeobox-1 require activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not p38 MAPK/SAPK2." *J Biol. Chem.* **275**(21): 15977-15984.
- Rahier, J., Goebbels, R. M. and Henquin, J. C. (1983). "Cellular composition of the human diabetic pancreas." *Diabetologia* **24**(5): 366-371.
- Ramiya, V. K., Maraist, M., Arfors, K. E., Schatz, D. A., Peck, A. B. and Cornelius, J. G. (2000). "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells." *Nat Med* **6**(3): 278-82.
- Randle, P. J. (1998). "Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years." *Diabetes Metab.Rev.* **14**(4): 263-283.
- Ranganath, L. R., Beety, J. M., Morgan, L. M., Wright, J. W., Howland, R. and Marks, V. (1996). "Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence?" *Gut* **38**(6): 916-9.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S. C., Unterman, T. G. and Cohen, P. (1999). "Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B." *J Biol Chem* **274**(24): 17179-83.
- Ribel, U., Larsen, M. O., Rolin, B., Carr, R. D., Wilken, M., Sturis, J., Westergaard, L., Deacon, C. F. and Knudsen, L. B. (2002). "NN2211: a long-acting glucagon-like peptide-1 derivative with anti-diabetic effects in glucose-intolerant pigs." *Eur J Pharmacol* **451**(2): 217-25.
- Riese, D. J., Bermingham, Y., van, R. T., Buckley, S., Plowman, G. D. and Stern, D. F. (1996). "Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta." *Oncogene* **12**(2): 345-353.
- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y. and Takahashi, H. (2003). "Glucose Toxicity in beta-Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection." *Diabetes* **52**(3): 581-7.

- Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J. A., Soria, B. and Prentki, M. (1999). "Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1." *Diabetes* **48**(10): 2007-14.
- Roche, E., Farfari, S., Witters, L. A., Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Brun, T., Corkey, B. E., Saha, A. K. and Prentki, M. (1998). "Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression." *Diabetes* **47**(7): 1086-94.
- Roche, E. and Prentki, M. (1994). "Calcium regulation of immediate-early response genes." *Cell Calcium* **16**(4): 331-338.
- Rodbell, M. (1996). "G proteins: out of the cytoskeletal closet." *Mt Sinai J Med* **63**(5-6): 381-6.
- Rodbell, M. (1997). "The complex regulation of receptor-coupled G-proteins." *Adv Enzyme Regul* **37**: 427-35.
- Roduit, R., Masiello, P., Wang, S. P., Li, H., Mitchell, G. A. and Prentki, M. (2001). "A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice." *Diabetes* **50**(9): 1970-5.
- Roduit, R., Morin, J., Masse, F., Segall, L., Roche, E., Newgard, C. B., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Prentki, M. (2000). "Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta -cell." *J Biol Chem* **275**(46): 35799-806.
- Rolin, B., Larsen, M. O., Gotfredsen, C. F., Deacon, C. F., Carr, R. D., Wilken, M. and Knudsen, L. B. (2002). "The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(4): E745-52.
- Romanus, J. A., Rabinovitch, A. and Rechler, M. M. (1985). "Neonatal rat islet cell cultures synthesize insulin-like growth factor I." *Diabetes* **34**(7): 696-702.
- Romashkova, J. A. and Makarov, S. S. (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." *Nature* **401**(6748): 86-90.
- Rosenberg, L. (1998). "Induction of islet cell neogenesis in the adult pancreas: the partial duct obstruction model." *Microsc Res Tech* **43**(4): 337-46.

- Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M. C., Alvarez, J. G., Ming, U. T., Baird, S. M., Thomazy, V. A. and Evans, R. M. (1998). "Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation." *Nat Med* **4**(9): 1058-61.
- Sako, Y. and Grill, V. E. (1990). "A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation." *Endocrinology* **127**(4): 1580-1589.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Sandhu, H., Wiesenthal, S. R., MacDonald, P. E., McCall, R. H., Tchipashvili, V., Rashid, S., Satkunarajah, M., Irwin, D. M., Shi, Z. Q., Brubaker, P. L., Wheeler, M. B., Vranic, M., Efendic, S. and Giacca, A. (1999). "Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs." *Diabetes* **48**(5): 1045-53.
- Santerre, R. F., Cook, R. A., Crisel, R. M., Sharp, J. D., Schmidt, R. J., Williams, D. C. and Wilson, C. P. (1981). "Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7): 4339-43.
- Scharfmann, R. and Czernichow, P. (1996). "Differentiation and growth of pancreatic beta cells." *Diabetes Metab.* **22**(4): 223-228.
- Schoonjans, K., Staels, B. and Auwerx, J. (1996). "The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation." *Biochim.Biophys.Acta* **1302**(2): 93-109.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P. and Wagner, E. F. (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." *Genes Dev.* **13**(5): 607-619.
- Schrezenmeir, J. a. L., C. (1997). "Apoptosis and proliferation of islet cells: in vitro model for diabetogenesis." *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **105**: 95.
- Schuppin, G. T., Pons, S., Hugl, S., Aiello, L. P., King, G. L., White, M. and Rhodes, C. J. (1998). "A specific increased expression of insulin receptor substrate 2

