

Université de Montréal

**Étude des voies de signalisation en aval du récepteur FFA1/GPR40  
dans la cellule bêta pancréatique**

par  
Valérie Bergeron

Département de Sciences biomédicales  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)  
en Sciences Biomédicales

Avril 2017

© Valérie Bergeron, 2017



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :  
Étude des voies de signalisation en aval du récepteur FFA1/GPR40 dans la  
cellule bêta pancréatique

Présentée par :  
Valérie Bergeron

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Maria Leiza Vitale, présidente-rapporteuse

.....  
Dr Vincent Poitout, directeur de recherche

.....  
Dr Ashok K. Srivastava, membre du jury

.....  
Dr Jun-Li Liu, examinateur externe

.....  
Dre Johanne Tremblay, représentante de la doyenne

.....



# Résumé

Le diabète de type 2 est caractérisé par une incapacité de la cellule bêta pancréatique à produire suffisamment d'insuline pour maintenir la glycémie à des concentrations physiologiques. Le récepteur couplé aux protéines G GPR40 est une cible thérapeutique potentielle pour le diabète de type 2 puisque son activation par les acides gras de moyenne à longue chaîne potentialise la sécrétion d'insuline. Les molécules effectrices en aval de ce récepteur qui sont responsables de la potentialisation de la sécrétion d'insuline demeurent cependant inconnues. Le but de cette thèse était donc d'identifier les molécules effectrices de la voie de signalisation du récepteur GPR40 et étudier comment ces molécules influencent la sécrétion d'insuline.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le transport et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, dont le remodelage des filaments d'actine qui facilite le recrutement des granules d'insuline à la membrane. Nous avons observé que la protéine kinase D1 (PKD1) joue un rôle important pour le remodelage des filaments d'actine qui résulte de l'activation du récepteur GPR40 par les acides gras. Nous avons aussi démontré que PKD1 est essentielle pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras. Nos résultats ont aussi permis de mettre en évidence le rôle important du diacylglycérol comme second messager en aval du récepteur GPR40.

Nous avons ensuite étudié le rôle que joue la kinase 4 activée par p21 (PAK4) dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras puisqu'elle est une cible de PKD1 connue dans d'autres modèles cellulaires. Nous avons observé que PAK4 est phosphorylée en réponse aux acides gras dans les îlots de Langerhans humains et que sa phosphorylation en réponse aux acides gras dépend de la présence du récepteur GPR40. Tout comme PKD1, l'absence de PAK4 réduit significativement la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.

Comme le récepteur GPR40 est essentiel à l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline durant une diète riche en lipides, nous avons étudié le rôle que joue PKD1 dans les îlots de Langerhans de souris qui sont nourries une diète riche en lipides. L'absence de PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques accélère le développement de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie associées à une diète riche en lipides. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose durant un clamp hyperglycémique à la suite d'une diète riche en lipides est aussi significativement réduite chez les souris déficientes pour PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques comparativement aux souris contrôles. Ainsi, nous avons conclu que PKD1 est impliquée dans l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline induite par une diète riche en lipides chez la souris.

Dans son ensemble, les résultats présentés dans cette thèse exposent de nombreuses composantes essentielles à la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras. Cette thèse explore aussi l'impact de la dysfonction de la cellule bêta pancréatique sur l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline durant une diète riche en lipides. Enfin, cette thèse discute du potentiel de GPR40 comme cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2.

**Mots clés :** Diabète, îlots de Langerhans, cellule  $\beta$ -pancréatique, sécrétion d'insuline, récepteur GPR40, protéine kinase D1, kinase 4 activée par p21, remodelage des filaments d'actine

## Abstract

Type 2 diabetes is characterized by the pancreatic beta cells' incapacity to secrete sufficient insulin to maintain normal physiological glycaemia. The G-protein coupled-receptor GPR40 (GPR40) is a potential pharmaceutical target to treat type 2 diabetes since its activation by medium to long chain fatty acids potentiates glucose-induced insulin secretion. However, the effector molecules downstream GPR40's signalling pathway that are responsible for the potentiation of insulin secretion remain unknown. The aim of this thesis is therefore to identify these effector molecules and determine how they influence insulin secretion.

Many mechanisms are involved in the transport and the exocytosis of insulin granules in response to glucose. An important step during insulin secretion is actin filament remodeling which facilitates the recruitment of insulin granules at the membrane. A decrease in expression of a single molecule involved in actin remodeling is sufficient to significantly reduce insulin secretion in response to glucose. We observed that the protein kinase D1 (PKD1) plays an essential role for the actin remodeling resulting from GPR40's activation by fatty acids. We also demonstrated that PKD1 is essential for the potentiation of insulin secretion by fatty acids without affecting insulin secretion induced by glucose alone. Our results have also shown that diacylglycerol acts as an important second messenger downstream of GPR40, and the GPR40-mediated potentiation mainly results from increasing the second phase of insulin secretion.

We also investigated the role of p21-activated kinase 4 (PAK4) in the potentiation of insulin secretion by fatty acids since PAK4 is known to be a PKD1 substrate in other cell models. We observed that PAK4 is phosphorylated in response to fatty acids in human Langerhans islets and that its phosphorylation in response to fatty acids depends on GPR40's presence in mice islets. Similarly to PKD1, a reduction in PAK4 protein

significantly alters the potentiation of insulin secretion by fatty acids without affecting insulin secretion in response to glucose itself.

As GPR40's activation is essential for the compensatory increase in insulin secretion during high-fat feeding in mice, we investigated the role of PKD1 in Langerhans islets when mice are fed a high-fat diet. PKD1's absence in pancreatic beta cells accelerated the apparition of high-fat diet induced hyperglycemia and hyperinsulinemia. We also noticed following a high-fat diet that the insulin secretion in response to glucose during a hyperglycemic clamp is significantly reduced in mice deficient for PKD1 in pancreatic beta cells compared to control mice. We therefore concluded PKD1 is implicated in the compensatory increase in insulin secretion during high-fat feeding in mice.

The results presented in this thesis therefore elucidate essential components involved in the potentiation of insulin secretion by fatty acids. This thesis also explores the impact of pancreatic beta cell dysfunction on the compensatory increase in insulin secretion during a high-fat diet and also discusses the potential of GPR40 as a drug target for type 2 diabetes following the unsuccessful clinical trials of GPR40 agonists.

**Keywords:** Diabetes, Langerhans islets, pancreatic beta cells, insulin secretion, GPR40, protein kinase D1, p21-activated kinase 4, actin filament remodeling



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Index des Figures.....	viii
Abréviations .....	x
Remerciements .....	xiii
Introduction .....	1
Le contrôle de la glycémie .....	4
Le pancréas .....	4
La sécrétion d'insuline induite par le glucose.....	7
L'action de l'insuline sur les tissus périphériques .....	16
Le diabète de type 2 .....	20
Caractérisation du diabète .....	20
Développement du diabète de type 2 .....	21
Thérapeutique du diabète de type 2 .....	25
Le récepteur GPR40 .....	31
L'activation du récepteur GPR40 .....	31
Le rôle de GPR40 dans l'homéostasie du glucose .....	33
Le rôle de GPR40 durant une diète riche en lipides .....	36
Les voies de signalisation du récepteur GPR40 .....	39
Les cibles potentielles du récepteur GPR40 .....	42
La Protéine Kinase D1 .....	44
Le rôle de PKD1 dans l'homéostasie du glucose.....	48
Les Kinases Activées par P21 .....	56

Le rôle des PAKs dans les cellules pancréatiques .....	58
PAK4 et le remodelage des filaments d'actine.....	59
PAK4 une cible de PKD1 .....	62
Mise en contexte de la thèse .....	63
Problématique.....	63
But de la thèse.....	63
Hypothèses de la thèse .....	63
Objectifs de la thèse .....	65
Publications .....	65
Résultats .....	66
Article 1 .....	67
Mise en contexte de l'article 1.....	69
G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1 .....	70
Discussion de l'article 1 .....	103
Conclusions .....	107
Article 2.....	109
Mise en contexte de l'article 2.....	110
The P21-activated kinase PAK4 is implicated in fatty-acid potentiation of insulin secretion downstream of free fatty acid receptor 1 .....	111
Discussion de l'article 2 .....	132
Conclusions .....	136
Article 3 .....	137
Mise en contexte de l'article 3.....	138

Deletion of protein kinase D1 in pancreatic beta cells impairs insulin secretion in high-fat fed mice .....	139
Discussion de l'article 3 .....	168
Conclusions .....	175
Discussion et Perspectives .....	176
GPR40 : toujours une cible thérapeutique? .....	178
Les agonistes pour GPR40 en étude clinique.....	178
Les agonistes pour GPR40 en études précliniques .....	180
Les agonistes pour GPR40 non conventionnels .....	184
La lipophilie élevée des agonistes pour GPR40 .....	186
Poursuivre les recherches sur GPR40.....	188
GPR40 est actif lorsque la cellule est « au repos » .....	188
PKD1 est essentielle à la fonction normale de la cellule.....	189
La voie de GPR40 : parallèle aux voies dysfonctionnelles .....	189
Réflexions sur les approches thérapeutiques actuelles .....	191
L'implication des résultats de cette thèse pour les recherches futures .	194
GPR40 et PAK4 : leur absence accélère-t-elle la dysfonction? .....	194
PAK4 : un rôle dans la prolifération induite par les lipides? .....	195
Activer PAK4 : les risques d'un cancer? .....	196
Conclusion .....	197
Bibliographie .....	200

# Index des Figures

Figure 1 : Le pancréas a deux fonctions : endocrine et exocrine .....	5
Figure 2 : Le métabolisme du glucose.....	8
Figure 3 : La dépolarisation de la membrane induite par l'augmentation d'ATP .....	9
Figure 4 : La synthèse de l'insuline .....	10
Figure 5 : Le transport et la maturation de l'insuline.....	11
Figure 6 : Les voies activées par les acides gras influençant la sécrétion d'insuline .....	16
Figure 7 : L'action de l'insuline sur les tissus périphériques.....	17
Figure 8 : La résistance à l'insuline dans les tissus périphériques .....	23
Figure 9 : La cellule bêta pancréatique durant le développement du diabète de type 2 .....	24
Figure 10 : Comparaison des thérapies actuelles pour le diabète de type 2 .....	29
Figure 11 : Les acides gras activant GPR40 dans la majorité des études .	33
Figure 12 : Les voies activées en aval de GPR40.....	40
Figure 13 : La Protéine Kinase D1 .....	45
Figure 14 : PKD1 est importante pour la fission des granules du Golgi ....	46
Figure 15 : PKD1 et PAK4 influencent le remodelage de l'actine.....	48
Figure 16 : PKD1 est impliquée dans le transport du glucose dans les cardiomyocytes .....	49
Figure 17 : PKD1 est impliquée dans la voie du récepteur muscarinique ..	51
Figure 18 : L'activation de PKD1 par DAG augmente la sécrétion d'insuline .....	53
Figure 19 : L'activité de PKD1 au Golgi corrèle avec la sécrétion d'insuline .....	55
Figure 20 : La Kinase 4 Activée par P21 (PAK4) .....	58
Figure 21 : PAK4 peut favoriser la dépolymérisation des filaments d'actine .....	60

Figure 22 : Modèle de l'hypothèse pour les travaux futurs .....	136
Figure 23 : Sécrétion d'insuline suivant un clamp hyperglycémique .....	193

## Abréviations

ADA	association américaine du diabète
ADF	complexe dépolymérisant des filaments d'actine
ADN	acide désoxyribonucléique
AID	domaine autoinhibiteur
AKT	protéine kinase B
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	kinase d'AMP
ARF	facteurs de ribosylation d'ADP
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
$\beta$ PKD1KO	déficient pour PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques
CD36	translocase cluster de différenciation 36
CDC42	protéine 42 de contrôle de la division cellulaire homologue
CPT1	palmitoyltransférase carnitine 1
CRE <sup>ERT</sup>	recombinase CRE couplée au récepteur d'estrogène
CRIB	cdc42-Rac Interaction/Binding
CYP	cytochromes P450
DAG	diacylglycérol
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
EGTA	éthylène glycol-bis( $\beta$ -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'- tetraacetic acid
ERK	kinase régulée par les signaux extracellulaires
ERT	récepteur d'estrogène
FFAR1	récepteur aux acides gras libres 1
GEF	facteur d'échange de nucléotide guanine
GIP	polypeptide insulinothropique dépendant au glucose
GlcNAc	transférase $\beta$ -N-acétylglucosamine
GLP-1	peptide 1 dérivé du glucagon
GLUT	transporteur de glucose

GP	glycogène phosphorylase
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
GPR40	récepteur couplé aux protéines G GPR40
GPR40KO	déficient pour le récepteur GPR40
GTP	guanosine-5'-triphosphate
HbA1c	hémoglobine glycosylée
IGF-1	facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline
IR	récepteur à l'insuline
IRS	substrats du récepteur à l'insuline
LDL	lipoprotéines à faible densité
MAG	monoacylglycérol
MAPK	protéine kinase activée par la mitogène
MCF	facteurs de couplage métaboliques
MIP-Cre <sup>ERT</sup>	exprimant CRE <sup>ERT</sup> en aval d'un promoteur de l'insuline
ob/ob	souris dont l'obésité est causée par une mutation du gène de la leptine
LIMK1	kinase 1 possédant un domaine LIM
PAK	kinases activées par P21
PBD	domaine de liaison aux protéines p21
PC	convertase de prohormones
PDK1	kinase dépendante des phosphoinositides 1
PDX-1	<i>pancreatic duodenum homeobox-1</i>
PFK1	phosphofructokinase-1
PH	homologie pleckstrine
PI3K	kinase de phosphoinositides 3
PI4KIII $\beta$	kinase III $\beta$ de phosphatidylinositol-4
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKD1	protéine kinase D1
PLC	phospholipase C

PPAR	récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
Rac	substrat de la toxine botulinum C3 similaire à Ras
Raf-1	protéine sérine/thréonine kinase Raf-1 proto-oncogène
ROS	espèces d'oxygène réactives
RRP	<i>ready releasable pool</i>
SNARE	soluble N-ethylmaleimide–sensitive factor attachment protein receptor
Src	protéine tyrosine kinase Src proto-oncogène
SSH1L	phosphatase <i>slingshot 1 like</i>
STZ	streptozotoxine
t-SNARE	composantes du récepteur SNAP de la membrane cible
VAMP2	protéine membranaire 2 associée aux vésicules
v-SNARE	composante vésiculaire du récepteur SNAP
WT	sauvage
ZDF	rats Zucker dont l'obésité est causée par une mutation du récepteur de la leptine



# Remerciements

J'ai l'énorme privilège d'être entourée de personnes exceptionnelles qui ne réalisent pas l'influence qu'elles ont exercée sur ma vie durant ces années d'études doctorales. Les remerciements qui suivent ne rendent nullement justice à toutes les personnes qui ont joué un rôle important durant ce long parcours, mais les voici néanmoins:

À mes parents : je ne serais pas où je suis aujourd'hui si ce n'était de votre soutien inébranlable. Merci pour votre amour inconditionnel, et merci d'avoir cru en moi, souvent beaucoup plus que je ne croyais en moi-même.

À Éric, Mélanie et Lisa : merci pour votre patience et pour votre capacité à me ramener à la raison lorsque j'en avais besoin.

À Émilie et Bruno : Merci pour votre écoute et vos nombreux conseils.

À mes coéquipiers et mes entraîneurs CARABINS : merci pour les plus beaux moments de ma vie universitaire.

Aux membres du laboratoire Poitout, anciens et actuels, merci pour votre aide et votre soutien durant toutes ces années. Un merci tout spécial à Mourad, Bader, Melkam et Thierry pour tous vos conseils et à Mélanie et Grace pour votre dévouement continu envers le projet BcPKD.

À la grande famille du CRDM et à tous les étudiants du 8<sup>e</sup> étage du CRCHUM, merci pour votre soutien et tous vos encouragements.

Enfin, cette thèse n'aurait jamais eu lieu sans mon directeur de thèse Vincent Poitout. Vincent, notre rencontre remonte à ma deuxième année de baccalauréat, il y a 8 ans. Malgré les nombreuses hypothèses qui se sont avérées infructueuses, jamais tu ne m'as laissée douter de ma capacité à pouvoir proposer la bonne. C'est grâce à cette confiance si je termine mes études doctorales aujourd'hui et je serai toujours reconnaissante pour toutes les opportunités que tu m'as offertes au cours des années.

À toutes et à tous, je vous remercie énormément!

Valérie

# Introduction

Avec une espérance de vie estimée à 84 ans pour les hommes et 87 ans pour les femmes en 2063, il n'est pas surprenant qu'à pareille date Statistiques Canada estime que 24 à 28% de la population aura 65 ans et plus (1). Accompagnant le vieillissement de la population, le mode de vie sédentaire de la population occidentale et l'accès facile aux aliments riches en calories provoquent des conditions propices au développement de maladies cardiométaboliques. Le traitement de ces maladies occupe ainsi une place importante dans le système de soins canadien. Le diabète de type 2 est l'une de ces maladies cardiométaboliques dont l'impact à long terme sur le système de santé est majeur.

Selon les estimations de la Fédération Internationale du Diabète, 9,5% de la population canadienne souffre actuellement du diabète (2). Présentement, le coût associé aux traitements des personnes souffrant du diabète est estimé à 7000 \$ par personne par année. À l'échelle mondiale, plus de 12% du budget des systèmes de santé sert à couvrir les frais associés aux traitements pour les patients diabétiques (2). Malgré les nombreux médicaments offerts sur le marché, le maintien de la glycémie des patients diabétiques à des valeurs physiologiques dites normales demeure un défi. Les effets secondaires associés aux traitements à long terme demeurent fréquents et très coûteux. Ainsi, les recherches pour trouver une cible thérapeutique qui permettrait un meilleur contrôle de la glycémie avec un minimum d'effets secondaires se poursuivent. Cette thèse a pour but de caractériser plus en profondeur une cible pharmacologique potentielle pour le diabète de type 2, soit le récepteur aux acides gras libres 1 (FFAR1) aussi connu sous le nom de récepteur couplé aux protéines G GPR40 (GPR40).

Avant d'explorer les mécanismes empruntés par le récepteur GPR40 pour potentialiser la sécrétion d'insuline, il faut avant tout comprendre le système complexe contrôlant la glycémie, de la synthèse de l'insuline jusqu'à son action sur les tissus. Les changements ayant lieu à l'intérieur de ce système durant le développement du diabète de type 2 expliquent le choix des médicaments actuellement sur le marché. En raison des conséquences

à long terme des thérapies actuellement proposées, l'attrait du récepteur GPR40 comme cible thérapeutique devient évident avec les résultats obtenus avec certains modèles animaux. Cette thèse vise donc à mieux définir les voies de signalisation et les mécanismes empruntés par le récepteur GPR40 qui lui permettent de potentialiser la sécrétion d'insuline. Ainsi, le rôle de deux protéines dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras et dans la voie de signalisation du récepteur GPR40 sera défini dans cette thèse. L'impact de ces observations sur les recherches futures et les embuches rencontrées durant les recherches cliniques avec certains agonistes du récepteur GPR40 seront aussi discutés.

## **Le contrôle de la glycémie**

La valeur glycémique normale chez un individu en santé varie entre 4,4 et 6,1 mmol/L et la glycémie à jeun se trouve idéalement entre 3,9 et 5,5 mmol/L. Il est important que la glycémie demeure à l'intérieur de cet intervalle dit physiologiquement normal puisque de graves conséquences peuvent être induites par des épisodes hypoglycémiques ou hyperglycémiques. D'une part, une hypoglycémie sévère peut s'accompagner d'une perte de connaissance ou de convulsions. D'autre part, l'hyperglycémie peut entraîner à long terme l'absorption anormale de glucose par les cellules endothéliales et les plus petits vaisseaux subissent ainsi des modifications physiques qui affectent leur capacité à bien transporter le sang. Une hyperglycémie chronique provoque aussi le stress oxydatif cellulaire qui affecte la fonction des cellules et la glycation de protéines comme l'hémoglobine circulante. Ainsi, plusieurs effets secondaires sont observés lorsqu'une hyperglycémie est chronique; la cécité, la surdité, une défaillance des reins et une mauvaise circulation sanguine qui peut parfois mener à l'amputation des orteils ou des pieds (révisé dans le guide des recommandations cliniques de Diabète Canada (3)). Le corps humain possède donc plusieurs mécanismes qui visent à garder la glycémie à l'intérieur de l'intervalle considéré normal physiologiquement. Les principaux organes impliqués dans le contrôle de la glycémie sont le pancréas, le foie, le tissu adipeux, les muscles, le système digestif et le cerveau.

### **Le pancréas**

Le pancréas est une glande triangulaire dont la tête repose derrière l'estomac et la queue repose le long du duodénum (*Figure 1*). Cet organe complexe possède deux fonctions : une fonction exocrine et une fonction endocrine. Les cellules pancréatiques responsables de la fonction exocrine du pancréas représentent plus de 99% des cellules de l'organe et sont organisées sous forme d'acini. Présentant des réticulums endoplasmiques très développés, ces cellules sécrètent un suc pancréatique constitué d'une

vingtaine de proenzymes et de bicarbonate de sodium dans un minuscule canal qui rejoint en aval le canal pancréatique. Ce dernier fusionne avec le canal cholédoque avant de déverser le suc pancréatique dans l'intestin. Le bicarbonate de sodium dans le suc pancréatique garde les enzymes protéolytiques inactives jusqu'à leur arrivée à l'intestin et neutralise le bol alimentaire qui est acide à la suite de son passage dans l'estomac. Les proenzymes produites par le pancréas exocrine, pour leur part, deviennent des peptidases, des ribonucléases, des désoxyribonucléases, des amylases et des lipases à leur arrivée dans l'intestin (4).

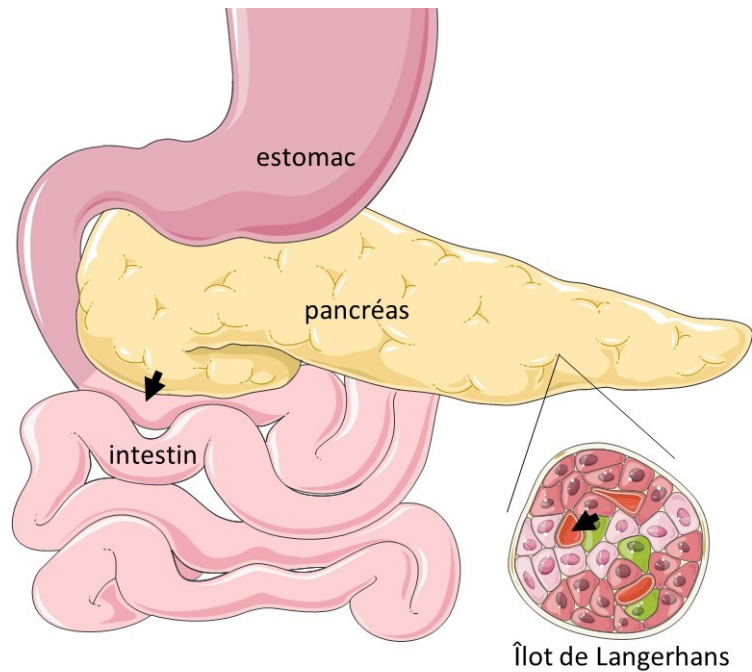


Figure 1 : Le pancréas a deux fonctions : endocrine et exocrine (4-8)

La fonction endocrine du pancréas est le résultat de cellules représentant à peine 1% de toutes les cellules pancréatiques. Ces cellules sont regroupées en forme de sphères appelées îlots de Langerhans qui sont dispersés parmi les nombreux acini de la fonction exocrine du pancréas. Une simple modification de la structure de l'îlot de Langerhans ou de la sécrétion des cellules qui le composent provoque d'importantes irrégularités dans le

contrôle glycémique (5, 6). Ces cellules possèdent même une organisation de leurs organelles dite polarisée afin de favoriser la sécrétion de leurs hormones vers les capillaires à l'intérieur de l'îlot de Langerhans (7). Les cellules formant les îlots de Langerhans sont les cellules alpha ( $\alpha$ ), bêta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), F et epsilon ( $\epsilon$ ) et elles sécrètent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine, le polypeptide pancréatique et la ghréline.

Chez les humains, les cellules bêta représentent entre 48 et 59% des cellules formant les îlots de Langerhans (8). Le rôle principal de la cellule bêta consiste à sécréter l'insuline en réponse à une augmentation de la glycémie. En effet, seule hormone hypoglycémisante, l'insuline agit sur son récepteur sur les tissus périphériques afin de diminuer la glycémie.

Les cellules alpha représentent entre 33 et 46% des cellules formant les îlots de Langerhans humains (8) et sécrètent le glucagon. Contrairement à la sécrétion d'insuline, la sécrétion du glucagon est inhibée par une augmentation de la glycémie (9, 10). L'insuline elle-même inhibe la sécrétion de glucagon (10). Néanmoins, l'endopeptidase PC2 (convertase de prohormones 2) impliquée dans la maturation de l'insuline est impliquée dans la maturation du glucagon à partir du proglucagon (11). Le rôle principal du glucagon consiste à augmenter la production du glucose dans le foie (révisé dans (12)).

Les cellules delta pour leur part représentent entre 8 et 12% des cellules formant les îlots de Langerhans humains (8). Ces cellules sécrètent la somatostatine en réponse à une augmentation de la glycémie de même qu'en réponse à l'insuline (10). La somatostatine inhibe à son tour la sécrétion d'insuline et la sécrétion du glucagon en interagissant avec son récepteur sur les cellules alpha et bêta pancréatiques (13).

Beaucoup moins nombreuses, les cellules epsilon représentent moins de 1% des cellules de l'îlot de Langerhans et sécrètent la ghréline lorsque la glycémie est faible ((14), révisé dans (15)). La ghréline influence indirectement l'homéostasie du glucose en augmentant l'appétit et en inhibant la sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie (révisé dans (15)).

Les cellules F, aussi connues comme les cellules PP, représentent entre 1 et 10% des cellules de l'îlot de Langerhans chez l'humain (révisé dans (16) et (17)). Ces cellules sécrètent le polypeptide pancréatique en réponse au glucose, plus particulièrement à la suite d'une prise alimentaire (18, 19). Bien qu'à des concentrations physiologiques le polypeptide pancréatique inhibe la sécrétion du glucagon (18), son rôle principal dans l'homéostasie du glucose est plutôt d'inhiber la prise alimentaire et son injection à long terme diminue l'appétit (20).

## **La sécrétion d'insuline induite par le glucose**

### **Le métabolisme du glucose**

En condition physiologique normale, la voie traditionnelle de l'induction de la sécrétion d'insuline par le glucose commence par son entrée dans la cellule bêta pancréatique par le transporteur de glucose GLUT2 (21) (*Figure 2*). À la suite de son entrée dans la cellule, le glucose est rapidement phosphorylé par la glucokinase, qui contrôle ainsi le rythme d'activité de la voie de la glycolyse, et ensuite par la phosphofructokinase-1 (PFK1) et la pyruvate kinase (révisé dans (22)). Le pyruvate généré est transporté à l'intérieur de la mitochondrie où son métabolisme est nécessaire afin d'obtenir une sécrétion normale d'insuline en réponse au glucose (23). Le pyruvate est ainsi transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase et ensuite en citrate afin d'effectuer le cycle de Krebs (révisé dans (24)). Le pyruvate est aussi métabolisé par la pyruvate carboxylase en intermédiaires et en cofacteurs qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement du cycle de Krebs (révisé dans (25)). Les intermédiaires et cofacteurs produits durant cette série de réactions servent aussi de facteurs de couplage métabolique (MCF) de régulation qui jouent un rôle dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (révisé dans (25)).



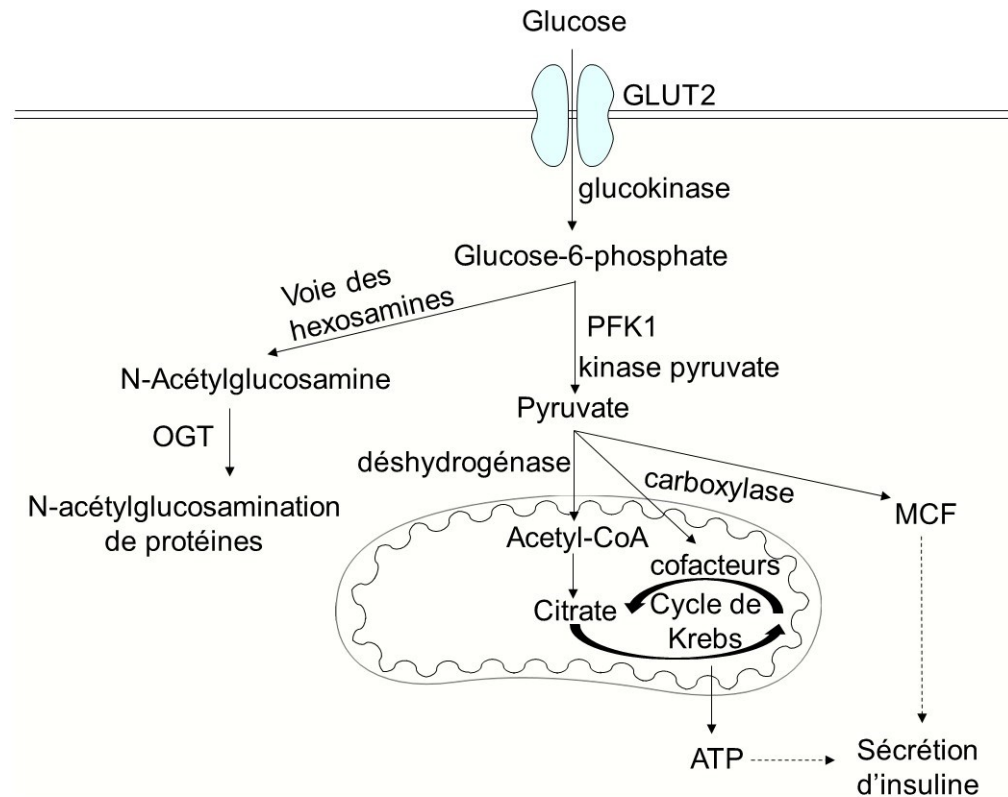


Figure 2 : Le métabolisme du glucose (21-25)

À la fin du cycle de Krebs, l'importante synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) augmente la concentration d'ATP cytosolique. Cette présence accrue d'ATP cause la fermeture de canaux potassiques membranaires sensibles à l'ATP (26) (*Figure 3*). La fermeture de ces canaux cause une dépolarisation de la cellule puisque les ions de potassium chargés positivement sortent normalement de la cellule afin de rejoindre un milieu extracellulaire moins concentré (26, 27). La dépolarisation de la membrane provoque l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage qui entraîne à son tour l'entrée de calcium chargé positivement dans la cellule (28).

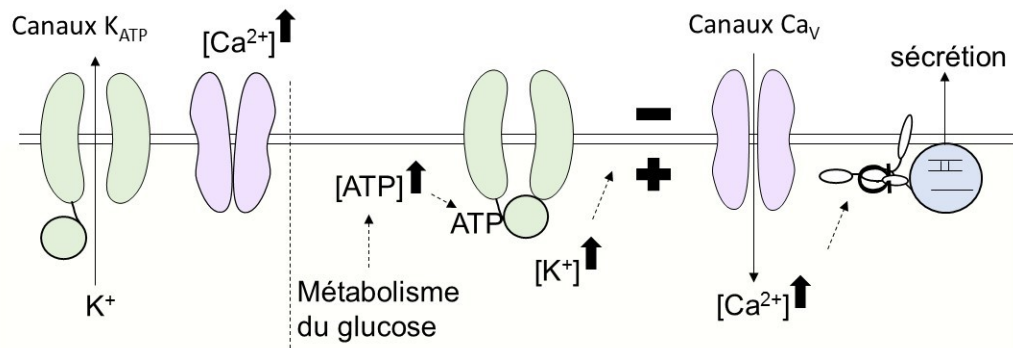


Figure 3 : La dépolarisation de la membrane induite par l'augmentation d'ATP (26-29)

Le calcium entrant dans la cellule interagit alors avec les composantes de la machinerie d'exocytose permettant la fusion des granules d'insuline avec la membrane cellulaire (29). Cependant, les granules d'insuline subissent plusieurs étapes de maturation avant d'être prêts pour l'exocytose. En effet, bien avant d'induire sa sécrétion, le glucose joue un rôle important dans la biosynthèse de même que la maturation de l'insuline.

### La biosynthèse de l'insuline

Plusieurs facteurs de transcription jouent un rôle dans l'expression du gène de l'insuline. En effet, en amont de la séquence codante du gène de l'insuline se trouvent les éléments A, C, E, Z et CAre (*Cyclic AMP response element*) qui permettent la liaison aux facteurs de transcription (Figure 4). Les facteurs de transcription principaux sont PDX-1 (de l'anglais *pancreatic duodenum homeobox-1*) qui peut se lier aux éléments A et Z, MafA qui interagit avec les éléments C et Z, Beta2/NeuroD1 qui se lie à l'élément E et les membres de la famille CAre Binding protein (CREB)/ATF qui se lient à l'élément CAre (révisé dans (30)). L'expression du gène de l'insuline en réponse aux nutriments circulants semble surtout contrôlée par les facteurs de transcription PDX-1 et MafA (31). En réponse à une concentration élevée de glucose, PDX-1 est localisé dans le noyau (32) et subit des modifications post-traductionnelles qui favorisent son interaction avec l'acide

désoxyribonucléique (ADN) en amont du gène de l'insuline (33-35). En réponse au glucose, MafA pour sa part est plus exprimé (36), plus présent dans le noyau (36) et son interaction avec l'élément C est favorisée (37). De plus, dans un milieu riche en glucose la stabilité de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de l'insuline est augmentée (38) et son interaction avec les deux protéines impliquées dans sa traduction est favorisée (39).

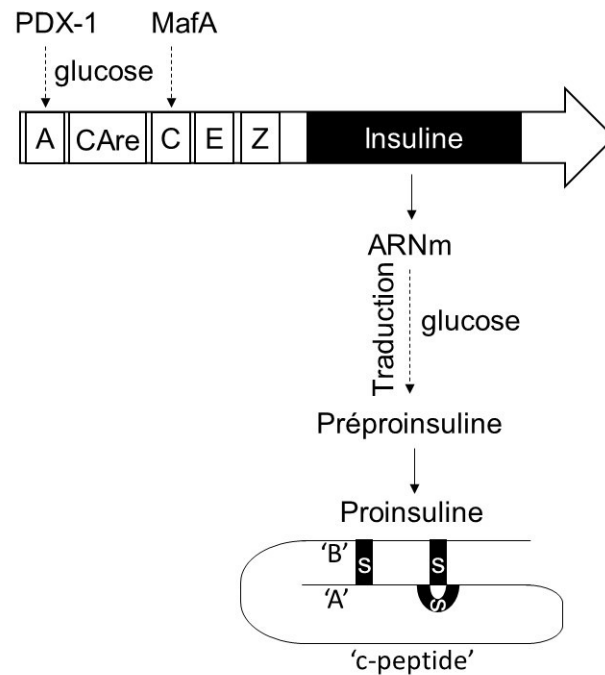


Figure 4 : La synthèse de l'insuline (30-42)

La chaîne polypeptidique résultant de la traduction de l'ARNm de l'insuline est un précurseur de 11500 daltons appelé préproinsuline et il contient les structures correspondant aux chaînes A, B et C de la proinsuline (40). La première modification post-traductionnelle consiste en l'élimination des fragments protéiques à l'extrémité N-terminale de la préproinsuline (41). La proinsuline résultant de cette modification fait approximativement 2500 daltons de moins que la préproinsuline (40). En premier lieu, des ponts disulfides sont formés entre les futures chaînes A et B (42). Cette proinsuline est placée sous forme d'hexamères entourant deux ions de zinc et un ion de

calcium dans l'appareil de Golgi et est ainsi chargée dans des granules riches en zinc et en calcium (revue par (43)).

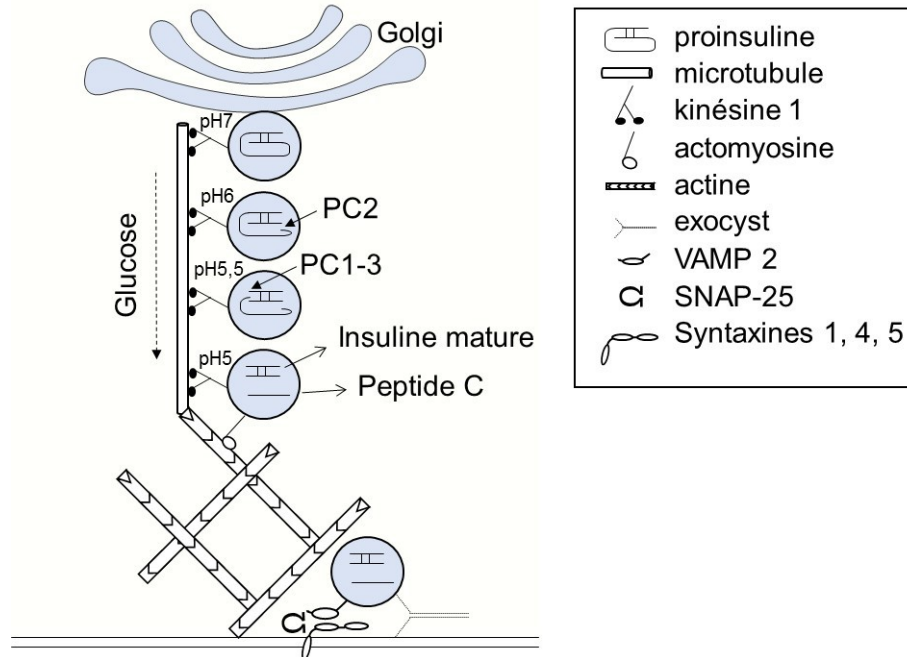


Figure 5 : Le transport et la maturation de l'insuline (29, 43-74)

Ces granules d'insuline diminuent leur pH au moyen d'un influx de  $\text{Cl}^-$  par des canaux chloriques qui favorisent l'entrée de  $\text{H}^+$  par la pompe  $\text{ATPase-H}^+$  de type V (44). Cette acidification peut être potentialisée par des concentrations élevées de glucose (45) et est nécessaire pour activer les endopeptidases impliquées dans la maturation de l'insuline (46-49). La première enzyme PC2 clive la chaîne A de la chaîne C de la proinsuline lorsque le pH vésiculaire atteint 6,0 (46) et les enzymes PC1 ou PC3 séparent ensuite la chaîne B de la chaîne C lorsque le pH atteint environ 5,5 (50) (Figure 5). L'insuline dite mature est ainsi formée des chaînes A et B et est maintenue sous forme d'hexamères très solides (43, 50, 51). La chaîne C de la proinsuline, alors appelée peptide C, est sécrétée en parallèle de l'insuline par la cellule bêta pancréatique et agit sur plusieurs tissus une fois dans la circulation (52).

## **Le transport et la sécrétion des granules d'insuline**

Durant sa maturation, le granule d'insuline se déplace le long de microtubules afin d'atteindre la membrane cytoplasmique (53, 54). La grande majorité des granules d'insuline se déplace grâce à l'activité de la kinésine de type conventionnel I sur des microtubules dont l'extrémité positive pointe vers la membrane cytoplasmique (55) (*Figure 5*). La kinésine I subit des changements conformationnels importants lorsqu'elle interagit avec l'ATP qui permet à ses deux structures 'pieds' interagissant de façon décalée avec le microtubule de se repositionner et effectuer un déplacement le long du microtubule ressemblant à un pas (56). Bien que leurs déplacements soient plutôt aléatoires, les granules d'insuline effectuent des déplacements d'une plus grande distance en réponse au glucose (53). La présence de kinésine I est nécessaire afin d'obtenir un recrutement des granules à la membrane et une sécrétion d'insuline normale (57). Une fois à la périphérie de la cellule, les granules d'insuline sont transférés de leur microtubule à un filament d'actine et se déplacent sur ce dernier grâce aux myosines (58, 59). Un réseau dense d'actine polymérisée en filaments peut ralentir l'accès des granules à la membrane. Ainsi, le recrutement des granules est potentialisé par une dépolymérisation partielle des filaments d'actine en actine globulaire (58). Plusieurs protéines augmentent la dépolymérisation des filaments d'actine en réponse au glucose et favorisent la sécrétion d'insuline (60-62). Une dépolymérisation partielle permet aussi une restructuration des filaments d'actine courts grâce à la dynamine 2 qui favorise leur élongation et optimise ainsi le recrutement des granules à la membrane (63). En effet, les filaments d'actine facilitent l'association des granules aux protéines à la membrane cytoplasmique qui permettent leur exocytose (64).

Les granules d'insuline quittent le cytosquelette et sont transférées à la membrane cytoplasmique grâce à l'action de plusieurs composantes du complexe exocyst (65). La structure de l'exocyst en forme 'Y' permet un rapprochement (*tethering*) entre la membrane vésiculaire et la membrane cytoplasmique qui est nécessaire avant d'ancrer le granule à la membrane

(65). L'ancrage du granule d'insuline en prévision de l'exocytose emploie plusieurs protéines du récepteur SNAP (SNARE : traduit de *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*) (29). Le granule d'insuline est attaché à la membrane grâce à l'interaction d'une composante vésiculaire du récepteur SNAP (v-SNARE) avec les composantes du récepteur SNAP de la membrane cible (t-SNARE) (29). Les SNAREs les plus souvent présents dans la cellule bêta pancréatique, soit VAMP2, SNAP-25 et les syntaxines 1, 4 et 5, jouent un rôle essentiel dans la sécrétion d'insuline (66-71). En réponse au glucose, l'interaction de la protéine membranaire 2 associée aux vésicules (VAMP2) avec les t-SNAREs est favorisée grâce à la protéine 42 de contrôle de la division cellulaire homologue (cdc42) (72) et l'interaction de VAMP2 avec la syntaxine 4 est favorisée par Munc18-1 (73, 74). Les SNAREs subissent surtout des changements de conformation en réponse à une augmentation locale de calcium (29) qui leur permet de fusionner les membranes vésiculaires et cytoplasmiques. L'insuline mature est alors relâchée dans la circulation sanguine.