in pancreatic beta-cell lines is involved in mediating serum-stimulated beta-cell growth." *Diabetes* **47**(7): 1074-1085.

- Schwanstecher, C., Meyer, U. and Schwanstecher, M. (2002a). "K(IR)6.2 polymorphism predisposes to type 2 diabetes by inducing overactivity of pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels." *Diabetes* **51**(3): 875-9.
- Schwanstecher, C., Neugebauer, B., Schulz, M. and Schwanstecher, M. (2002b). "The common single nucleotide polymorphism E23K in K(IR)6.2 sensitizes pancreatic beta-cell ATP-sensitive potassium channels toward activation through nucleoside diphosphates." *Diabetes* **51 Suppl 3**: S363-7.
- Schwanstecher, M., Schwanstecher, C., Chudziak, F., Panten, U., Clement, J. P. t., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L. and Bryan, J. (1999). "ATP-sensitive potassium channels." *Methods Enzymol* **294**: 445-58.
- Schwartz, J., Huo, J. S. and Piwien-Pilipuk, G. (2002). "Growth hormone regulated gene expression." *Minerva Endocrinol* **27**(4): 231-41.
- Segall, L., Lameloise, N., Assimacopoulos-Jeannet, F., Roche, E., Corkey, P., Thumelin, S., Corkey, B. E. and Prentki, M. (1999). "Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells." *Am.J.Physiol.* **277**(3 Pt 1): E521-E528.
- Sekine, N., Ullrich, S., Regazzi, R., Pralong, W. F. and Wollheim, C. B. (1996). "Postreceptor signalling of growth hormone and prolactin and their effects in the differentiated insulin-secreting cell line, INS-1." *Endocrinology* **137**(5): 1841-1850.
- Sekulic, A., Hudson, C. C., Homme, J. L., Yin, P., Otterness, D. M., Karnitz, L. M. and Abraham, R. T. (2000). "A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells." *Cancer Res* **60**(13): 3504-3513.
- Seno, M., Tada, H., Kosaka, M., Sasada, R., Igarashi, K., Shing, Y., Folkman, J., Ueda, M. and Yamada, H. (1996). "Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form." *Growth Factors* **13**(3-4): 181-91.

- Shang, W., Yasuda, K., Takahashi, A., Hamasaki, A., Takehiro, M., Nabe, K., Zhou, H., Naito, R., Fujiwara, H., Shimono, D., Ueno, H., Ikeda, H., Toyoda, K., Yamada, Y. and Kurose, T. (2002). "Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats." *Pancreas* **25**(4): 393-9.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M. and Rajotte, R. V. (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." *N Engl J Med* **343**(4): 230-8.
- Sharma, A., Olson, L. K., Robertson, R. P. and Stein, R. (1995). "The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression." *Mol. Endocrinol.* **9**(9): 1127-1134.
- Sharma, A., Zangen, D. H., Reitz, P., Taneja, M., Lissauer, M. E., Miller, C. P., Weir, G. C., Habener, J. F. and Bonner-Weir, S. (1999). "The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration." *Diabetes* **48**(3): 507-513.
- Sheng, M., Thompson, M. A. and Greenberg, M. E. (1991). "CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases." *Science* **252**(5011): 1427-1430.
- Shimabukuro, M., Higa, M., Zhou, Y. T., Wang, M. Y., Newgard, C. B. and Unger, R. H. (1998a). "Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression." *J Biol Chem* **273**(49): 32487-90.
- Shimabukuro, M., Ohneda, M., Lee, Y. and Unger, R. H. (1997). "Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease." *J Clin Invest* **100**(2): 290-5.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Lee, Y. and Unger, R. H. (1998b). "Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats." *J. Biol. Chem.* **273**(6): 3547-3550.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y. T., Levi, M. and Unger, R. H. (1998c). "Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2498-502.