### **Les facteurs influençant la sécrétion d'insuline**

La sécrétion d'insuline induite par le glucose est influencée par plusieurs facteurs. L'activité des cellules bêta pancréatiques est soumise à un contrôle circadien qui peut favoriser le transport de glucose à l'intérieur de la cellule bêta, de même que permettre une sécrétion d'insuline plus élevée durant les périodes de lumière (75, 76). Bien que le système nerveux sympathique inhibe la sécrétion d'insuline par l'activité de l'adrénaline sur son récepteur à la surface de la cellule bêta pancréatique (77), le système nerveux parasympathique quant à lui stimule la sécrétion d'insuline par le biais des récepteurs muscariniques à la surface de la cellule bêta pancréatique, dont l'agoniste endogène est l'acétylcholine (78).

Plusieurs facteurs influençant la sécrétion d'insuline proviennent de la circulation sanguine, dont certains peptides produits par le système digestif et certaines hormones produites par le tissu adipeux. Les cellules de

l'estomac produisent la ghréline en période de jeûne (79). À la suite d'une prise alimentaire, les cellules intestinales L et K produisent le peptide 1 dérivé du glucagon (GLP-1) et le polypeptide insulino-tropique dépendant au glucose, aussi connu comme le polypeptide inhibiteur gastrique (GIP) (80). Le GLP-1 et le GIP potentialisent la sécrétion d'insuline en interagissant avec leur récepteur respectif à la surface de la cellule bêta pancréatique (81-83). L'activation de ces récepteurs couplés aux protéines Gs entraîne une augmentation de l'adénosine monophosphate (AMP) cyclique produite par l'adénylate cyclase qui favorise l'activité de la machinerie d'exocytose de même que l'entrée de calcium dans la cellule par les canaux sensibles au voltage (84, 85). Les adipocytes pour leur part produisent l'adiponectine qui interagit avec les récepteurs 1 et 2 de l'adiponectine à la surface de la cellule bêta pancréatique. Cette interaction potentialise la sécrétion d'insuline en augmentant la capacitance de la membrane cytoplasmique qui favorise à son tour la fusion des granules d'insuline à la membrane (86, 87).

Les nutriments circulants peuvent également potentialiser la sécrétion d'insuline. L'injection d'acides aminés seuls dans la circulation sanguine augmente la sécrétion d'insuline (88), tout comme la présence d'acides gras libres dans la circulation (89) (*Figure 6*). Bien que théoriquement les acides gras puissent entrer dans la cellule bêta pancréatique par un mouvement passif '*flip-flop*' avec leur chaîne hydrophobe (90), certains chercheurs proposent que leur entrée dépende de la translocase CD36 (cluster de différenciation 36) (91). Les acides gras transitent ensuite dans la mitochondrie par la palmitoyltransférase carnitine 1 (CPT1) et sont métabolisés en ATP dans la voie de bêta-oxydation (revue par (92)). En présence d'une concentration élevée de glucose cependant, le citrate métabolisé à partir du glucose peut être transformé en malonyl-CoA qui inhibe la CPT1 (93). Les acides gras sont alors redirigés vers la voie d'estérification qui permet la production de MCFs de régulation, tel que le monoacylglycérol (MAG), qui peuvent potentialiser la sécrétion d'insuline (révisé dans (25, 94, 95)).

Bien que le métabolisme des acides gras à lui seul potentialise la sécrétion d'insuline, l'interaction des acides gras avec leurs récepteurs à la surface de la cellule bêta pancréatique influence elle aussi la sécrétion d'insuline (*Figure 6*). L'interaction des acides gras avec le récepteur GPR40 potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose en favorisant la formation de seconds messagers comme le diacylglycérol (DAG) (96, 97). Cette production de DAG résulte de l'hydrolyse de phospholipides membranaires (98). Selon certaines études, la synthèse de DAG est aussi favorisée en aval du récepteur GPR40 puisque son activation favorise l'estérification des acides gras en glycérolipides (99, 100).

Tout comme le récepteur GPR40, le récepteur GPR120 est activé par les acides gras dont la chaîne de carbones est moyenne ou longue (101). Le récepteur GPR119 est plutôt activé par des lipides dérivés de phospholipides comme la lysophosphatidylcholine (102). L'activation des récepteurs GPR119 et GPR120 par leurs agonistes respectifs in vitro amplifie la sécrétion d'insuline induite par le glucose en augmentant la concentration intracellulaire de calcium et d'AMP cyclique (102, 103). Les acides gras à chaîne courte pour leur part activent les récepteurs GPR41 et GPR43 (104). L'activation du récepteur GPR43 est importante pour l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline induite par une diète riche en lipides (105). L'activation du récepteur GPR41 semble diminuer la sécrétion d'insuline puisque la perte de ce récepteur potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose et améliore la tolérance au glucose chez la souris (106).



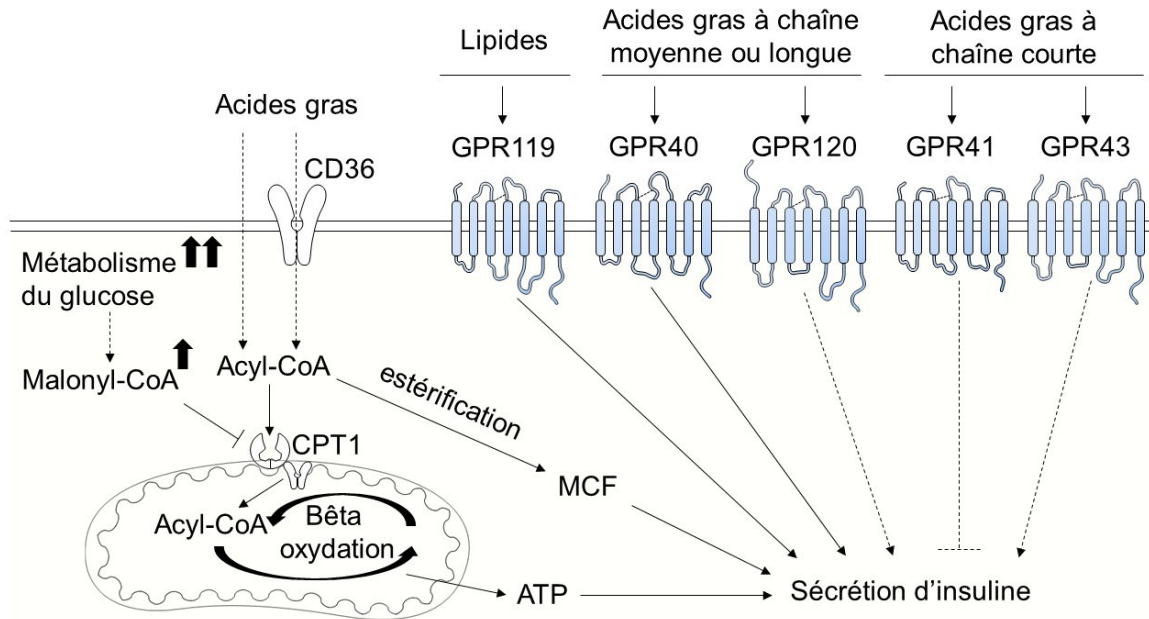


Figure 6 : Les voies activées par les acides gras influençant la sécrétion d'insuline (25, 89-106)

## L'action de l'insuline sur les tissus périphériques

Le récepteur à l'insuline (IR) est un récepteur tyrosine kinase exprimé dans plusieurs tissus. Lorsque l'insuline se lie à son récepteur, ce dernier subit une autophosphorylation qui entraîne le recrutement de plusieurs protéines 'partenaires de signalisation' telles que les substrats du récepteur à l'insuline (IRS) 1 à 6. Ces derniers servent de lien entre le récepteur à l'insuline et les protéines qui activeront à leur tour les voies de signalisation intracellulaires telles que la kinase PI3 (PI3K) et la kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) (107). Les conséquences de l'activation des voies en aval du récepteur de l'insuline varient en fonction de la cellule (Figure 7).

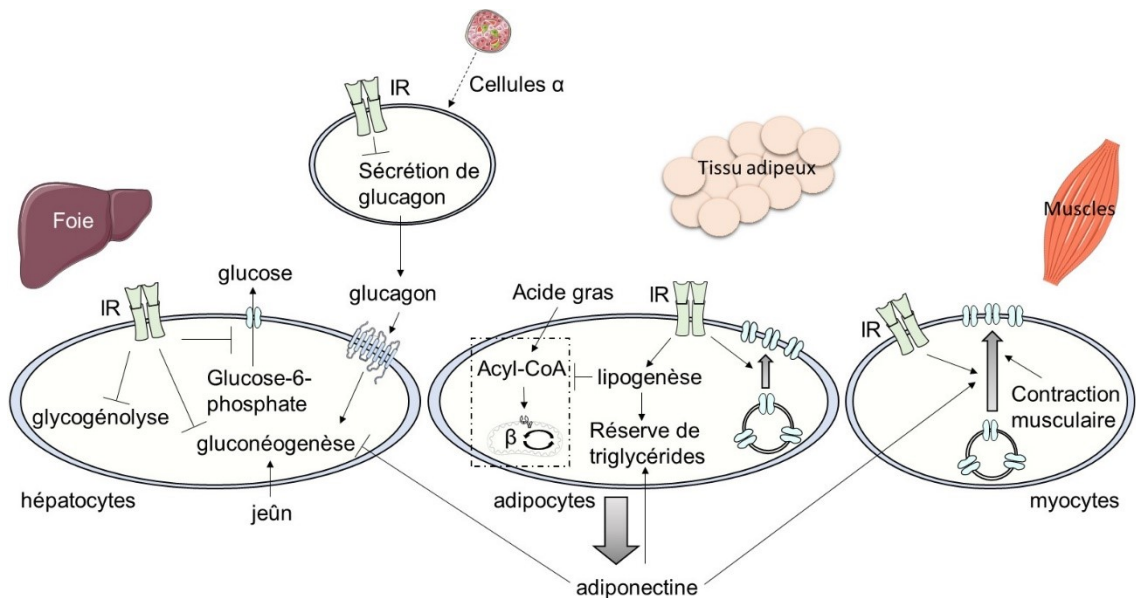


Figure 7 : L'action de l'insuline sur les tissus périphériques (12, 109-124)

Le foie joue un rôle très important dans l'homéostasie du glucose. D'une part, il métabolise l'insuline, retirant de la circulation sanguine jusqu'à 50% de l'insuline produite par les îlots des Langerhans en période de jeûne (108). D'autre part, il peut synthétiser et relâcher le glucose dans la circulation en réponse au glucagon (12). Une augmentation de la concentration cytosolique d'AMP cyclique dans les hépatocytes provoquée par une glycémie faible favorise aussi l'expression des enzymes impliquées dans la gluconéogenèse telle que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (109). L'insuline inhibe cette dernière (110), tout comme elle inhibe l'activité de la glycogène phosphorylase (GP) qui permet la glycogénolyse, soit la synthèse de glucose à partir du glycogène (111). L'insuline diminue aussi l'expression du glucose-6-phosphatase qui permet la sortie du glucose des hépatocytes (112). De plus, l'insuline augmente l'activité des enzymes impliquées dans la glycogénèse (111) et elle stimule la lipogénèse à partir de glucose dans les hépatocytes (113, 114).

Alors que l'entrée du glucose dans le foie se fait principalement par GLUT2 (115), l'entrée du glucose dans les muscles et les tissus adipeux se fait plutôt par le transporteur du glucose 4 (GLUT4). La grande majorité de GLUT4 est conservée dans des compartiments intracellulaires séparés des endosomes traditionnels (116). C'est ainsi que l'activation du récepteur de l'insuline entraîne le recrutement de GLUT4 à la membrane cytoplasmique des adipocytes et des myocytes (117, 118).

L'entrée de glucose par GLUT4 dans les adipocytes nécessite cependant l'activation de la voie de la protéine kinase activée par la mitogène (MAPK) sous le récepteur de l'insuline (119). La translocation de GLUT4 à la membrane des myocytes peut aussi être induite par une contraction et ne requiert alors pas la présence d'insuline (120).

Dans les adipocytes, l'activation du récepteur de l'insuline favorise la production et l'entreposage de triglycérides dans une gouttelette lipidique occupant la majorité du volume de l'adipocyte (121). Les adipocytes peuvent métaboliser les acides gras en acétyl-CoA, et ainsi produire de l'ATP par la voie de bêta-oxydation (décrite précédemment dans la cellule pancréatique). Cependant, ces réactions sont inhibées lorsque les adipocytes effectuent de la lipogenèse de novo en réponse à l'insuline (122).

Les adipocytes sécrètent l'adiponectine et la leptine qui influencent l'homéostasie du glucose en favorisant la synthèse et l'entreposage de triglycérides dans les adipocytes eux-mêmes. En effet, en plus de potentialiser la sécrétion d'insuline (86, 87), l'adiponectine favorise l'entrée et l'entreposage de lipides dans les adipocytes (123). L'adiponectine favorise aussi l'entrée de glucose dans les myocytes et diminue l'expression des enzymes impliquées dans la gluconéogenèse dans les hépatocytes (124). Pour sa part, la leptine, tout comme l'insuline (125, 126), active des voies neuronales de l'hypothalamus qui diminuent la prise alimentaire et augmentent la dépense énergétique (revue par (127)).

Ainsi, plusieurs organes sont impliqués dans l'homéostasie du glucose et leur activité est fortement influencée par l'insuline en circulation. La

sécrétion d'insuline elle-même est influencée par la présence du récepteur à l'insuline sur la cellule bêta pancréatique (128). Il n'est donc pas surprenant qu'une résistance à l'action de l'insuline puisse entraîner à long terme une hyperglycémie chronique chez les humains.

# **Le diabète de type 2**

## **Caractérisation du diabète**

Depuis l'Antiquité, le diabète est diagnostiqué chez les patients présentant une production d'urine excessive et une perte de poids (129). Bien qu'en 1670 Thomas Willis ait noté le goût sucré de l'urine de patients diabétiques, ce n'est qu'en 1776 que ce goût sucré a été attribué à la présence excessive de sucre dans l'urine (129). En 1815, ce sucre a été identifié comme étant le glucose (129). En 1889, Oscar Minkowski et Joseph von Mering ont déterminé qu'un produit sécrété par la portion non-exocrine du pancréas est nécessaire afin d'éviter de développer le diabète (129). En 1893, Gustave–Edouard Laguesse a proposé que le produit provienne plus spécifiquement des îlots de Langerhans et Jean de Mayer a nommé ce produit 'Insuline' en 1909 (129). L'utilisation de cette protéine à des fins thérapeutiques a seulement été explorée en 1921 dans l'équipe du laboratoire de John J.R. MacLeod. En effet, Frederick Banting et Charles Best y ont découvert qu'une solution d'insuline purifiée par James Collip pouvait diminuer les symptômes liés au diabète chez l'humain (129).

Les patients souffrant du diabète ont longtemps été identifiés en fonction de la nécessité d'injecter l'insuline pour leur survie. À l'heure actuelle, les patients souffrant du diabète sont divisés en 4 groupes en fonction de la cause de leur diabète. La cause du premier groupe, appelé type 1, est principalement la perte de cellules bêta pancréatiques à la suite d'une réaction auto-immune. Le deuxième groupe, le type 2, regroupe les patients dont le diabète est causé par une incapacité à produire suffisamment d'insuline pour contrôler la glycémie. Le diabète des patients du troisième groupe est causé par une autre maladie, telle que l'insuffisance rénale chronique, ou par la prise de médicaments. Les patientes du quatrième groupe de diabète souffrent quant à elles d'un diabète dit gestationnel. Bien que cette intolérance au glucose temporaire puisse revenir à la normale à la

suite de l'accouchement, le diabète gestationnel suggère une prédisposition au développement du diabète de type 2 avec l'âge (3).

Plus de 90% des patients atteints du diabète souffrent actuellement du diabète de type 2 et représentent à eux seuls environ 3% de la population mondiale (129). Ces statistiques ne sont pas surprenantes sachant que le mode de vie sédentaire accompagné d'une alimentation riche en calories qu'adopte la majorité de la population occidentale prédispose cette dernière au développement du diabète de type 2.

## **Développement du diabète de type 2**

Plusieurs organes sont impliqués dans le contrôle de la glycémie. L'ordre des événements qui mènent au développement du diabète de type 2 est donc souvent remis en question par la communauté scientifique. Néanmoins, il est indéniable que le diabète de type 2 résulte de la résistance à l'insuline, l'augmentation de la production hépatique de glucose, l'augmentation de la sécrétion d'insuline et l'épuisement des cellules bêta pancréatiques. La théorie du développement du diabète de type 2 présentée dans cette thèse est conforme à celle la plus acceptée actuellement par la communauté scientifique (révisé dans (94)).

### **La résistance à l'action de l'insuline**

Bien que les organes périphériques puissent oxyder et entreposer les sucres et les lipides, il est plus difficile de maintenir l'homéostasie du glucose lorsque la dépense énergétique est moindre que l'apport alimentaire. Le manque chronique d'exercice physique couplé à une alimentation riche en calories crée un environnement propice au métabolisme et à l'entreposage anormal de lipides dans les tissus périphériques. Comme décrit précédemment, une concentration élevée de glucose inhibe l'oxydation des acides gras et favorise leur estérification et leur entreposage dans la cellule. Cependant, en présence chronique d'une glycémie élevée, le foie atteint sa capacité maximale de métabolisme des acides gras. Il en résulte une synthèse constante de céramides et d'intermédiaires lipidiques qui provoque

à long terme un stress sur le réticulum endoplasmique. À long terme, la voie de gluconéogenèse dans le foie devient moins sensible à l'inhibition de l'insuline (130) (*Figure 8*). L'hypersécrétion de glucagon observé chez les patients souffrant du diabète de type 2 favorise aussi la production hépatique de glucose.

Les niveaux plus élevés de glucagon résultent d'une part de la résistance des cellules alpha pancréatiques à l'inhibition par l'insuline, mais aussi possiblement d'une plus grande sensibilité au GIP qui favorise la sécrétion de glucagon (131). Dans les muscles, le manque d'exercice physique accompagné d'une faible activité mitochondriale favorise le métabolisme incomplet des acides gras et l'accumulation d'espèces d'oxygène réactives (ROS). Ceci affecte à son tour la translocation de GLUT4 induite par l'insuline (révisé dans (130)).

Les adipocytes entreposent des triglycérides en condition de surplus calorique. Il en résulte à long terme d'une prise de volume extrême des adipocytes qui entraîne indirectement une résistance à l'action de l'insuline. En effet, cette augmentation de volume empêche l'échange approprié d'oxygène entre la circulation sanguine et les adipocytes et ces derniers souffrent donc d'hypoxie (132). Les adipocytes développent alors un stress du réticulum endoplasmique et produisent moins d'adiponectine (133), dont les effets favorables sur l'homéostasie de glucose ont été décrits précédemment. Ce manque d'oxygène entraîne aussi la production de cytokines pro-inflammatoires. Couplées à la redistribution des acides gras lorsque les tissus adipeux ne peuvent plus entreposer de triglycérides, ces cytokines influencent grandement la sensibilité des autres tissus périphériques à l'action de l'insuline (révisé dans (130)).

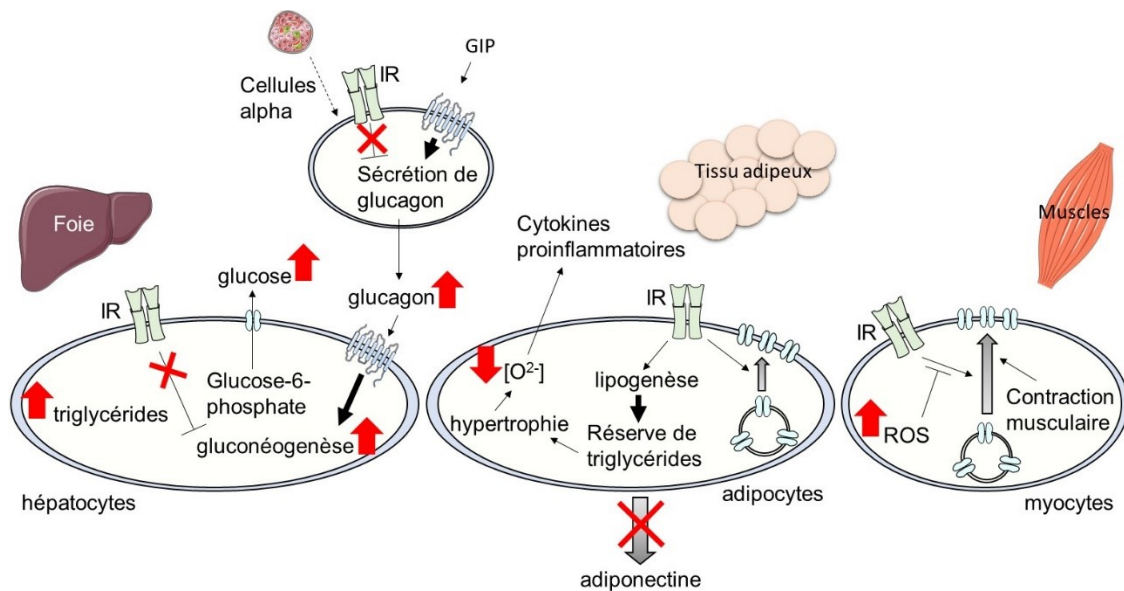


Figure 8 : La résistance à l'insuline dans les tissus périphériques (94, 130-133)

### La compensation de la cellule bêta pancréatique

Afin de compenser pour la diminution de l'efficacité de l'action de l'insuline dans les tissus périphériques, les cellules bêta pancréatiques augmentent la sécrétion d'insuline. Cette compensation résulte de deux mécanismes stimulés par la forte présence de nutriments dans la circulation; l'augmentation de la masse des cellules bêta pancréatiques et une amplification de la sécrétion d'insuline de chaque cellule (révisé dans (94, 134)). En effet, les voies de signalisation favorisant la prolifération des cellules bêta pancréatiques sont activées en réponse à une infusion d'une solution de dextrose avec une émulsion d'huile de soja composé à 80% d'acides gras insaturés et à 20% d'acides gras saturés (135) (*Figure 9*). Durant une exposition de courte durée aux acides gras, les îlots de Langerhans sécrètent aussi plus d'insuline grâce à l'estérification des acides gras et à l'augmentation intracellulaire de calcium qui sont provoquées par leur présence dans le milieu (136, 137).



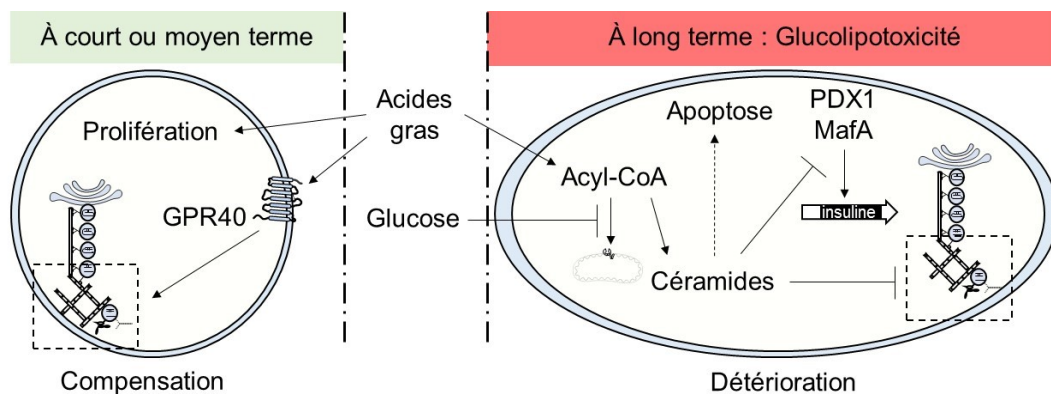


Figure 9 : La cellule bêta pancréatique durant le développement du diabète de type 2 (37, 94, 134-

### La détérioration de la fonction des cellules bêta pancréatiques

Malgré l'importante production d'insuline, lorsque la résistance à l'action de l'insuline perdure, une hyperglycémie et une hyperlipidémie chroniques s'installent. Cet environnement toxique pour la cellule bêta pancréatique est appelé glucolipotoxique (révisé dans (138)). D'une part, ces conditions glucolipotoxiques peuvent diminuer la sécrétion d'insuline de 90% en altérant la machinerie d'exocytose de l'insuline (139) (*Figure 9*). D'autre part, la voie d'estérification en présence chronique de certains acides gras produit des céramides qui diminuent la transcription du gène de l'insuline (140). En effet, l'acide palmitique diminue l'expression du gène de l'insuline induite par le glucose en diminuant l'activité de PDX-1 et l'expression de MafA (37). Les céramides sont aussi responsables de l'apoptose des cellules bêta pancréatiques chez les souris obèses (141). Durant le développement du diabète de type 2, la diminution du nombre de cellules bêta pancréatiques est aussi causée par un défaut de l'oxydation du cholestérol dans ces conditions (142). Les cellules bêta pancréatiques sont ainsi plus susceptibles à l'apoptose en condition d'hyperglycémie chronique lorsqu'elles sont exposées aux lipoprotéines de faible densité (LDL) remplies de cholestérol (142). Malheureusement, ces lipides sont plus présents dans la circulation

durant le développement de la maladie puisque les tissus périphériques résistent à l'absorption des lipides. Il n'est donc pas surprenant qu'au cours des 10 années qui précèdent le diagnostic du diabète de type 2, la masse de cellules bêta pancréatiques diminue d'approximativement 50% (143).

## **Thérapeutique du diabète de type 2**

À l'heure actuelle, un patient est considéré diabétique lorsque sa glycémie atteint ou dépasse les valeurs associées au développement à long terme de rétinopathies. Ces valeurs correspondent à une glycémie à jeun de 7,0 mmol/L, une glycémie de 11,1 mmol/L 2 heures suivant une consommation de 75 g de sucre ou un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) de 6,5% qui représente la glycémie moyenne des trois mois précédents le test (3). Les thérapies proposées au patient à la suite d'un diagnostic positif varient évidemment en fonction des individus. Les thérapies sont choisies en fonction du patient; soit de leur taux d'HbA1c, de leur poids, de leur flexibilité à modifier leurs habitudes alimentaires de même que leur capacité à effectuer de l'exercice physique.

### **L'alimentation et l'exercice**

Les médecins encouragent leurs patients à faire de l'exercice et à adopter de meilleures habitudes alimentaires bien avant le diagnostic et tout au long de la pharmacothérapie pour le diabète de type 2. Une thérapie nutritionnelle peut avoir une grande influence positive sur le contrôle de la glycémie si elle est bien respectée. En général, les directives données aux patients consistent à respecter le guide alimentaire canadien et favoriser des aliments ayant une faible densité calorique et riches en vitamines, en acides gras et en acides aminés essentiels. Il est aussi suggéré de favoriser les aliments avec un indice glycémique faible et un apport plus important de fibres alimentaires (3).

L'exercice physique est aussi un incontournable parmi les premières thérapies proposées aux patients. Idéalement, un patient devrait effectuer par semaine un minimum de 150 minutes d'exercices aérobiques, comme la

marche rapide et la natation, et 2 séances d'exercices de résistance, soit des gestes répétés 15 à 20 fois avec des poids modérés à lourds (3). L'exercice physique affecte très positivement la glycémie des patients puisque la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 dans les muscles, induite par l'exercice, est indépendante de l'activité de l'insuline (118). Force est de constater que les patients ont malheureusement de la difficulté à adhérer à ces modifications de leurs habitudes de vie. Ainsi, si aucune différence n'est observée après deux ou trois mois, la pharmacothérapie antihyperglycémiant est ajoutée à ces suggestions (3) (*Figure 10*).

### **Thérapie visant le foie**

Développés en 1929 à partir de la plante *Galega officinalis* qui était prescrite pour le diabète au moyen âge, les biguanides sont utilisés pour traiter l'hyperglycémie reliée au diabète depuis 1950. Le seul biguanide encore prescrit aujourd'hui est la metformine. Il est le médicament le moins coûteux permettant de diminuer l'hyperglycémie depuis qu'il est accessible en générique (144). La metformine permet de diminuer l'hyperglycémie principalement en empêchant la synthèse d'ATP dans la mitochondrie des hépatocytes. Ceci entraîne une augmentation de l'activité de la kinase d'AMP (AMPK) (145) qui inhibe la gluconéogenèse dans le foie (146). Bien que la metformine puisse diminuer de 1 à 5% l'HbA1c, plusieurs effets secondaires sont observés au niveau de l'intestin. Environ 20 à 30% des patients souffrent de douleurs abdominales, de nausées, de vomissements ou de diarrhées (révisé dans (145)).

### **Thérapie visant le tissu adipeux**

Les thiazolidinédiones sont les seuls médicaments dont l'objectif premier est d'augmenter la sensibilité des tissus adipeux à l'action de l'insuline. Les thiazolidinédiones ont le potentiel de diminuer d'environ 1% l'HbA1c lorsqu'ils sont prescrits seuls. Cette diminution résulte principalement de l'activation du récepteur  $\gamma$  activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) qui favorise la différenciation des cellules en adipocytes. Les nouveaux adipocytes générés sont plus sensibles à l'insuline et peuvent donc

plus facilement synthétiser et entreposer des triglycérides à partir du glucose et des lipides circulants. Bien que les thiazolinédiones soient entrés sur le marché nord-américain en 1997, ils sont moins prescrits depuis 2005 dus aux effets secondaires majeurs observés (révisé dans (147)). En effet, en plus d'une prise de poids importante, les patients développent parfois des œdèmes et de l'insuffisance cardiaque (3).

### **Thérapies visant la cellule bêta pancréatique**

Comme l'insuline joue un rôle important dans le contrôle de la glycémie, plusieurs médicaments ont été développés afin d'augmenter sa sécrétion, comme les sulfonylurées, les méglitinides, les agonistes du récepteur du GLP-1 et les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4).

En 1956, le premier sulfonylurée a été prescrit en Allemagne et il s'agissait d'un sulfonyle hypoglycémiant appelé tolbutamide (148). En 2006, les sulfonylurées étaient utilisés par 25% des patients souffrant du diabète de type 2 puisqu'ils diminuent d'environ 1,5% l'HbA1c en monothérapie (149, 150). Les sulfonylurées parviennent à ce résultat en fermant les canaux potassiques dépendants à l'ATP, ce qui cause une dépolarisation de la membrane et induit la sécrétion d'insuline (151). Cette dépolarisation de la membrane et la sécrétion d'insuline qui s'ensuit sont indépendantes de la glycémie et entraînent donc des risques d'évènements hypoglycémiques. Il est estimé que 20% des patients traités avec un sulfonylurée souffrent de symptômes reliés à l'hypoglycémie (152).

Les méglitinides induisent également la sécrétion d'insuline en bloquant les canaux potassiques dépendants à l'ATP (153). Cependant, grâce à leur courte durée d'action, ils provoquent moins d'épisodes hypoglycémiques tout en diminuant d'environ 1,5% l'HbA1c (3, 153). De plus, ils sont plus efficaces que les sulfonylurées pour réduire la glycémie postprandiale (3). Malheureusement, puisque les méglitinides sont plus coûteux que les sulfonylurées et que leurs effets secondaires sont similaires, leur prescription est moins encouragée que les sulfonylurées (150).

Les agonistes du récepteur du GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-4 pour leur part potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose par la voie de signalisation incrétine du GPL-1 décrite précédemment. Les agonistes du récepteur du GLP-1 actuellement sur le marché sont des dérivés de l'exendine-4. L'exendine-4 a été isolée en 1992 à partir de la salive du lézard venimeux Monstre de Gila (154) et le récepteur responsable de son action insulinothropique a été identifié l'année suivante (155). Depuis, le potentiel thérapeutique de cet agoniste pour le diabète de type 2 a été démontré dans plusieurs modèles animaux (156). Les agonistes commerciaux dérivés de l'exendine-4 sont l'exénatide et le liraglutide et ils provoquent respectivement une diminution d'environ 0,8% et 1,5% de l'HbA1c (157). Bien qu'une administration hebdomadaire de certaines préparations permette de bien contrôler la glycémie, ils provoquent chez la majorité des patients des nausées, des vomissements ou des diarrhées (3, 158). Les autres médicaments qui potentialisent l'activation de la voie incrétine sont les inhibiteurs de la DPP-4, soit la sitagliptine, la saxagliptine, la linagliptine et l'alogliptine. La DPP-4 dégrade normalement la GLP-1 en un peptide dont l'action sur le récepteur du GLP-1 est moins efficace. L'inhibition de la DPP-4 par des agents externes augmente donc la durée de vie du GLP-1 dans la circulation (159). Les inhibiteurs de la DPP-4 diminuent ainsi l'HbA1c d'environ 0,2% à 1,0% selon les études (157) et leur utilisation entraîne des cas rares de pancréatites (3). Cependant, ils sont peu prescrits puisqu'ils sont plus dispendieux que les sulfonylurées et la metformine (150).

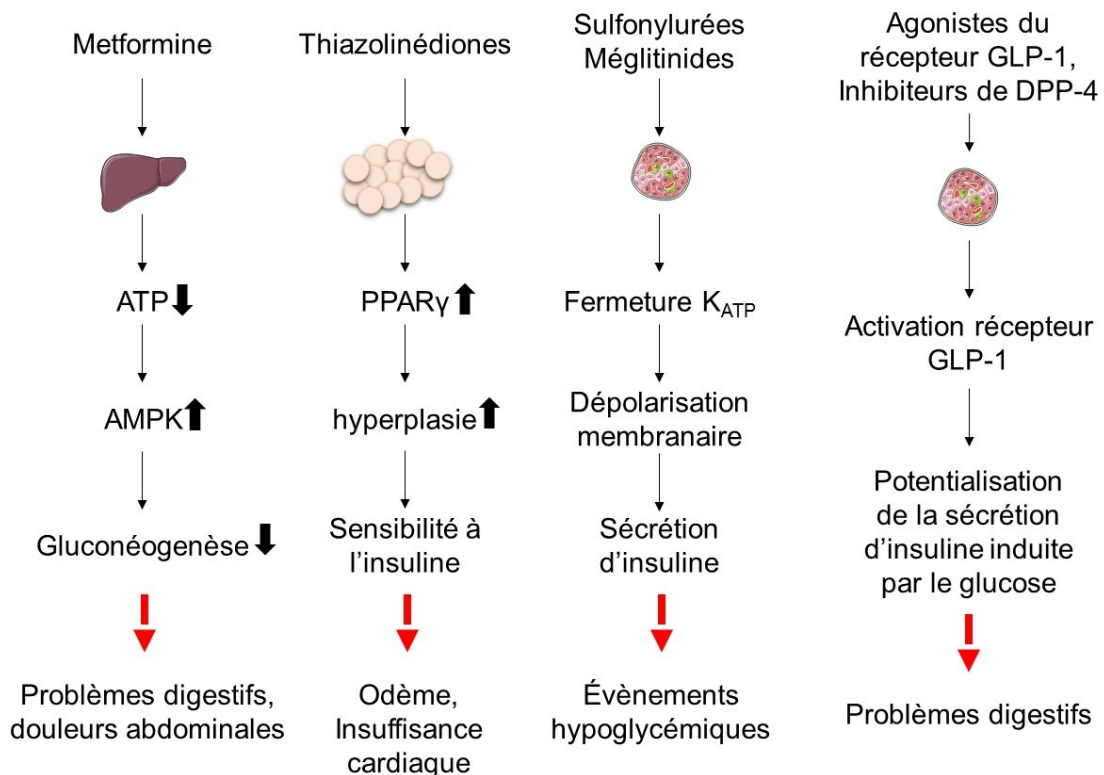


Figure 10 : Comparaison des thérapies actuelles pour le diabète de type 2 (3, 144-159)

### L'injection d'insuline

Bien que la première thérapie du diabète développée par Banting et Best implique l'injection d'insuline isolée du chien, l'insuline utilisée aujourd'hui en thérapie est produite à partir d'ARN recombinant. C'est ainsi que les patients canadiens ont accès à l'insuline humaine et des analogues de l'insuline humaine dont la pharmacocinétique est améliorée. Il existe donc de multiples préparations d'insuline dont l'action est qualifiée de rapide, de courte durée, d'intermédiaire ou de prolongée.

Récemment, il a été démontré qu'une thérapie qui consiste en l'injection intensive d'insuline sur une courte période de temps retarde le développement du diabète de type 2. En effet, cette thérapie a démontré que le retrait rapide des cellules bêta pancréatiques du milieu glucolipotoxique améliore leur fonction et leur contrôle de la glycémie à long terme (160, 161).

Néanmoins, l'injection d'insuline est actuellement prescrite lorsque la glycémie n'est pas contrôlée avec les autres pharmacothérapies offertes sur le marché. D'une part, l'injection de l'insuline est associée à une prise de poids. Elle augmente aussi les risques de symptômes neuroglycopéniques, tels que des maux de tête, des étourdissements, de la somnolence, des pertes de connaissances et des comas (3). D'autre part, les patients préfèrent essayer en premier lieu les modifications des habitudes de vie et prendre des agents oraux vu l'aspect invasif des injections d'insuline (161).

Malgré les nombreux médicaments qui augmentent la sécrétion d'insuline, les recherches se poursuivent afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Les effets secondaires et les coûts élevés des médicaments actuellement sur le marché incitent les compagnies pharmaceutiques à chercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2. Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) représentent des cibles très intéressantes puisque plusieurs influencent de manière favorable la sécrétion d'insuline (162, 163). Un de ces récepteurs GPCR qui potentialisent la sécrétion d'insuline est le récepteur GPR40.

## Le récepteur GPR40

Le récepteur GPR40 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires faisant partie de la classe 1 de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (164). Comme tout récepteur couplé à une protéine G, l'extrémité NH<sub>2</sub> du récepteur GPR40 repose dans le milieu extracellulaire et l'extrémité COOH repose dans le milieu intracellulaire (165). L'expression de GPR40 est influencée par PDX-1 et augmente lorsque ce dernier subit une N-acétylglucosamination par la transférase  $\beta$ -N-acétylglucosamine (*O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase*) en réponse au glucose dans la cellule bêta pancréatique (166) (*Figure 2*). L'activation du récepteur GPR40 sur les cellules L et K intestinales et les cellules alpha pancréatiques est associée à une augmentation de la sécrétion de GLP-1, de GIP et de glucagon (167-171). Néanmoins, le récepteur GPR40 fut initialement étudié en raison de sa forte expression dans le cerveau et dans les cellules bêta pancréatiques (96, 97, 172, 173). C'est en effet dans la cellule bêta pancréatique que trois équipes de recherche ont identifié les ligands de ce récepteur.

### L'activation du récepteur GPR40

En 2003, trois études différentes ont démontré que les ligands principaux du récepteur GPR40 sont les acides gras de moyenne à longue chaîne et qu'ils induisent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (96, 97, 172) (*Figure 11*). Leurs conclusions divergeaient seulement sur la longueur et le niveau de saturation des acides gras afin d'obtenir une activation optimale du récepteur.

Le premier groupe de chercheurs a déterminé que les acides gras saturés, mono-insaturés ou polyinsaturés dont la chaîne de carbone est composée de 10 à 18 carbones peuvent activer le récepteur, excluant ainsi l'acide arachidonique (172). Les chercheurs ont aussi remarqué que les acides gras saturés à chaîne moyenne étaient plus puissants que les acides gras insaturés à longue chaîne pour activer le récepteur GPR40 (172). De



plus, ils ont découvert que l'interaction de l'acide linoléique avec le récepteur GPR40 produit une augmentation de la concentration de calcium dans les cellules insulinosécrétrices MIN6 (172).

Le deuxième groupe a conclu que les acides gras ne pouvaient pas activer le récepteur GPR40 si leur chaîne de carbone était composée de moins de 6 carbones. Le deuxième groupe a aussi conclu que plus la chaîne de carbones des acides saturés est longue, plus l'acide gras est puissant pour activer le récepteur GPR40 (96). Selon cette même étude, l'acide gras le plus puissant pour activer le récepteur GPR40 est néanmoins l'acide eicosatriénoïque, soit un acide gras polyinsaturé de 20 carbones (20:3) (96). Tout comme le premier groupe, ces chercheurs ont confirmé que l'activation du récepteur GPR40 se traduit en une augmentation de la concentration intracellulaire calcique (96).

Le troisième groupe de chercheurs a remarqué que les acides gras saturés de 12 à 16 carbones, les acides gras insaturés de 18 à 20 carbones et certains acides eicosatriénoïques peuvent activer le récepteur GPR40 (97). Ces chercheurs ont aussi confirmé que les acides gras de moins de 6 carbones ne peuvent pas activer le récepteur GPR40 (97). D'autre part, contrairement au premier groupe de chercheurs, ils ont observé que l'acide arachidonique peut activer le récepteur GPR40 (97). En plus de confirmer que l'activation du récepteur GPR40 induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, ces chercheurs ont remarqué que l'activation du récepteur GPR40 se traduit en une activation de la voie impliquant la MAPK et une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (97). De plus, à l'aide du chélateur EGTA (acide éthylène glycol-bis( $\beta$ -aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-tétraacétique), les chercheurs ont pu conclure que le calcium est nécessaire à la potentialisation de la sécrétion d'insuline provoquée par l'interaction des acides gras avec le récepteur GPR40 (97).