- Shing, Y., Christofori, G., Hanahan, D., Ono, Y., Sasada, R., Igarashi, K. and Folkman, J. (1993). "Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors." *Science* **259**(5101): 1604-1607.
- Sjoholm, A. (1991). "Alpha-adrenergic inhibition of rat pancreatic beta-cell replication and insulin secretion is mediated through a pertussis toxin-sensitive G-protein regulating islet cAMP content." *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **180**(1): 152-155.
- Sjoholm, A. (1992). "Intracellular signal transduction pathways that control pancreatic beta-cell proliferation." *FEBS Lett.* **311**(2): 85-90.
- Sjoholm, A. (1996). "Diabetes mellitus and impaired pancreatic beta-cell proliferation." *J.Intern.Med.* **239**(3): 211-220.
- Sjoholm, A. (1997). "Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms." *Diabetes* **46**(7): 1141-1147.
- Skoglund, G., Hussain, M. A. and Holz, G. G. (2000). "Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element." *Diabetes* **49**(7): 1156-1164.
- Songer, T. J. and Zimmet, P. Z. (1995). "Epidemiology of type II diabetes: an international perspective." *Pharmacoeconomics.* **8 Suppl 1:1-11**: 1-11.
- Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T. and Martin, F. (2000). "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." *Diabetes* **49**(2):157-162.
- Southern, C., Schulster, D. and Green, I. C. (1990). "Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism." *FEBS Lett.* **276**(1-2): 42-44.
- Standaert, M. L., Galloway, L., Karnam, P., Bandyopadhyay, G., Moscat, J. and Farese, R. V. (1997). "Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport." *J Biol Chem* **272**(48): 30075-82.

- Stassi, G., De Maria, R., Trucco, G., Rudert, W., Testi, R., Galluzzo, A., Giordano, C. and Trucco, M. (1997). "Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus." *J Exp Med* **186**(8): 1193-200.
- Stein, D. T., Esser, V., Stevenson, B. E., Lane, K. E., Whiteside, J. H., Daniels, M. B., Chen, S. and McGarry, J. D. (1996). "Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat." *J.Clin.Invest.* **97**(12): 2728-2735.
- Stoffers, D. A., Kieffer, T. J., Hussain, M. A., Drucker, D. J., Bonner-Weir, S., Habener, J. F. and Egan, J. M. (2000). "Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas." *Diabetes* **49**(5): 741-8.
- Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L. and Habener, J. F. (1997). "Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence." *Nat.Genet.* **15**(1): 106-110.
- Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J. and White, M. F. (1991). "Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein." *Nature* **352**(6330): 73-77.
- Susini, S., Roche, E., Prentki, M. and Schlegel, W. (1998). "Glucose and glucoincetin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells." *Faseb J* **12**(12): 1173-82.
- Susini, S., Van Haasteren, G., Li, S., Prentki, M. and Schlegel, W. (2000). "Essentiality of intron control in the induction of c-fos by glucose and glucoincetin peptides in INS-1 beta-cells." *Faseb J* **14**(1): 128-36.
- Suzuki, A., Nakauchi, H. and Taniguchi, H. (2003). "Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5034-9.

- Swenne, I. (1982). "Effects of cyclic AMP on DNA replication and protein biosynthesis in fetal rat islets of Langerhans maintained in tissue culture." *Biosci.Rep.* **2**(11): 867-876.
- Swenne, I. (1983). "Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat." *Diabetes* **32**(1): 14-19.
- Swenne, I. (1992). "Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus." *Diabetologia* **35**(3): 193-201.
- Swenne, I., Bone, A. J., Howell, S. L. and Hellerstrom, C. (1980). "Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture." *Diabetes* **29**(9): 686-692.
- Tada, H., Sasada, R., Kawaguchi, Y., Kojima, I., Gullick, W. J., Salomon, D. S., Igarashi, K., Seno, M. and Yamada, H. (1999). "Processing and juxtacrine activity of membrane-anchored betacellulin." *J Cell Biochem* **72**(3): 423-34.
- Takaishi, H., Konishi, H., Matsuzaki, H., Ono, Y., Shirai, Y., Saito, N., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1999). "Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11836-41.
- Tang, S. C. and Sambanis, A. (2003). "Development of genetically engineered human intestinal cells for regulated insulin secretion using rAAV-mediated gene transfer." *Biochem Biophys Res Commun* **303**(2): 645-52.
- Tanigawa, K., Xu, G., Nakamura, S., Kawaguchi, M., Kato, Y. and Tamura, K. (1996a). "Impaired compensatory adaption to B-cell mass reduction in young spontaneously hypertensive rats (SHR)." *Pancreas* **12**(3): 237-242.
- Tanigawa, K., Xu, G., Nakamura, S., Tamura, K. and Kawaguchi, M. (1996b). "Pancreatic B-cell replication in an animal model of insulin-resistant non-insulin-dependent diabetes mellitus [letter]." *Pancreas* **13**(3): 326-327.
- Taylor, B. S., de Vera, M. E., Ganster, R. W., Wang, Q., Shapiro, R. A., Morris, S. M., Jr., Billiar, T. R. and Geller, D. A. (1998). "Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene." *J Biol Chem* **273**(24): 15148-56.