Finalement, les trois groupes de recherches ont déterminé que le récepteur GPR40 est probablement couplé préférentiellement à la protéine

Gq puisqu'un traitement à la toxine pertussique qui inhibe la protéine Gi n'affecte pas l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire induite par l'activation du récepteur GPR40 (96, 97, 172). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire en réponse à l'acide oléique est plutôt diminuée par des inhibiteurs de la phospholipase C (PLC) qui est activée en aval de la protéine Gq (174).

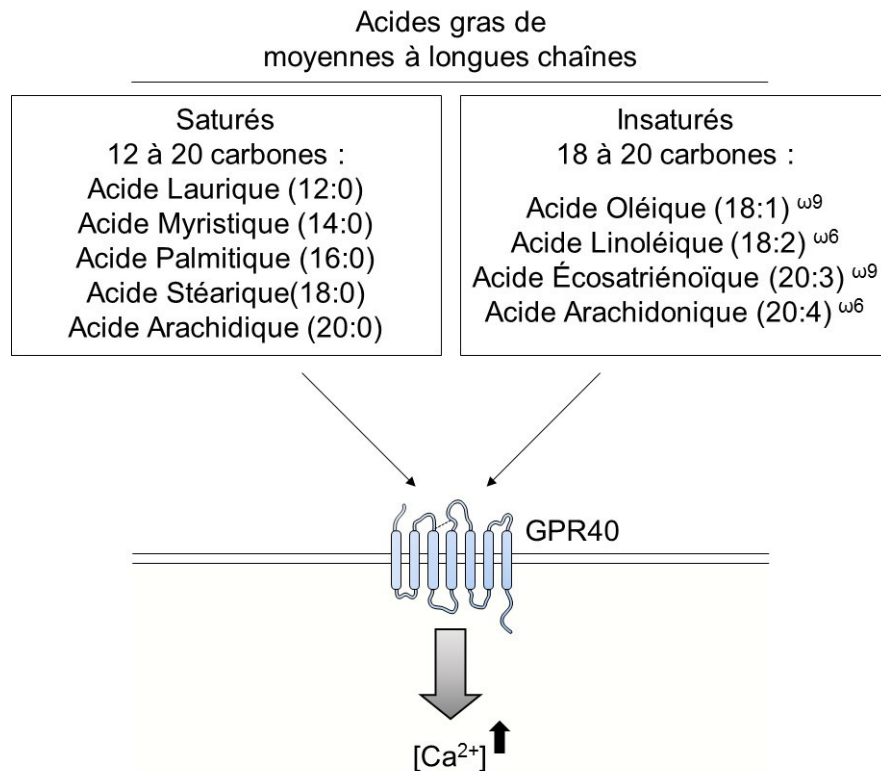


Figure 11 : Les acides gras activant GPR40 dans la majorité des études (96, 97, 172)

## Le rôle de GPR40 dans l'homéostasie du glucose

Le récepteur GPR40 joue un rôle très important dans l'homéostasie du glucose. Chez l'humain, une mutation du gène du récepteur GPR40 diminue significativement la sécrétion d'insuline provoquée par une consommation orale de 72 g de glucose ou de 772 kilocalories dont 82% proviennent de

matières grasses (175). Cette diminution de la sécrétion d'insuline entraîne une intolérance au glucose chez ces humains (175). Cette mutation du récepteur GPR40 n'affecte pas sa localisation à la membrane, mais plutôt la capacité d'un acide gras à induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire en aval de ce récepteur muté (175). L'activation du récepteur GPR40 par les acides gras semble donc très importante pour la sécrétion d'insuline chez l'humain. Il est intéressant de noter que la moyenne de l'indice de masse corporelle des 11 individus possédant cette mutation du récepteur GPR40 dans l'étude était significativement plus élevée que les 723 individus qui ne possédaient pas cette mutation (175).

Les souris déficientes pour le récepteur GPR40 (GPR40KO) démontrent quant à elles très peu de différences comparativement aux souris sauvages. En effet, les souris GPR40KO ne démontrent aucune différence en terme de prise de poids ou de masse adipeuse (89, 98). Les souris sauvages et les souris GPR40KO possèdent à jeun et ad libitum des concentrations plasmatiques similaires d'insuline, de glucose, d'acides gras et de peptides C (89, 98). Les souris sauvages et les souris GPR40KO possèdent aussi une masse comparable de cellules bêta pancréatiques. La taille et le nombre d'îlots de Langerhans dans ces souris sont donc probablement semblables (98).

L'absence du récepteur GPR40 chez la souris provoque quelques changements dans l'homéostasie du glucose. D'une part, bien que les femelles GPR40KO ne démontrent aucune intolérance au glucose, les mâles démontrent une faible intolérance au glucose, mais seulement à partir de l'âge de 13 semaines (89). L'absence du récepteur GPR40 ne provoque pas cependant de résistance à l'insuline puisque la glycémie des souris GPR40KO est comparable aux souris sauvages à la suite d'une injection d'insuline (89). L'étude de la sensibilité à l'insuline mesurée à la suite de l'injection simultanée de glucose et d'insuline confirme cette absence de résistance à l'insuline chez les souris GPR40KO. En effet, durant un clamp euglycémique-hyperinsulinémique une quantité de glucose similaire est

nécessaire afin de maintenir la glycémie des souris GPR40KO à des valeurs normales (98). Ainsi, la faible intolérance au glucose observée chez les souris GPR40KO résulte probablement d'une sécrétion d'insuline différente.

Ex vivo, les îlots de Langerhans de souris GPR40KO sécrètent en réponse au glucose la même quantité d'insuline que les îlots de souris sauvages (89, 176). À l'inverse, lorsque l'acide palmitique est ajouté au milieu d'incubation statique, les îlots de souris GPR40KO sécrètent jusqu'à trois fois moins d'insuline que les îlots de souris sauvages (89, 176). En accord avec cette observation, l'insulinémie des souris GPR40KO est diminuée de 50% comparativement aux souris sauvages à la suite d'une infusion d'une solution composée à 20% d'acides gras insaturés provenant d'huile de soja (89). Puisque les souris GPR40KO ont des concentrations plasmatiques d'acides gras comparables aux souris sauvages, il est probable que les acides gras libres en circulation affectent la sécrétion d'insuline induite par l'administration de glucose seul chez les souris GPR40KO (98).

Ainsi, la sécrétion d'insuline in vivo observée chez les souris GPR40KO en réponse au glucose varie en fonction de la technique employée pour étudier celle-ci. Si les souris demeurent sous anesthésie pour la durée complète de la manipulation et les souris sont infusées avec une solution de glucose 30 minutes après l'installation du cathéter dans la veine jugulaire, la sécrétion d'insuline des souris GPR40KO est similaire à celle des souris sauvages (89). Cependant, la sécrétion d'insuline diffère si les souris sont éveillées durant l'administration de glucose quelques jours après que le cathéter ait été placé dans la veine jugulaire. En effet, les souris GPR40KO sécrètent moins d'insuline en réponse au glucose durant un clamp hyperglycémique (98). De plus, chez les souris GPR40KO provenant d'une colonie différente, la sécrétion d'insuline est plus faible à jeun et en réponse à une injection intrapéritonéale de glucose à la suite d'un jeûne de 12 à 16 heures (176). L'activation du récepteur GPR40 est ainsi nécessaire afin d'obtenir une sécrétion d'insuline optimale en réponse au glucose en présence d'acides gras libres en circulation.

L'expression de GPR40 dans les cellules entéroendocrines suggère que l'activation du récepteur GPR40 in vivo est importante pour la sécrétion de GLP-1 et GIP. Les souris GPR40KO ont les mêmes niveaux circulants de GLP-1, de GIP et d'insuline que les souris sauvages à la suite d'un gavage d'une solution de glucose (167). Cependant, la sécrétion de GIP et de GLP-1 est diminuée chez les souris GPR40KO comparativement aux souris sauvages lorsque les souris sont gavées avec une pâte dont 58% des calories proviennent de lipides (167). Cette diminution des niveaux de GLP-1 et de GIP pourrait être partiellement responsable de l'insulinémie moins élevée des souris GPR40KO comparativement aux souris sauvages à la suite de ce même gavage riche en lipides (167). Ainsi, l'activation des récepteurs GPR40 par les acides gras influence la sécrétion d'insuline de même que la sécrétion de facteurs qui potentialisent la sécrétion d'insuline.

## **Le rôle de GPR40 durant une diète riche en lipides**

Le rôle important du récepteur GPR40 pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras est irréfutable. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs équipes de recherches aient étudié le rôle du récepteur GPR40 dans les îlots de Langerhans exposés à des conditions glucolipotoxiques ou durant l'augmentation compensatoire de l'insuline induite par une diète riche en lipides.

À la suite d'une incubation de 72 heures dans un milieu de culture à 16,7 mM glucose, la sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans de souris GPR40KO en réponse au glucose est comparable à celle des îlots de souris sauvages (89). Cependant, cette induction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est fortement diminuée si l'acide palmitique ou l'acide oléique est ajouté au milieu de culture des îlots de souris sauvages pendant 72 heures (89, 177). Puisque la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans ces conditions est aussi diminuée dans les îlots GPR40KO, la diminution de la sécrétion d'insuline causée par une exposition glucolipotoxique ne résulte pas de l'interaction des acides gras avec GPR40

(89, 177). Cette observation suggère que les acides gras n'activent pas les mécanismes impliqués dans la détérioration de la fonction de la cellule bêta pancréatique en interagissant avec le récepteur GPR40. Une équipe de recherche différente a conclu que l'acide palmitique nécessite la présence du récepteur GPR40 pour diminuer significativement la sécrétion d'insuline induite par le glucose (176). Cependant, comme les îlots GPR40KO de cette étude sécrétaient moins d'insuline en réponse au glucose que les îlots de souris sauvages avant l'incubation dans des conditions considérées glucolipotoxiques, il est difficile d'observer l'effet inhibiteur d'une exposition chronique à l'acide palmitique sur la sécrétion d'insuline dans cette étude (176). Ainsi, l'interaction des acides gras avec le récepteur GPR40 ne semble pas être responsable de l'inhibition de la sécrétion d'insuline provoquée par une exposition chronique aux acides gras ex vivo.

Au contraire, l'activation du récepteur GPR40 par les acides gras sur une longue période de temps est responsable de l'augmentation de la sécrétion d'insuline observée durant la compensation des cellules bêta pancréatiques durant une diète riche en lipides. En effet, à la suite d'une diète riche en lipides de 8 semaines, l'insulinémie à jeun et à la suite d'une administration de glucose par injection péritonéale ou intraveineuse est significativement plus élevée chez les souris sauvages que chez les souris GPR40KO (176, 178). Ce défaut de sécrétion d'insuline chez les souris GPR40KO pourrait expliquer leur développement plus rapide de l'hyperglycémie induite par une diète riche en lipides (178). Certaines études n'ont cependant pas remarqué d'insulinémies différentes entre les souris GPR40KO et les souris sauvages nourries une diète riche en lipides (179, 180). Néanmoins, ces études ont confirmé que le récepteur GPR40 n'est pas responsable de la détérioration de la fonction des cellules bêta pancréatiques durant une diète riche en lipides (179, 180).

D'autre part, la surexpression du récepteur GPR40 humain dans les cellules bêta pancréatiques de souris augmente la sécrétion d'insuline en réponse au glucose chez les souris nourries une diète normale et une diète

riche en lipides (181). De plus, cette augmentation de la sécrétion d'insuline entraîne une amélioration de la tolérance au glucose à la suite d'une diète riche en lipides (181). Ainsi, GPR40 semble jouer un rôle dans l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline et non dans la détérioration de la fonction des cellules bêta pancréatiques durant un stress métabolique tel qu'une diète riche en lipides.

Une seule équipe de chercheurs a observé que les souris GPR40KO étaient moins intolérantes au glucose que les souris sauvages après 8 semaines de diète riche en lipides (176). Cette observation était probablement la conséquence d'une plus grande sensibilité du foie de ces souris GPR40KO à l'action de l'insuline, puisque ces foies produisaient moins de glucose par gluconéogenèse et ils entreposaient moins de gouttelettes lipidiques (176). Cependant, les souris GPR40KO de trois études différentes n'ont pas démontré cette protection contre la stéatose du foie et l'intolérance au glucose induites par une diète riche en lipides (178-180). Il est donc raisonnable de conclure que le récepteur GPR40 n'est pas impliqué dans le développement de la résistance à l'insuline de même que l'intolérance au glucose provoquée par une diète riche en lipides.

Néanmoins, l'expression du récepteur GPR40 est diminuée dans les îlots de Langerhans de patients diabétiques de type 2 (182). La majorité des mutations du gène humain codant pour le récepteur GPR40 qui affectent la sécrétion d'insuline in vitro ne corrèlent pas avec le diabète de type 2, mais certaines mutations sont associées à une sécrétion d'insuline réduite en réponse à une administration de glucose (175, 183-185). La perte de fonction du récepteur GPR40 pourrait donc potentiellement jouer un rôle dans le développement du diabète de type 2.

## Les voies de signalisation du récepteur GPR40

Bien qu'in vitro l'activation du récepteur GPR40 augmente l'oxydation et l'estérification des acides gras, l'absence du récepteur GPR40 dans les îlots de Langerhans ne modifie pas l'oxydation de l'acide palmitique, l'estérification de l'acide palmitique en triacylglycérol et en diacylglycérol ou la production d'acides gras non-estérifiés à partir de l'acide palmitique (98-100). Cependant, la transformation de phosphoinositides en inositol phosphates en réponse à une exposition à l'acide oléique est plus importante dans les îlots sauvages que dans les îlots GPR40KO (98). Cette observation suggère qu'en réponse à des acides gras possédant une chaîne de carbone moyenne à longue, l'activation du récepteur GPR40 entraîne l'activation de la phospholipase C, en aval de la protéine Gq, qui génère des inositols triphosphates à partir de phospholipides (98, 174). Les inositols triphosphates peuvent potentialiser la sécrétion d'insuline en interagissant avec des récepteurs à la surface du réticulum endoplasmique qui favorisent la libération de calcium dans le cytosol (98, 186-188). Cette voie de signalisation semble être activée puisqu'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire est observée avec les agonistes pour le récepteur GPR40 (96, 97, 172). De plus, un inhibiteur de la protéine Gq inhibe la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras dans les îlots de Langerhans (89). Cependant, le récepteur GPR40 semble pouvoir emprunter plusieurs voies de signalisation (*Figure 12*).



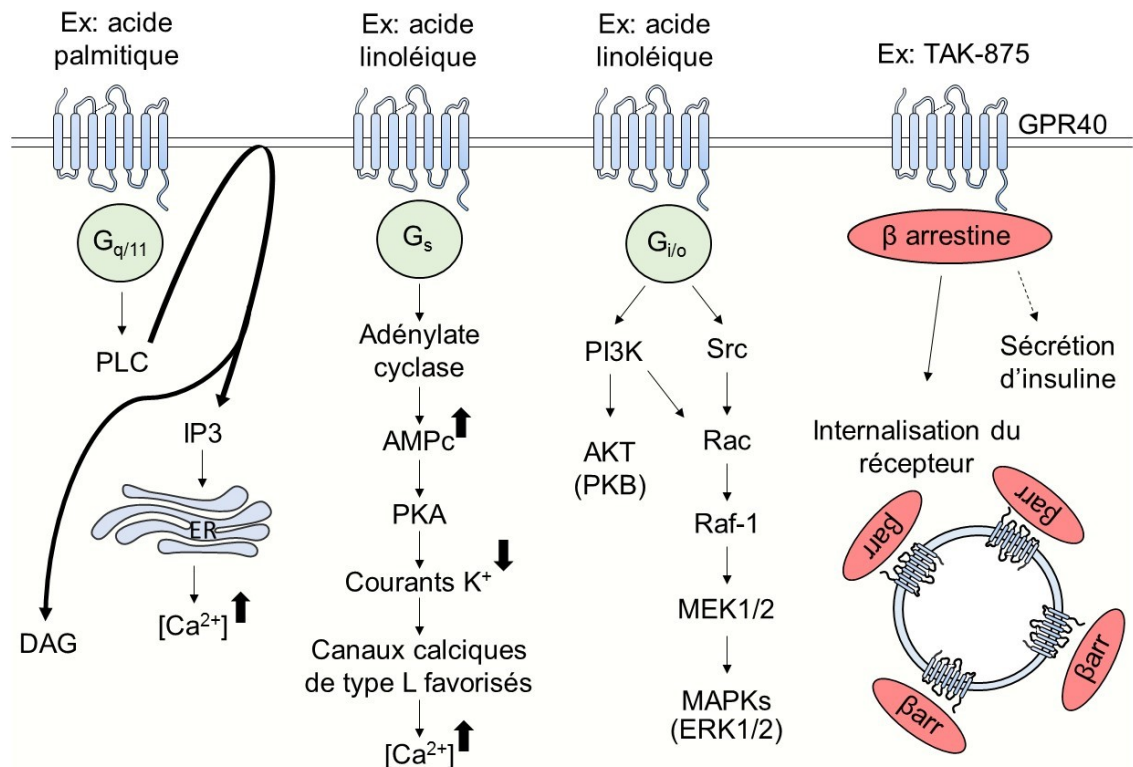


Figure 12 : Les voies activées en aval de GPR40 (89, 96-98, 172,174, 186-194)

Les protéines interagissant avec l'extrémité COOH du récepteur GPR40 varient en fonction des agonistes et ce même si ces derniers se lient à des sites similaires sur le récepteur (189-191). Ainsi, en fonction du ligand, l'extrémité intracellulaire COOH du récepteur GPR40 interagit avec des protéines en amont de voies de signalisation très différentes (191). En réponse à des ligands tels que l'acide oléique ou l'acide palmitique, l'activation de la voie de la protéine G<sub>q</sub> décrite précédemment semble favorisée (89, 98, 188, 190, 191). En réponse à l'acide linoléique et différents ligands synthétiques de la compagnie Amgen, le récepteur GPR40 peut interagir avec la protéine G<sub>s</sub> (191, 192). Comme mentionné précédemment, cette dernière favorise l'activation de l'adénylate cyclase dont la production d'AMP cyclique favorise l'activation de la protéine kinase A (PKA) (191, 192). L'activation de la PKA par l'AMP cyclique entraîne l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire en réduisant les courants potassiques

qui favorisent la dépolarisation de la membrane et donc l'ouverture des canaux calciques sensibles au voltage (192).

Un agoniste du récepteur GPR40 peut aussi activer deux voies de signalisation en parallèle. En effet, bien qu'il active la protéine Gq, le composé TAK-875 augmente aussi de manière significative l'interaction de la bêta arrestine 1 et de la bêta arrestine 2 avec le récepteur GPR40 (190). Bien que l'acide palmitique et l'acide oléique induisent aussi le recrutement de bêta arrestines, la différence en puissance et en efficacité de ces ligands est telle qu'ils sont des agonistes partiels pour le recrutement de bêta arrestines comparativement au TAK-875 (190). À l'inverse, TAK-875 est moins efficace que l'acide palmitique ou l'acide oléique pour augmenter l'interaction de la protéine Gq avec le récepteur GPR40 ; 50% moins de protéines Gq interagissent avec le récepteur GPR40 lorsqu'il est activé par le TAK-875 (190). Il est aussi intéressant de noter que l'inhibition pharmacologique de la protéine Gq affecte l'efficacité de TAK-875 à recruter les bêta arrestines. Le recrutement des bêta arrestines au récepteur GPR40 emploie donc des mécanismes dépendants et indépendants de la voie activée par la protéine Gq (190). Les ligands pour le récepteur GPR40 semblent donc activer plusieurs voies de signalisation en parallèle.

Puisque la voie activée par le récepteur GPR40 dépend du ligand, la potentialisation de la sécrétion d'insuline est influencée différemment par l'inhibition des voies de signalisation. Par exemple, l'inhibition de la protéine Gq diminue de façon significative la sécrétion d'insuline potentialisée par l'acide palmitique, mais elle n'affecte pas la potentialisation de la sécrétion d'insuline par TAK-875 (190). À l'inverse, l'absence de la bêta arrestine 2 réduit la potentialisation de la sécrétion d'insuline par TAK-875 sans affecter la potentialisation de la sécrétion d'insuline par l'acide palmitique (190). Tout comme les différentes voies de signalisation, les molécules effectrices activées en aval du récepteur GPR40 semblent aussi varier en fonction de l'agoniste.