- Thams, P., Capito, K., Hedekov, C. J. and Kofod, H. (1990). "Phorbol-ester-induced down-regulation of protein kinase C in mouse pancreatic islets. Potentiation of phase 1 and inhibition of phase 2 of glucose-induced insulin secretion." *Biochem.J.* **265**(3): 777-787.
- Thomas, G. and Hall, M. N. (1997). "TOR signalling and control of cell growth." *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(6): 782-787.
- Thorens, B. (1992). "Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18): 8641-5.
- Toker, A. (2000). "Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling." *Mol Pharmacol* **57**(4): 652-8.
- Tourrel, C., Bailbe, D., Lacorne, M., Meile, M. J., Kergoat, M. and Portha, B. (2002). "Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4." *Diabetes* **51**(5): 1443-52.
- Treisman, R. (1992). "The serum response element." *Trends.Biochem.Sci.* **17**(10): 423-426.
- Tsai, W., Morielli, A. D. and Peralta, E. G. (1997). "The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity." *Embo J* **16**(15): 4597-605.
- Tuttle, R. L., Gill, N. S., Pugh, W., Lee, J. P., Koeberlein, B., Furth, E. E., Polonsky, K. S., Naji, A. and Birnbaum, M. J. (2001). "Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha." *Nat Med* **7**(10): 1133-7.
- Unger, R. H. (1995). "Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications." *Diabetes* **44**(8): 863-870.
- Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., Frisach, M. F., Salvayre, R. and Negre-Salvayre, A. (1999). "Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids." *Circ.Res.* **85**(10): 892-899.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. and AJ, v. d. E. (1993). "Heterodimer formation of

- cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein." *EMBO J.* **12**(2): 479-487.
- Van De Winkel, M. and Pipeleers, D. (1983). "Autofluorescence-activated cell sorting of pancreatic islet cells: purification of insulin-containing B-cells according to glucose-induced changes in cellular redox state." *Biochem Biophys Res Commun* **114**(2): 835-42.
- Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S. J., Panayotou, G. and Waterfield, M. D. (1997). "Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers." *Trends.Biochem.Sci.* **22**(7): 267-272.
- Velloso, L. A., Carneiro, E. M., Crepaldi, S. C., Boschero, A. C. and Saad, M. J. (1995). "Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets." *FEBS Lett.* **377**(3): 353-357.
- Waeber, G., Thompson, N., Nicod, P. and Bonny, C. (1996). "Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor." *Mol Endocrinol* **10**(11): 1327-34.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. and Baldwin, A. S., Jr. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." *Science* **281**(5383): 1680-3.
- Wang, D. and Sul, H. S. (1998). "Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt." *J.Biol.Chem.* **273**(39): 25420-25426.
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P. J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J. R. and Klip, A. (1999). "Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4008-18.
- Wang, R. N., Kloppel, G. and Bouwens, L. (1995). "Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats." *Diabetologia* **38**(12): 1405-1411.

- Wang, Y. X., Lee, C. H., Tiep, S., Yu, R. T., Ham, J., Kang, H. and Evans, R. M. (2003). "Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity." *Cell* **113**(2): 159-70.
- Wang, Z., Wang, R. M., Owji, A. A., Smith, D. M., Ghatei, M. A. and Bloom, S. R. (1995). "Glucagon-like peptide-1 is a physiological incretin in rat." *J Clin Invest* **95**(1): 417-21.
- Watada, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Hamaguchi, K., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Matsuzawa, Y., Kawamori, R. and Yamasaki, Y. (1996). "PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin." *Diabetes* **45**(12): 1826-1831.
- Weir, G. C., Laybutt, D. R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S. and Sharma, A. (2001). "Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes." *Diabetes* **50 Suppl 1**: S154-9.
- Weng, L., Brown, J. and Eng, C. (2001). "PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways." *Hum Mol Genet* **10**(3): 237-42.
- Widmann, C., Burki, E., Dolci, W. and Thorens, B. (1994). "Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of beta cell lines." *Mol Pharmacol* **45**(5): 1029-35.
- Wildhage, I., Trusheim, H., Goke, B. and Lankat-Buttgereit, B. (1999). "Gene expression of the human glucagon-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3." *Endocrinology* **140**(2): 624-31.
- Withers, D. J., Burks, D. J., Towery, H. H., Altamuro, S. L., Flint, C. L. and White, M. F. (1999). "Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling." *Nat. Genet.* **23**(1): 32-40.
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S. and White, M. F. (1998). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." *Nature* **391**(6670): 900-4.

- Wolff, R. A., Dobrowsky, R. T., Bielawska, A., Obeid, L. M. and Hannun, Y. A. (1994). "Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction." *J. Biol. Chem.* **269**(30): 19605-19609.
- Wrede, C. E., Dickson, L. M., Lingohr, M. K., Briaud, I. and Rhodes, C. J. (2002). "Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1)." *J Biol Chem* **277**(51): 49676-84.
- Xiao, J., Gregersen, S., Pedersen, S. B. and Hermansen, K. (2002). "Differential impact of acute and chronic lipotoxicity on gene expression in INS-1 cells." *Metabolism* **51**(2): 155-62.
- Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F. and Bonner-Weir, S. (1999). "Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats." *Diabetes* **48**(12): 2270-6.
- Xu, G. G. and Rothenberg, P. L. (1998). "Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation." *Diabetes* **47**(8): 1243-1252.
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M. and Bell, G. I. (1996a). "Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1)." *Nature* **384**(6608): 458-60.
- Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X., Cox, N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S., Bell, G. I. and et al. (1996b). "Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3)." *Nature* **384**(6608): 455-8.
- Yamamoto, K., Miyagawa, J., Waguri, M., Sasada, R., Igarashi, K., Li, M., Nammo, T., Moriwaki, M., Imagawa, A., Yamagata, K., Nakajima, H., Namba, M., Tochino, Y., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y. (2000). "Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose

- intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion." *Diabetes* **49**(12): 2021-7.
- Yaney, G. C., Civelek, V. N., Richard, A. M., Dillon, J. S., Deeney, J. T., Hamilton, J. A., Korchak, H. M., Tornheim, K., Corkey, B. E. and Boyd, A. E., 3rd (2001). "Glucagon-like peptide 1 stimulates lipolysis in clonal pancreatic beta-cells (HIT)." *Diabetes* **50**(1): 56-62.
- Yaney, G. C., Korchak, H. M. and Corkey, B. E. (2000). "Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells." *Endocrinology* **141**(6): 1989-98.
- Yee, H. S. and Fong, N. T. (1996). "A review of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus." *Pharmacotherapy* **16**(5): 792-805.
- Yenush, L., Zanella, C., Uchida, T., Bernal, D. and White, M. F. (1998). "The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin." *Mol. Cell Biol.* **18**(11): 6784-6794.
- Yki-Jarvinen, H. (1992). "Glucose toxicity." *Endocr.Rev.* **13**(3): 415-431.
- Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F. and Nawata, H. (2001). "Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha or pancreatic/duodenal homeobox." *Metabolism* **50**(5): 613-8.
- Zhang, H. J., Walseth, T. F. and Robertson, R. P. (1989). "Insulin secretion and cAMP metabolism in HIT cells. Reciprocal and serial passage-dependent relationships." *Diabetes* **38**(1): 44-8.
- Zhou, J., Pineyro, M. A., Wang, X., Doyle, M. E. and Egan, J. M. (2002). "Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors." *J Cell Physiol* **192**(3): 304-14.
- Zhou, J., Wang, X., Pineyro, M. A. and Egan, J. M. (1999). "Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells." *Diabetes* **48**(12): 2358-66.

- Zhou, Y. P. and Grill, V. E. (1994). "Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle." *J.Clin.Invest.* **93**(2): 870-876.
- Zhou, Y. P., Ling, Z. C. and Grill, V. E. (1996). "Inhibitory effects of fatty acids on glucose-regulated B-cell function: association with increased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxidation on glucose metabolism." *Metabolism* **45**(8): 981-986.
- Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Le Good, J. A., Whelan, R. D., Kelly, J. J., Frech, M., Hemmings, B. A. and Parker, P. J. (1999). "Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex." *Curr Biol* **9**(10): 522-9.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. and Shaw, J. (2001). "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* **414**(6865): 782-7.
- Zimmet, P. Z. (1995). "The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography." *Diabetes Care* **18**(7): 1050-1064.

CYBER-BIBLIOGRAPHIE

Association du Diabète du Québec. <http://www.diabete.qc.ca>, site internet consulté le 6 mai 2003.

Université de Lyon. L'appareil digestif. <http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/AppareilDigestif/digdiapo70rd.html>, site internet consulté le 6 mai 2003.