## Les cibles potentielles du récepteur GPR40

Dans certains modèles cellulaires, l'activation du récepteur GPR40 peut mener à une augmentation de la phosphorylation de la protéine kinase B (AKT) et des ERK 1 et 2 (193, 194). Cette phosphorylation des ERK1/2 en réponse à l'activation de GPR40 par l'acide linoléique est fortement diminuée à la suite de l'inhibition pharmacologique de la protéine Gi/o, de PI3K, de la protéine tyrosine kinase Src proto-oncogène (Src), du substrat de la toxine botulinum C3 similaire à Ras (Rac), de la protéine sérine/thréonine kinase Raf-1 proto-oncogène (Raf-1) ou de MAPK1/2 (193). En effet, tel que décrit dans le modèle de Seljeset et Siehler (193), l'activation de la PI3K en aval de la protéine Gi/o peut mener à l'activation de Rac qui active ensuite Raf-1. Raf-1 active à son tour les MEK1/2 qui peuvent phosphoryler les MAPKs telles qu'ERK1 et ERK2 (ERK1/2) (193). Il est intéressant de noter que l'inhibition de la phosphorylation des ERK1/2 réduit de manière significative la sécrétion d'insuline provoquée par l'interaction de la cellule bêta pancréatique avec certaines composantes de la matrice extracellulaire (195). De plus, une réduction de l'activation d'ERK1/2 résultant de l'absence d'une protéine du réticulum endoplasmique de même que l'inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2 avec un inhibiteur ou suite à une exposition chronique de palmitate diminuent de manière significative la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (196, 197). Cependant, malgré le rôle important que semble jouer ERK1/2 dans la sécrétion d'insuline dépendante et indépendante au glucose (195-197), l'inhibition des MAPKs avec un inhibiteur de MEK1/2 ne réduit pas la sécrétion d'insuline qui résulte de l'activation du récepteur GPR40 (97, 198). Ainsi, les ERK1/2 ne semblent pas essentielles à la voie de signalisation responsable de la potentialisation de la sécrétion d'insuline en aval du récepteur GPR40.

Puisque l'activation du récepteur GPR40 semble surtout favoriser l'activation de la protéine Gq, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire en réponse à son activation est le plus souvent attribuée à la

production des inositols triphosphates par la PLC. Ces inositols triphosphates peuvent en théorie interagir avec les pompes calciques à la surface du réticulum endoplasmique. Cependant, la thapsigargine, qui inhibe ces canaux, n'influence pas l'augmentation de la concentration calcique induite par l'acide oléique (174). Ce sont plutôt des inhibiteurs des canaux calciques de type L qui réduisent l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire provoquée par l'interaction de l'acide oléique avec le récepteur GPR40 par (174). Ces canaux calciques sont plutôt activés par la dépolarisation de la membrane cellulaire. Ainsi, l'augmentation de la concentration calcique en réponses à l'acide oléique résulte possiblement de la diminution des courants potassiques observée à la suite de l'activation du récepteur GPR40, qui favorise à son tour la dépolarisation de la cellule (174, 192).

Même si les inositols triphosphates ne sont pas responsables de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire en aval du récepteur GPR40, il est intéressant de souligner que la PLC produit des DAG en parallèle de ces inositols triphosphates. Le DAG a un fort potentiel comme second messenger en aval du récepteur GPR40 puisqu'il favorise l'activité de certaines protéines comme la protéine kinase D1 (PKD1) (199, 200).

# La Protéine Kinase D1

La famille des protéines kinases D contient trois membres ; PKD1, PKD2 et PKD3. PKD1 est le premier membre de cette famille à avoir été étudié. PKD1 a même longtemps été considérée comme une protéine kinase C (PKC), soit la PKC $\mu$ , à cause de son domaine riche en cystéines à l'intérieur d'un motif de doigts de zinc semblable aux PKCs dites conventionnelles (*conventional*) et nouvelles (*novel*) (201). Deux domaines situés sur l'extrémité N-terminale de PKD1 régule son activité ; soit le domaine d'homologie pleckstrine (PH) et le domaine C1 (*Figure 13*). Le domaine PH diminue l'activité kinase basale de PKD1 (202) et l'identification de ce domaine est responsable de la catégorisation initiale de PKD comme étant une PKC 'atypique nouvelle' (203). Le domaine C1 pour sa part consiste en 2 motifs riches en cystéines permettant la liaison de PKD1 avec le DAG et l'ester de phorbol qui augmentent son activité kinase (199, 201).

L'activation de PKD1 par ces molécules favorise à son tour son autophosphorylation sur sa sérine 916 (204). Le DAG peut aussi favoriser l'activation des PKCs dites nouvelles qui activent PKD1 (205-208) en la phosphorylant sur ses sérines 744 et 748 (208). La phosphorylation de PKD1 à ces deux sites augmente son activité kinase (205, 207). Ce sont des motifs dans le domaine catalytique de PKD1 qui lui permettent de phosphoryler des substrats sur leurs sérines et leurs thréonines (201).

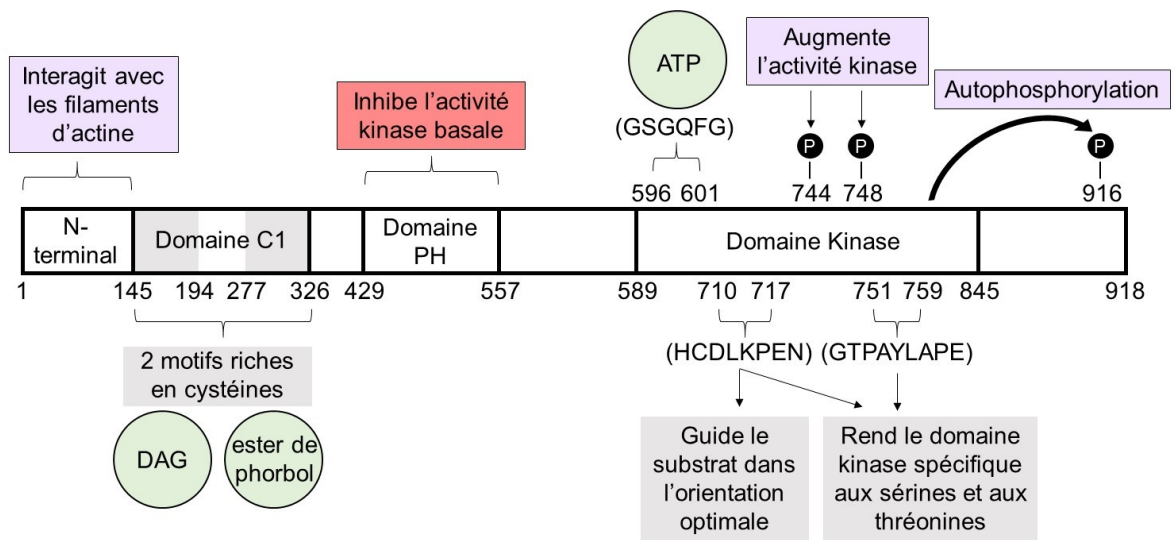


Figure 13 : La Protéine Kinase D1 (199-208, 215)

PKD1 joue un rôle important lors de la formation et le clivage final des granules d'insuline du Golgi (*Figure 14*). La courbure prononcée de la membrane reliant un futur granule au Golgi favorise une composition riche en diacylglycérol qui peut augmenter le recrutement et l'activité de PKD1 (209). PKD1 s'attache à la membrane du Golgi, avec ses domaines riches en cystéines et son domaine N-terminal hydrophobique, sous une conformation appelée doigts-de-zinc (210). Dans les cellules insulino-sécrétrices INS1, PKD1 phosphoryle l'arfaptine-1 qui favorise le maintien de la courbure prononcée de la membrane entre le Golgi et le futur granule (211). La régulation de l'interaction de l'arfaptine-1 avec le Golgi par PKD1 est particulièrement importante.

D'une part, si l'arfaptine-1 n'est pas phosphorylée par PKD1 et demeure attachée au Golgi, les granules d'insuline ne sont pas clivés du Golgi (211). Cependant, en absence complète de l'interaction de l'arfaptine-1 avec le Golgi, les granules d'insuline sont séparés du Golgi prématurément et ne possèdent pas les composantes membranaires nécessaires pour fusionner avec la membrane cytoplasmique (211). La phosphorylation de l'arfaptine-1 par PKD1 à un moment précis lors de la formation d'un granule est donc essentielle afin que le granule d'insuline puisse être sécrété.

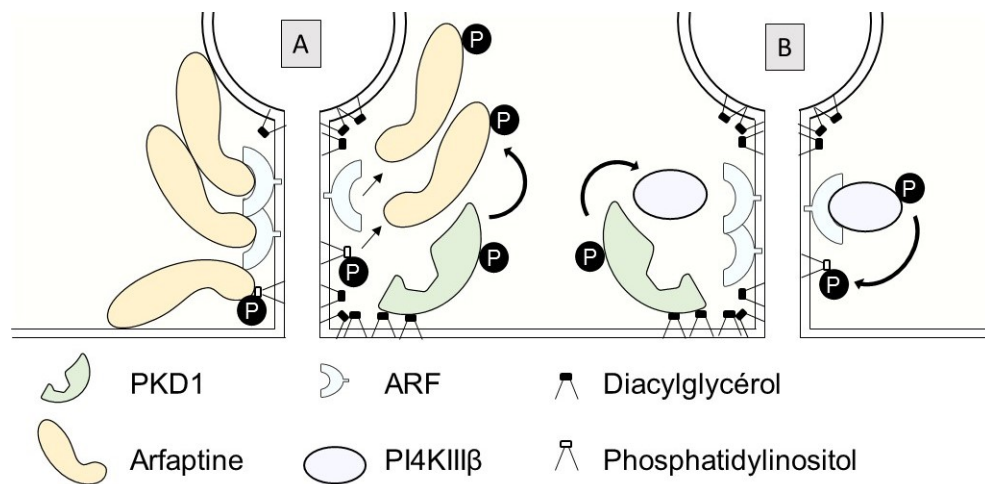


Figure 14 : PKD1 est importante pour la fission des granules du Golgi (209-214)

PKD1 peut phosphoryler l'arfaptine-1 sur deux sérines, soit les sérines 100 et 132, et cette phosphorylation inhibe l'interaction de l'arfaptine-1 avec le Golgi (211, 212). Plus précisément, la phosphorylation de l'arfaptine-1 sur sa sérine 132 inhibe son interaction avec les facteurs de ribosylation d'ADP (ARF) qui lui permettent de demeurer attachée à la membrane du Golgi (211). La phosphorylation de l'arfaptine-1 sur sa sérine 100 quant à elle diminue la liaison de l'arfaptine-1 avec les phosphatidylinositols 4-phosphates très présents dans la membrane du Golgi (212). Fait intéressant à souligner, ces phosphatidylinositols 4-phosphates

sont produits à la membrane du Golgi par la kinase III  $\beta$  de phosphatidylinositol-4 (PI4KIII $\beta$ ) et sont nécessaires afin que les granules synthétisés au niveau du Golgi puissent être sécrétés (213, 214). Comme l'activité kinase de PI4KIII $\beta$  est augmentée lorsqu'elle est phosphorylée par PKD1 dans les cellules HEK293 et COS7 (213), PKD1 pourrait influencer la formation des granules d'insuline à plusieurs niveaux.

PKD1 est aussi impliquée dans le remodelage des filaments d'actine dans plusieurs modèles cellulaires (*Figure 15*). PKD1 est recrutée aux filaments d'actine grâce aux acides aminés situés entre 1 et 146 de son extrémité N-terminale (215). Bien que le recrutement de PKD1 aux filaments d'actine soit indépendant de son activation (215), une fois activée PKD1 peut phosphoryler des cibles impliquées dans le remodelage des filaments d'actine. Par exemple, PKD1 stabilise l'actine polymérisée dans des cellules Panc89 dérivées de tumeurs pancréatiques en phosphorylant la cortactine (216). Lorsque cette dernière est phosphorylée par PKD1, elle ne peut plus se lier aux filaments d'actine et favoriser leur élongation qui est ultimement responsable de la migration de ces cellules (215, 216). PKD1 diminue aussi la migration de cellules dérivées du cancer du sein en phosphorylant la phosphatase SSH1L (*slingshot 1 like*) (217). Cette phosphorylation augmente l'interaction de la phosphatase SSH1L avec les protéines 14-3-3 et réduit donc l'interaction de la phosphatase SSH1L avec les filaments d'actine (217, 218). Ce détachement de SSH1L des filaments d'actine diminue alors sa capacité à déphosphoryler et activer la cofiline (219). Lorsque la cofiline demeure phosphorylée, elle ne peut plus créer des extrémités sur les filaments d'actine qui sont propices à l'élongation (217). Comme il a été mentionné précédemment, le remodelage des filaments d'actine corticaux influence le recrutement des granules d'insuline à la membrane (60, 62). Ainsi, PKD1 pourrait jouer un rôle dans le remodelage des filaments d'actine qui facilite la sécrétion d'insuline.



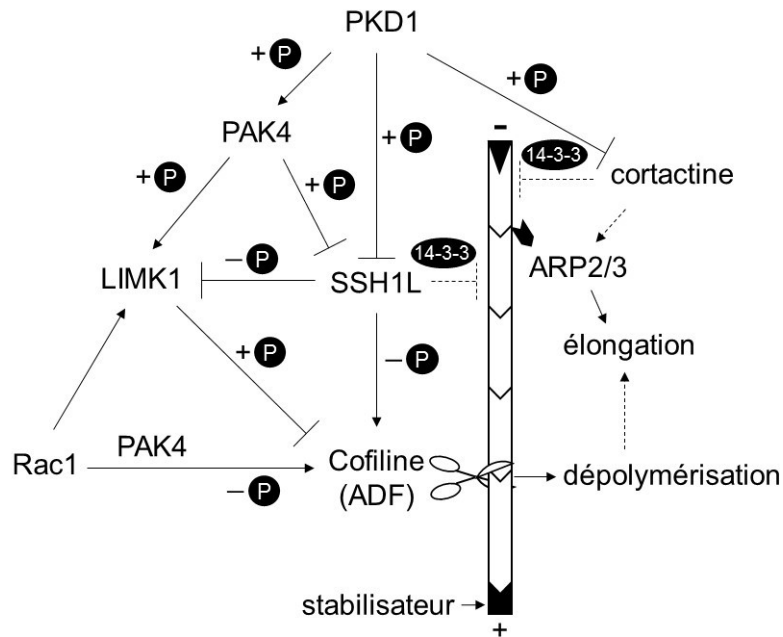


Figure 15 : PKD1 et PAK4 influencent le remodelage de l'actine (215-219, 246-253)

## Le rôle de PKD1 dans l'homéostasie du glucose

PKD1 est impliquée dans le transport du glucose à l'intérieur des cellules (*Figure 16*). Dans les astrocytes, la phosphorylation de PKD1 est nécessaire pour le recrutement de GLUT1 à la membrane qui est induit par l'interaction de l'insuline et du facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1) avec leur récepteur respectif (220). Ce recrutement de GLUT1 augmente l'entrée de glucose dans la cellule (220). Dans les cardiomyocytes, PKD1 participe à la translocation de GLUT4 provoquée par leur contraction (221). La contraction des myocytes cardiaques augmente la phosphorylation de la sérine 916 de PKD1. Une inhibition pharmacologique ou une diminution de l'expression de PKD1, pour leur part, diminuent le transport de glucose dans la cellule provoqué par une contraction (221, 222). La surexpression de PKD1 dans les cardiomyocytes peut même induire la translocation de GLUT4

à la membrane et favoriser l'entrée de glucose dans la cellule (223). La surexpression de PKD1 potentialise aussi la translocation de GLUT4 induite par l'insuline, et ce sans intervenir directement sur les molécules effectrices de la voie de signalisation du récepteur de l'insuline (223).

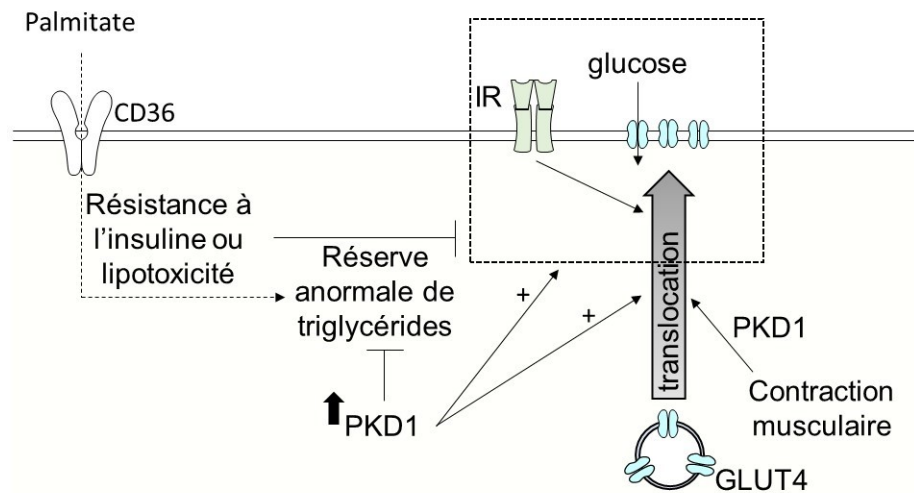


Figure 16 : PKD1 est impliquée dans le transport du glucose dans les cardiomyocytes (221-223)

Le rôle de PKD1 dans la translocation des transporteurs de glucose est plutôt spécifique puisque sa surexpression n'induit pas la translocation de la translocase CD36 à la membrane et n'affecte pas l'entrée de lipides tels que l'acide palmitique dans les cardiomyocytes (221, 223). La surexpression de PKD1 réussit néanmoins à diminuer l'accumulation anormale de triacylglycérols dans les cardiomyocytes lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions hyperinsulinémiques ou lipotoxiques (223). PKD1 protège ainsi les cardiomyocytes de l'inhibition du transport du glucose en réponse à l'insuline qui est normalement observée lorsque les cardiomyocytes sont cultivés dans ces conditions (223).

Dans les lignées cellulaires dérivées de cellules bêta pancréatiques, le rôle de PKD1 dans la sécrétion d'insuline est bien documenté. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose et au carbachol est fortement diminuée

dans les cellules INS1 et MIN6 lorsque ces dernières sont transfectées avec de petits ARN qui interfèrent avec l'expression de PKD1 (224). De plus, lorsque l'expression de PKD1 est diminuée par infection lentivirale dans les îlots de Langerhans cultivés ex vivo, la sécrétion d'insuline régulée par le récepteur muscarinique est fortement diminuée (225). Plusieurs observations dans des modèles in vivo suggèrent aussi que PKD1 joue un rôle important en aval de voies de signalisations influençant la sécrétion d'insuline. En effet, il existe une corrélation entre le niveau d'activité de PKD1 dans les îlots de Langerhans et l'insulinémie mesurée chez certaines souris.

### **L'activation de PKD1 en aval du récepteur muscarinique**

La sécrétion d'insuline d'îlots de Langerhans de souris dont le récepteur muscarinique est muté afin de réduire de 80% sa phosphorylation en réponse à un agoniste suggère que l'activité de PKD1 est nécessaire pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les signaux muscariniques (*Figure 17*) (225). En effet, cette mutation du récepteur muscarinique dans les îlots de Langerhans ex vivo réduit le recrutement de bêta arrestines et la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse à la méthacholine, et ce même si l'activation de la PLC ou la mobilisation du calcium demeurent similaires (225). Cette diminution de la sécrétion d'insuline n'est pas due à une réduction du contenu en insuline des cellules bêta pancréatiques ou de la taille des îlots, mais plutôt une diminution de l'amplitude de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline (225). Cette diminution de la sécrétion d'insuline ex vivo est aussi observée in vivo. La sécrétion d'insuline provoquée par une administration orale ou intrapéritonéale de glucose est diminuée chez la souris dont le récepteur muscarinique est muté (225).

Les chercheurs de cette étude ont constaté que l'activation du récepteur muscarinique in vitro et ex vivo provoque une augmentation de la phosphorylation de PKD1 (225). Ils ont aussi observé que PKD1 est phosphorylée à la suite de l'activation du récepteur muscarinique en présence d'inhibiteur de la PLC ou de chélateur du calcium (225). La phosphorylation de PKD1 était cependant fortement diminuée dans les îlots de Langerhans à la suite de la mutation du récepteur muscarinique qui réduit le recrutement de la bêta arrestine et dans une lignée cellulaire où l'expression de la bêta arrestine 1 est diminuée de façon significative (225). De plus, une diminution de l'expression de PKD1 dans des îlots de Langerhans ex vivo réduit la sécrétion d'insuline en réponse à un agoniste du récepteur muscarinique (225). Ainsi, les chercheurs de cette étude ont conclu que la diminution de sécrétion d'insuline à la suite d'une mutation du récepteur muscarinique est due à un recrutement moindre de la bêta arrestine qui entraîne une activation plus faible de la PKD1 (225).

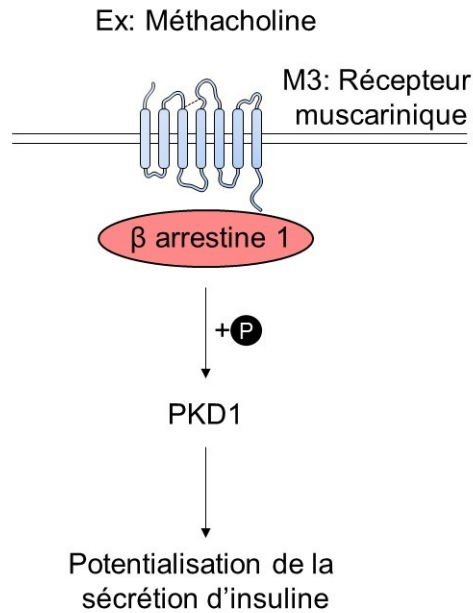


Figure 17 : PKD1 est impliquée dans la voie du récepteur muscarinique (225)

## **L'inhibition de PKD1 par la MAPK p38δ**

La MAPK p38δ est fortement exprimée dans les cellules endocrines et exocrines du pancréas de souris sauvages. Cependant, c'est son absence dans les îlots de Langerhans qui augmente significativement la sécrétion d'insuline ex vivo en réponse à 2,8 mM ou 16,7 mM glucose, de même qu'en réponse à des agents dépolarisants la membrane cellulaire (224). Cette augmentation de la sécrétion d'insuline causée par la perte de la MAPK p38δ est aussi observée chez la souris à la suite d'une administration de glucose par injection intrapéritonéale. En effet, les deux phases de la sécrétion d'insuline induite par le glucose sont augmentées de manière significative chez la souris déficiente pour la MAPK p38δ comparativement à la souris sauvage (224).

PKD1 peut être phosphorylée sur sa sérine 403 dans les cellules insulinosécrétrices INS1 par la MAPK p38δ et ce site correspond aux sérines 397 et 401 de l'isoforme humaine de PKD1 (224). La phosphorylation de ces sérines est indépendante de l'autophosphorylation de PKD1 et elle entraîne une diminution de son activité kinase (224). L'autophosphorylation de PKD1 sur sa sérine 916 est même augmentée de façon significative dans les cellules MIN6 ou dans les pancréas de souris déficientes pour la MAPK p38δ comparativement aux cellules MIN6 contrôles ou au pancréas de souris sauvages (224). Une augmentation de l'activité de PKD1 est ainsi potentiellement responsable de l'hyperinsulinémie observée chez les souris déficientes pour la MAPK p38δ (*Figure 18*) (224).

Tout comme dans l'étude décrite précédemment, la modification de la sécrétion d'insuline ne résulte pas d'une différence au niveau de la concentration intracellulaire de calcium ou dans le contenu en insuline de la cellule bêta pancréatique (224). L'augmentation de la sécrétion d'insuline dans ces cellules semble plutôt être le résultat d'une activité modifiée de PKD1 au niveau du Golgi de même qu'une augmentation de l'activité de la machinerie d'exocytose qui est indépendante de la concentration de calcium. L'activation modifiée de PKD1 au niveau du Golgi altère la structure du Golgi

à un point tel que le marquage pour observer l'organelle devient diffus à l'intérieur de la cellule beta pancréatique (224).

Lorsque la synthèse de DAG est réduite avec un inhibiteur de la PLC, la structure du Golgi redevient normale dans les cellules bêta pancréatiques déficientes pour la MAPK p38δ (224). De plus, la sécrétion d'insuline ex vivo de ces îlots de Langerhans isolés de souris déficientes pour la MAPK p38δ diminue à des valeurs normales (224). Bien que la sécrétion d'insuline n'ait pas été mesurée in vivo suivant l'administration de l'inhibiteur de la PLC chez la souris déficiente pour la MAPK p38δ, les glycémies de ces souris suggèrent que la sécrétion d'insuline est réduite chez ces souris mutées lorsque la synthèse de DAG est diminuée (224). Ainsi, chez la souris sauvage, la MAPK p38δ phosphoryle et inhibe la PKD1 qui pourrait sinon augmenter la sécrétion d'insuline induite par le glucose à la suite de son activation par des DAG générés par la PLC (224).

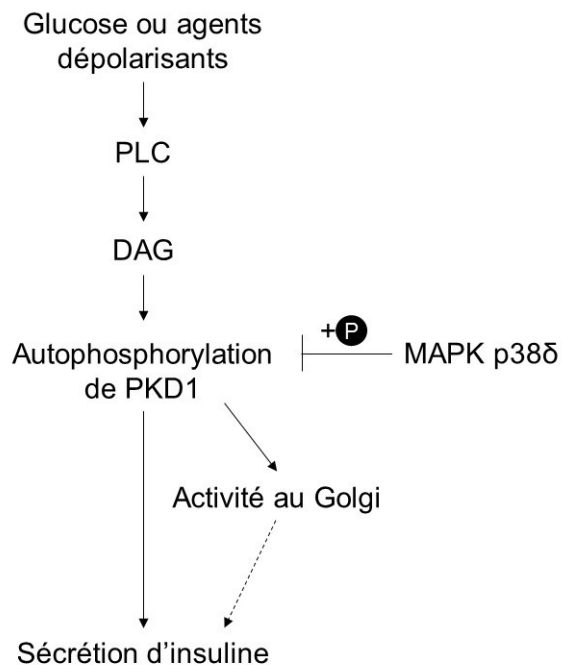


Figure 18 : L'activation de PKD1 par DAG augmente la sécrétion d'insuline (224)

## **L'inhibition de PKD1 par la PPAR $\beta/\delta$**

Tout comme dans le modèle animal précédent, l'activité de PKD1 semble augmenter suite à la perte de PPAR  $\beta/\delta$  dans les cellules bêta pancréatiques. En effet, l'autophosphorylation sur la sérine 916 de PKD1 est significativement plus élevée dans les cellules bêta pancréatiques déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$  (*Figure 19*) (226).

À la suite de l'étude de l'expression de PPAR  $\beta/\delta$ , des chercheurs ont déterminé que ce récepteur nucléaire, qui interagit avec les lipides, est impliqué dans le développement du pancréas (226). Néanmoins, lorsqu'il est absent des cellules bêta pancréatiques chez la souris, la prolifération de ces cellules est favorisée (226). Il en résulte une augmentation du nombre d'îlots de Langerhans et de la masse de cellules bêta pancréatiques à l'âge adulte (226). Cette augmentation du nombre de cellules bêta pancréatiques dans les souris déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$  n'augmente pas seulement le contenu en insuline de leur pancréas, mais aussi la sécrétion d'insuline induite par l'administration de glucose par injection intrapéritonéale (226).

Ex vivo, les îlots déficients pour PPAR  $\beta/\delta$  dans les cellules bêta pancréatiques possèdent une deuxième phase de la sécrétion d'insuline induite par le glucose significativement plus élevée (226). Cette augmentation de la deuxième phase de sécrétion d'insuline n'est pas due à des modifications des concentrations calciques, mais plutôt à une augmentation de l'activité de l'appareil d'exocytose. En effet, le nombre de granules ancrés à la membrane des cellules bêta pancréatiques déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$  non-stimulées est comparable aux cellules bêta pancréatiques de souris sauvages (226). C'est plutôt le nombre de fusions de granules à la membrane, mesuré par les fluctuations de l'aire de la membrane, qui est augmenté de façon significative chez les cellules bêta pancréatiques déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$  lorsqu'elles sont dépolarisées (226).

Cette augmentation de la fusion de vésicules d'insuline semble être le résultat de la dépolymérisation accrue des filaments d'actine dans les cellules bêta pancréatiques déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$ . En effet, la polymérisation

des filaments d'actines corticaux est fortement diminuée dans les cellules bêta pancréatiques déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$  (226). Le marquage de la structure du Golgi est aussi diffus dans les cellules bêta pancréatiques déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$ , mais la structure de l'organelle revient à la normale lorsque PKD1 est inhibée avec un agent synthétique (226). Ainsi, l'augmentation de l'activité de PKD1 pourrait être responsable de l'hyperinsulinémie observée dans les souris déficientes pour PPAR  $\beta/\delta$  dans les cellules bêta pancréatiques (226). À la suite de l'augmentation du remodelage des filaments d'actine et la fusion des granules observés dans ce modèle, il est possible que PKD1 soit aussi impliquée dans ces mécanismes dans les cellules bêta pancréatiques.

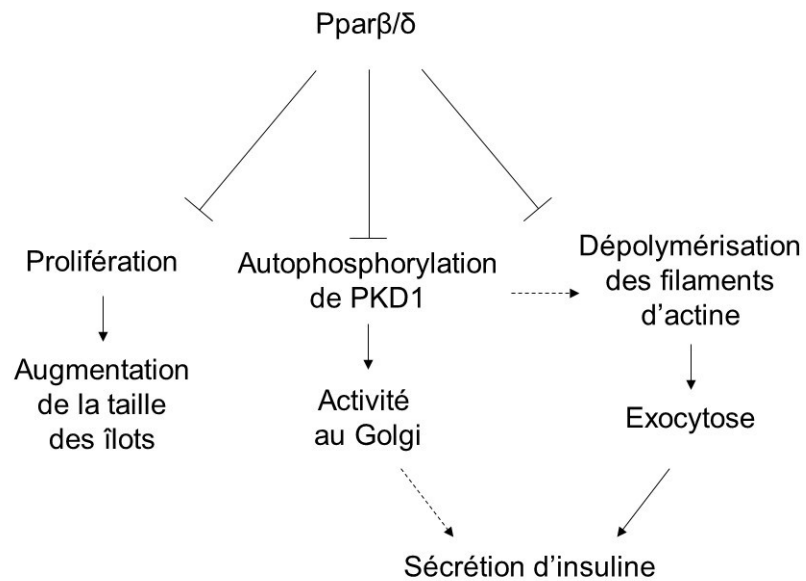


Figure 19 : L'activité de PKD1 au Golgi corrèle avec la sécrétion d'insuline (226)



# Les Kinases Activées par P21

La famille des kinases activées par P21 (PAK) doit son nom au premier membre de la famille à avoir été identifié. En effet, PAK1 qui est activée par les petites protéines p21 guanosine-5'-triphosphatases (GTPases) telles que la protéine cdc42 et la Rac1 (227). La famille PAK est divisée en deux groupes en fonction de l'architecture de leurs domaines ; le groupe 1 qui comprend PAK1, PAK2 et PAK3 et le groupe 2 qui comprend PAK4, PAK6 et PAK7 (aussi connue comme PAK5) (228).

Les PAKs sont activées par des mécanismes distincts selon le groupe auquel elles appartiennent. Les PAKs du groupe 1 deviennent actives lorsque les protéines cdc42 ou Rac1 se lient avec le domaine de liaison aux protéines p21 (PBD), aussi connu comme étant le domaine CRIB (*cdc42-Rac Interaction/Binding*), sur l'extrémité N-terminal des PAKs (227). Cette liaison permet l'autophosphorylation des PAK de groupe 1 en présence d'ATP (227). De plus, cette phosphorylation éloigne le domaine PBD du domaine kinase et défait ainsi la PAK de sa conformation dimérique qui est considérée comme son « état inactif d'autoinhibition » en condition basale (229, 230). D'autre part, PAK1 possède plusieurs sites d'autophosphorylation (231) et est plus active lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase dépendante des phosphoinositides 1 (PDK1) sur sa thréonine 423 (232). À la suite de plusieurs autophosphorylations, PAK1 peut subir une ubiquitination qui la cible vers la dégradation par le protéosome (231). Ainsi, les conséquences possibles de la phosphorylation des PAKs du groupe 1 sont aussi nombreuses que les mécanismes qui l'induisent.

Le modèle d'activation des PAKs du groupe 2 résulte principalement des études portant sur l'activation de PAK4. Cependant, les conclusions de ces études explorant l'importance de l'autophosphorylation ou de la nécessité de l'interaction avec les protéines p21 pour l'activation de PAK4 ne sont pas unanimes. Premièrement, les PAKs du groupe 2 ne forment pas de dimères d'autoinhibition en condition basale comme les PAKs du groupe 1. Les PAKs

du groupe 2 contiennent plutôt un domaine autoinhibiteur (AID) qui garde les PAKs en position « fermée » afin d'empêcher leur activité kinase (*Figure 20*) (233). Il existe chez les trois PAKs du groupe 2 une séquence très similaire correspondant à la séquence du domaine inhibiteur fonctionnel de PAK4 (233). PAK5 présente aussi un domaine inhibiteur supplémentaire qui n'est pas présent chez les autres PAKs (234). Deuxièmement, l'activation d'une PAK du groupe 2 ne nécessite pas une autophosphorylation sur le domaine inhibiteur (233). Néanmoins, l'interaction de la protéine cdc42 avec le domaine CRIB/PBD de PAK favorise le changement de conformation qui éloigne le domaine inhibiteur du domaine kinase (233). Cdc42 n'est cependant pas suffisant pour obtenir le plein potentiel d'activation de PAK4 (233). L'activation et l'autophosphorylation des PAKs du groupe 2 est même possible en absence de protéines p21 (235).

Les protéines p21 semblent ainsi faciliter l'activation des PAKs du groupe 2 et leur interaction avec leurs substrats en optimisant leur emplacement dans la cellule à des endroits précis. En effet, l'activation de PAK4 en présence de cdc42 provoque un déplacement de PAK4 vers le Golgi et les filaments d'actine dans les fibroblastes et les cellules endothéliales (235). Les PAKs du groupe 2 peuvent aussi s'autophosphoryler. Bien qu'une étude récente suggère que certaines autophosphorylations soient constitutives (233), une étude associe la phosphorylation des PAKs du groupe 2 à une augmentation de leur activité (235, 236).

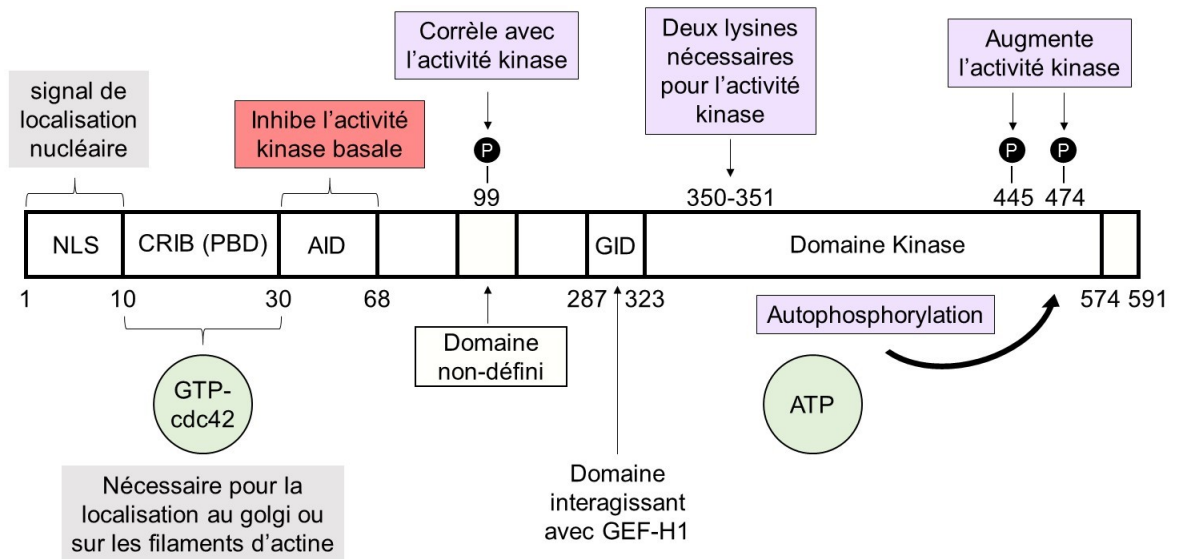


Figure 20 : La Kinase 4 Activée par P21 (PAK4) (233-236, 241, 247)

## Le rôle des PAKs dans les cellules pancréatiques

Le rôle de quelques PAKs dans la sécrétion d'insuline a été étudié. D'une part, la diminution de l'expression de PAK1 a été observée dans les îlots de Langerhans d'humains souffrant du diabète de type 2 (61). Une diminution de l'expression de PAK1 dans les lignées cellulaires et dans les îlots de Langerhans de souris a confirmé que PAK1 est nécessaire afin d'obtenir une sécrétion d'insuline normale en réponse au glucose (60, 61). L'expression de PAK7 est elle aussi réduite dans les îlots de Langerhans d'humains présentant des valeurs d'HbA1c élevées. De plus, une diminution de son expression dans la lignée cellulaire INS1 832/13 diminue la sécrétion d'insuline induite par le glucose (237). PAK3, pour sa part, ne semble pas importante pour la sécrétion d'insuline, bien que les souris déficientes pour PAK3 soient moins tolérantes au glucose (238).

PAK4 quant à elle a plutôt été étudiée dans les cellules pancréatiques pour son rôle dans le développement du cancer pancréatique. En effet, une augmentation de l'expression et de l'activité de PAK4 a été observée dans

les adénocarcinomes pancréatiques humains (239). PAK4 est importante pour la prolifération, la survie et le remodelage du cytosquelette des cellules pancréatiques cancéreuses (240-243). Quelques inhibiteurs de PAK4 ont même été considérés comme approche thérapeutique pour le traitement de certains cancers (244, 245).

## **PAK4 et le remodelage des filaments d'actine**

Les PAKs du groupe 1 et du groupe 2 jouent un rôle dans les modifications structurales du cytosquelette. PAK1 joue un rôle important dans la dépolymérisation des filaments d'actine nécessaire à la sécrétion d'insuline (62). Dans certains modèles cellulaires, l'activation par Rac1 du complexe dépolymérisant des filaments d'actine (ADF)/cofiline est dépendante des PAKs du groupe 2 (*Figure 15*) (246). PAK4 interagit aussi avec des composantes influençant les microtubules et les filaments d'actine (247, 248). PAK4 phosphoryle le facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF)-H1 et diminue ainsi son interaction avec la tubuline (*Figure 21*) (247). PAK4 favorise ainsi la localisation de GEF-H1 dans le cytosol de même qu'au Golgi et favorise donc indirectement la dépolymérisation des filaments d'actine (247, 249).

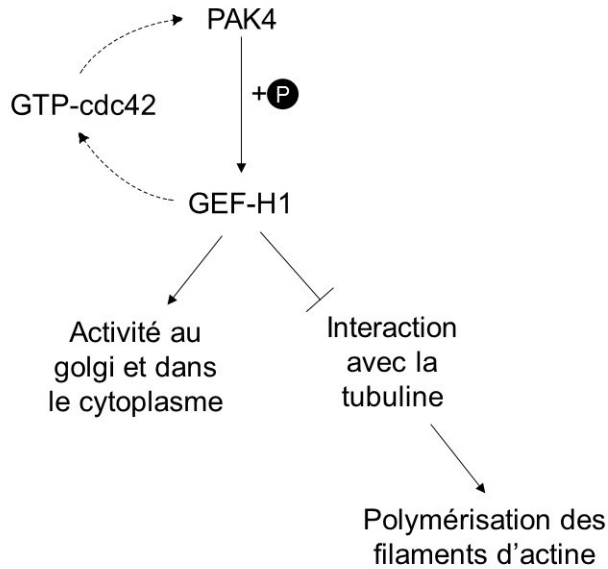


Figure 21 : PAK4 peut favoriser la dépolymérisation des filaments d'actine (247, 249)

Comme il a été mentionné précédemment (*Figure 15*), lorsque la cofiline est phosphorylée, elle ne peut pas participer au remodelage des filaments d'actine (217, 218). En plus d'être un substrat direct de la SSH1L (218), la cofiline est un substrat de la kinase 1 possédant un domaine LIM (LIMK1) (250). La phosphorylation de la cofiline sur sa sérine 3 par la LIMK1 inhibe son activité dépolymérisante sur les filaments d'actine qui crée des extrémités propices à l'incorporation d'actine globulaire et l'élongation des filaments (250, 251). L'absence de l'activité kinase de la LIMK1 sur la cofiline peut donc entraîner une dépolymérisation désorganisée qui cause la formation d'agrégats d'actine plutôt que des filaments d'actine essentiels à la formation de lamellipodes (250, 251).

La cofiline est phosphorylée par la LIMK1 lorsque celle-ci est activée par la GTPase Rac (251) ou par PAK4 (248). En effet, PAK4 peut se lier directement à la LIMK1 et augmenter de manière significative la phosphorylation de la LIMK1 (248). Cette phosphorylation de LIMK1 par PAK4 augmente à son tour son activité kinase sur la cofiline (248). PAK4 ralentit aussi l'inactivation de la LIMK1 en inhibant une protéine qui la

déphosphoryle (252). En effet, PAK4 peut phosphoryler la SSH1L qui déphosphoryle normalement la LIMK1 (252). Puisque la déphosphorylation de la LIMK1 diminue son activité kinase, PAK4 favorise ainsi de deux façons l'inactivation de la cofiline ; soit en activant la LIMK1 qui la phosphoryle et en inhibant la SSH1L qui la déphosphoryle (248, 252).

En raison des rôles mixtes de la cofiline qui dépolymérise d'une part l'actine et qui favorise d'une autre part l'élongation des filaments d'actine par le type d'extrémité qu'elle produit sur les filaments d'actine, les conséquences de l'activation de PAK4 sur le remodelage des filaments d'actine sont très variables (248). Lorsqu'une PAK4 sauvage est transfectée avec une LIMK1 sauvage dans une cellule, la polymérisation de l'actine en filaments est augmentée. L'expression d'une PAK4 constitutivement active entraîne l'apparition d'agrégats polymérisés condensés plutôt que de filaments et une réduction des fibres formées de plusieurs filaments d'actine (248). Ces modifications répriment fortement la création de projections fines aux extrémités des lamellipodes appelées filopodes (248). Cette polymérisation plus importante à la suite de l'activation constitutive de PAK4 dépend de la fonction kinase de LIMK1 et de la phosphorylation et l'inactivation de la cofiline (248).

Cependant, les résultats obtenus suite à cette forte inhibition de la cofiline qui résulte de l'activation constitutive de PAK4 sont similaires à ceux obtenus suite à l'inhibition de la LIMK1 qui cause une forte activation de la cofiline (248, 250, 251). Ces observations diffèrent aussi de la polymérisation de l'actine en filaments qui est observée lorsque PAK4 et LIMK1 sont de types sauvages (248). Ces différentes études suggèrent donc que PAK4 est impliquée dans le maintien d'un équilibre très fragile entre la polymérisation et la dépolymérisation qui est nécessaire afin de maintenir un remodelage approprié des filaments d'actine.

## **PAK4 une cible de PKD1**

L'activité de PAK4 au niveau des molécules impliquées dans le remodelage des filaments d'actine est contrôlée par la PKD1. En effet, PKD1 peut phosphoryler la sérine 474 de PAK4, qui augmente son activité kinase, et la sérine 99 de PAK4, qui favorise sa translocation dans la cellule vers des sites où le remodelage des filaments d'actine est plus important (219, 253). Ces phosphorylations et ce changement de localisation sur les filaments d'actine se traduisent en une plus grande activité de PAK4 sur les filaments d'actine (219, 253). D'une part, lorsqu'elle est phosphorylée par PKD1, PAK4 phosphoryle la LIMK1 qui phosphoryle à son tour la cofiline (253). D'autre part, lorsqu'elle est phosphorylée sur sa sérine 99 PAK4 forme un complexe avec PKD1 et la protéine 14-3-3 $\gamma$  qui empêche la formation d'extrémité propice à l'élongation et empêche l'incorporation de nouvelles actines globulaires aux filaments (253). De plus, si l'activité kinase de PKD1 est inhibée, PAK4 cesse d'inhiber les mécanismes induisant le remodelage des filaments d'actine qui provoquent la migration cellulaire (253). Ainsi, tout comme PKD1, PAK4 pourrait jouer un rôle dans le remodelage des filaments d'actine des cellules bêta pancréatiques qui est important pour la sécrétion d'insuline.

# Mise en contexte de la thèse

## Problématique

Les nombreux médicaments actuellement offerts sur le marché pour le diabète de type 2 traitent les symptômes de la maladie et provoquent des effets secondaires inconfortables et parfois sérieux. Le récepteur GPR40 semble être un candidat très intéressant comme cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 puisque son activation potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Les composantes de la voie de signalisation du récepteur GPR40 demeurent néanmoins inconnues. Il est donc actuellement difficile de prédire le potentiel réel du récepteur GPR40 comme cible thérapeutique et anticiper les conséquences d'une activation constante et à long terme de ce récepteur chez l'humain.

## But de la thèse

Le but de cette thèse est d'identifier les composantes de la voie de signalisation du récepteur GPR40 et étudier leur rôle dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse aux acides gras.

## Hypothèses de la thèse

### **Implication de PKD1 dans la signalisation du récepteur GPR40 et la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras**

La liaison des ligands endogènes au récepteur GPR40 provoque principalement l'activation de la protéine Gq, l'activation subséquente de la phospholipase C qui génère à son tour des inositols triphosphates et du diacylglycérol à partir de phospholipides (89, 98, 188, 190). Dans d'autres systèmes, l'accumulation de DAG active certaines protéines comme PKD1 (199, 200). Ainsi, notre première hypothèse de travail est que le récepteur GPR40 potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose en activant PKD1.



### **Implication de PAK4 dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline à la suite de l'activation du récepteur GPR40.**

PAK4 est phosphorylée sur deux sérines différentes par PKD1 (219, 253). À la suite de son activation, PAK4 phosphoryle des molécules impliquées dans le remodelage des filaments d'actine comme la cofiline (219). Comme le remodelage des filaments d'actines joue un rôle important dans le recrutement des granules d'insuline (58, 60), il est possible que PAK4 soit impliquée dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras. Notre deuxième hypothèse de travail est donc que PAK4 est impliquée dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras en aval du récepteur GPR40.

### **Le rôle de PKD1 dans l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline induite par une diète riche en lipides**

Dans plusieurs modèles animaux, l'activité de PKD1 corrèle avec la sécrétion d'insuline. Une augmentation de l'activité de PKD1 dans les souris déficientes pour la MAPK p38 $\delta$  ou déficientes pour PPAR $\beta/\delta$  dans le pancréas est tenue responsable de l'hyperinsulinémie observée chez ces souris (224, 226). La perte d'activité de PKD1 à la suite d'une mutation du récepteur muscarinique chez la souris pour sa part semble responsable de la diminution de la sécrétion d'insuline observée dans ce modèle (225). Si PKD1 est une composante importante de la voie de signalisation du récepteur GPR40 et joue un rôle dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras (hypothèse 1), PKD1 est probablement importante pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline in vivo. Notre troisième hypothèse de travail est donc que PKD1 joue un rôle important dans l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline induite par une diète riche en lipides.

## Objectifs de la thèse

1. Déterminer si PKD1 est impliquée dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras à la suite de leur interaction avec GPR40
2. Déterminer si PAK4 est impliquée dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras à la suite de leur interaction avec GPR40
3. Identifier le rôle de PKD1 dans l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline en réponse à une diète riche en lipides chez la souris

## Publications

Les travaux de recherche de cette thèse ont mené à la rédaction de trois articles de recherche originaux, dont deux articles comme première auteure :

1. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, Poitout V. *G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1*. Diabetologia. 2012. 55(10):2682-92
2. Bergeron V, Ghislain J and Poitout V. *The P21-activated kinase PAK4 is implicated in fatty-acid potentiation of insulin secretion downstream of free fatty acid receptor 1*. Islets. 2016. 8(6):157-164
3. Bergeron V, Ghislain J, Vivot K, Tamarina N, Philipson LH, Fielitz J, Poitout V. *Deletion of protein kinase D1 in pancreatic beta cells impairs glucose induced insulin secretion in high-fat fed mice*. Soumis au journal *Diabetes*.

## Résultats

# Article 1

**Titre : G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1**

**Auteurs :** Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, Poitout V

**Article publié dans :** Diabetologia. 2012; 55(10): 2682-92 (doi : 10.1007/s00125-012-2650-x)

## **Contributions des auteurs :**

**Ferdaoussi M :** Auteur principal ayant élaboré les hypothèses, effectué la majorité des expériences, analysé les résultats et rédigé le papier.

**Bergeron V :** Coauteure ayant participé aux expériences mesurant la phosphorylation de PKD1 en réponse aux acides gras dans les îlots de Langerhans, ayant mis au point le protocole de fractionnement cellulaire, ayant effectué les expériences mesurant la translocation de PKD1 à la membrane des cellules INS832/13, ayant déterminé les conditions de stimulations et participé aux expériences pour étudier la dépolymérisation des filaments d'actine dans les îlots de Langerhans des souris sauvages et déficientes pour GPR40 et ayant participé à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit.

**Zarrouki B :** Coauteur ayant mis au point le protocole de perfusion d'îlots de Langerhans, ayant effectué les expériences de perfusion mesurant la sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans de souris sauvages et déficientes pour GPR40 et ayant participé à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit.

**Kolic J :** Coauteure ayant effectué la fixation, le marquage et la prise de photos pour l'analyse de la dépolymérisation des filaments d'actine dans les îlots de Langerhans des souris sauvages et déficientes pour GPR40 et les îlots de Langerhans infectés avec des adénovirus contrôles ou exprimant la

recombinase CRE, ayant participé à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit.

**Cantley J** : Coauteur et collaborateur ayant généré les souris déficientes pour PKC delta et ayant participé à la correction du manuscrit.

**Fielitz J** : Coauteur et collaborateur ayant généré les souris dont le gène pour PKD1 contient les insertions loxP et ayant participé à la correction du manuscrit.

**Olson EN** : Coauteur et collaborateur ayant participé à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

**Prentki M** : Coauteur et collaborateur ayant participé à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

**Biden T** : Coauteur et collaborateur ayant participé à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

**MacDonald PE** : Coauteur et collaborateur ayant participé à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

**Poitout V** : Investigateur principal ayant dirigé et supervisé l'ensemble de ce projet de l'élaboration de l'hypothèse à la rédaction du manuscrit.

## Mise en contexte de l'article 1

L'activation du récepteur GPR40 par les acides gras circulants permet de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose (89). Dans ce premier article publié dans le journal *Diabetologia*, nous avons en premier lieu étudié le profil de sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans en réponse aux acides gras afin de mieux cibler notre investigation des molécules effectrices de la voie de signalisation de GPR40. À la suite de nos observations, nous avons étudié la polymérisation des filaments d'actines corticaux des îlots de Langerhans sauvages (WT) et déficients pour GPR40 (GPR40KO) en réponse à l'oléate puisque le recrutement des granules d'insuline à la membrane est influencé par le remodelage des filaments d'actine (58, 60).

Afin d'identifier les molécules effectrices de la voie de signalisation de GPR40, nous avons aussi évalué si le DAG pouvait restaurer la potentialisation de la sécrétion d'insuline dans les îlots GPR40KO. Nous avons ensuite étudié le profil d'activation de PKD1 puisque son activité est influencée par le DAG et elle interagit avec des molécules impliquées dans le remodelage des filaments d'actine (216, 217). Nous avons ainsi étudié la phosphorylation de PKD1 et sa translocation à la membrane en réponse à l'oléate dans la lignée cellulaire pancréatique INS832/13. Nous avons ensuite étudié la phosphorylation de PKD1 dans les îlots sauvages et GPR40KO en réponse à l'oléate et au DAG. Afin d'évaluer le rôle de PKD1 dans la voie de signalisation du récepteur GPR40, nous avons mesuré la potentialisation de la sécrétion d'insuline par l'oléate dans des îlots déficients pour PKD1. Nous avons confirmé les résultats obtenus avec ces îlots en mesurant la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras dans des îlots sauvages traités avec un inhibiteur de PKD1. Finalement, nous avons étudié la polymérisation des filaments d'actine corticaux dans les îlots déficients pour PKD1 afin d'évaluer le rôle de PKD1 dans le remodelage des filaments d'actine en réponse aux acides gras.

## **G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1**

M. Ferdaoussi<sup>1,2</sup>, V. Bergeron<sup>1,2</sup>, B. Zarrouki<sup>1,2</sup>, J. Kolic<sup>3</sup>, J. Cantley<sup>4</sup>, J. Fielitz<sup>5,6</sup>, E.N. Olson<sup>7</sup>, M. Prentki<sup>1,8</sup>, T. Biden<sup>4</sup>, P.E. MacDonald<sup>3</sup> and V. Poitout<sup>1,2,8</sup>

**Diabetologia. 2012 ; 55(10) : 2682-92**

1. Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, University of Montreal, Montreal, Québec, H1W4A4 Canada.
2. Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3T1J4 Canada.
3. Department of Pharmacology and the Alberta Diabetes Institute, University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6G2E1 Canada.
4. Garvan Institute of Medical Research, St Vincent's Hospital, Darlinghurst, Sydney, NSW, 2010 Australia.
5. Experimental and Clinical Research Center, a joint cooperation between the Charité Medical Faculty and the Max-Delbrück Center for Molecular Medicine, 13125 Berlin. Germany.
6. Medical Department, Division of Cardiology, Campus Virchow-Klinikum, Charité University, 13125 Berlin. Germany.
7. Departments of Molecular Biology, Internal Medicine, and Pathology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390-9148 USA.
8. Departments of Nutrition and Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, H3C3J7 Canada.

### **Corresponding author:**

Vincent Poitout, DVM, PhD

Technopole Angus, 2901 Rachel Est, Montréal, QC, Canada, H1W 4A4

Telephone number: +1 514 890 8000 ext 23603

Fax number: + 1 514 412 7648; E.mail: Vincent.poitout@umontreal.ca

## **Abstract**

**Aims/hypothesis:** Activation of the G protein-coupled receptor (GPR)40 by long-chain fatty acids potentiates glucose stimulated insulin secretion (GSIS) from pancreatic beta cells, and GPR40 agonists are in clinical development for type 2 diabetes therapy. GPR40 couples to the G protein subunit  $G_{\alpha q/11}$  but the signalling cascade activated downstream is unknown. This study aimed to determine the mechanisms of GPR40-dependent potentiation of GSIS by fatty acids.

**Methods:** Insulin secretion in response to glucose, oleate or diacylglycerol (DAG) was assessed in dynamic perfusions and static incubations in islets from wild-type (WT) and *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice. Depolymerisation of filamentous actin (F-actin) was visualised by phalloidin staining and epifluorescence. Pharmacological and molecular approaches were used to ascertain the roles of protein kinase D (PKD) and protein kinase C delta in GPR40-mediated potentiation of GSIS.

**Results:** Oleate potentiates the second phase of GSIS, and this effect is largely dependent upon GPR40. Accordingly, oleate induces rapid F-actin remodelling in WT but not in *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. Exogenous DAG potentiates GSIS in both WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. Oleate induces PKD phosphorylation at residues Ser-744/748 and Ser-916 in WT but not *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. Importantly, oleate-induced F-actin depolymerisation and potentiation of GSIS are lost upon pharmacological inhibition of PKD1 or deletion of *Prkd1*.

**Conclusion/interpretation:** We conclude that the signalling cascade downstream of GPR40 activation by fatty acids involves activation of PKD1, F-actin depolymerisation and potentiation of second-phase insulin secretion. These results provide important information on the mechanisms of action of GPR40, a novel drug target for type 2 diabetes.

**Keywords:** Diacylglycerol; Filamentous actin; G protein-coupled receptor; GPR40; Insulin secretion; Islet; Protein kinase D; Type 2 diabetes



**Abbreviations:** DAG: Diacylglycerol. ER: Endoplasmic reticulum. F-actin: Filamentous actin. GPCR: G protein-coupled receptor. GPR40: G protein-coupled receptor 40. GSIS: Glucose-stimulated insulin secretion. IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthine. IP3: Inositol 1,4,5-trisphosphate. PKC: Protein kinase C. PKD: Protein kinase D. PLC: Phospholipase C. WT: Wild-type.

## Introduction

Diabetes is reaching pandemic proportions throughout the world and is expected to affect over 550 million people worldwide in 2030 [1]. The most common form of the disease, type 2 diabetes, occurs when pancreatic beta cells are unable to secrete an adequate amount of insulin to compensate for peripheral insulin resistance [2]. Insulin secretion is regulated chiefly by glucose through intracellular metabolism of the sugar, and is additionally modulated by non-glucose secretagogues such as incretin hormones, fatty acids, and muscarinic stimulation via G protein-coupled receptors (GPCRs) [3]. Since activation of these receptors augments insulin secretion only when glucose levels are elevated, they can be targeted therapeutically to enhance insulin levels with minimal risks of iatrogenic hypoglycaemia. G Protein-coupled Receptor 40 (FFAR1/GPR40) is a GPCR activated by medium- to long-chain fatty acids and predominantly found in pancreatic beta cells [4-6]. Deletion of *Gpr40* markedly reduces the potentiation of glucose-induced insulin secretion (GSIS) by fatty acids both in vivo and in isolated islets [4,7-9]. Conversely, both transgenic overexpression of *Gpr40* in beta cells [10] and administration of GPR40 agonists enhance insulin secretion in rodents [11-13]. Importantly, we [7, 14] and others [15-17] have shown that GPR40 does not mediate the lipotoxic effects of chronically elevated fatty acid levels on pancreatic beta cell function. Collectively, these observations provide a strong rationale for the development of GPR40 agonists for the treatment of type 2 diabetes. Indeed, the recently released results of a phase 2 clinical trial of the agonist compound TAK-875 showed very promising efficacy [18, 19].

Despite recent progress made towards the development of GPR40-based drugs for type 2 diabetes, surprisingly little is known regarding the mechanism of action of the receptor. The insensitivity of GPR40 signalling to pertussis toxin [20] and its sensitivity to pharmacological inhibitors of the G protein subunit  $G_{\alpha q/11}$  and phospholipase C (PLC) [5, 7] suggest that GPR40 is coupled to  $G_{\alpha q/11}$  although coupling via  $G_{\alpha i}$  has also been suggested [20].

G $\alpha$ <sub>q/11</sub> typically signals through PLC-mediated hydrolysis of membrane phospholipids and the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG). Although IP3 levels in islets increase in response to fatty acids in a GPR40-dependent manner [8], the functional importance of endoplasmic reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup> stores remains unclear [21] and, to our knowledge, the contribution of the DAG branch of the pathway to GPR40 signalling has not been tested. In addition, the nature of the signalling kinase(s) activated downstream of GPR40 and which mediate the insulin secretory response to fatty acids remains unknown. As GPR40 agonists are under clinical development to become novel type 2 diabetes drugs, it is critical to better understand the signalling mechanisms of the receptor.

Therefore, the present study was aimed to determine 1) the kinetics of the potentiation of GSIS by fatty acids via GPR40 in isolated mouse islets; 2) the cellular events underlying this effect; and 3) the signalling molecules activated downstream of GPR40 in the beta cell.

## Methods

**Reagents.** RPMI-1640 and FBS were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Adenoviruses encoding IRES-GFP (Ad-GFP) and Cre-IRES-GFP (Ad-Cre) were kindly provided by J. Estall, Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Montreal, QC, Canada. Antibodies against protein kinase D (PKD) (phospho-serine 744/748, phospho-serine 916 and total PKD1) were from Cell Signal (Pickering, ON, Canada). 1,2-Dioctanoyl-glycerol (8:0) was from Enzo Life Science (Brockville, ON, Canada). Oleic acid and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) were from Sigma (St Louis, MO, USA). Rottlerin was from Calbiochem (Gibbstown, NJ, USA).

**Islet isolation and cell culture.** *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice, whole-body protein kinase C  $\delta$  -null (*Prkcd*<sup>-/-</sup>) mice, and mice bearing a protein kinase D1 allele flanked by Lox-P sites (*Prkd1*<sup>flox/flox</sup>) were generated as respectively described [7, 22, 23]. Wild-type (WT) littermates were used as controls. Mouse islets were

isolated by hand-picking after collagenase digestion of the pancreas as described [7], and maintained overnight in RPMI-1640 supplemented with 10% (wt/vol.) FBS, 100 U/mL penicillin-streptomycin, and 11 mmol/L glucose. All procedures were approved by the institutional committee for the protection of animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. The rat insulin-secreting cell line INS832/13 was cultured in RPMI1640 medium supplemented with 11 mmol/L glucose, 10% (wt/vol.) FBS, 10 mmol/L HEPES (pH 7.4), 1 mmol/L sodium pyruvate, and 50  $\mu$ mol/L  $\beta$ -mercaptoethanol.

**Perifusions and static incubations.** Islet perifusions were performed as described [24] with the following modifications: after a 20-min equilibration period with KRB solution containing 0.1% (wt/vol.) BSA and 2.8 mmol/L glucose, islets were perifused for 40 min with 16.7 mmol/L glucose with or without 0.5 mmol/L oleate. Oleate was pre-complexed for 1 h at 37°C with fatty-acid-free BSA to a final molar ratio of 1:5 as described [25]. Control conditions contained the same amount of BSA and vehicle (50% [vol./vol.] ethanol). For static incubations, batches of ten islets each were starved twice in KRB solution containing 0.1% (wt/vol.) BSA and 2.8 mmol/L glucose for 20 min at 37°C, then incubated for 1 h in the presence of various secretagogues as described in Results. Each condition was run in triplicate. Intracellular insulin content was measured after acid-alcohol extraction. Insulin was measured by radioimmunoassay using rat insulin RIA kit (Millipore, Billerica, MA, USA)

**Adenovirus infection.** Mouse islets were infected with adenoviruses after partial dissociation to ensure penetration of the viruses into the islet core. After isolation, the islets were washed twice with 1 mL dissociation buffer (1X Hank's balanced salt solution (HBSS), 20 mmol/L HEPES, 5 mmol/L glucose and 1 mmol/L EGTA), and incubated for 3 min at 37°C with 0.5 mL dissociating buffer. Islets were then infected with  $2 \times 10^7$  plaque/forming units (pfu)/(100 islets) of adenoviruses for 24 h, after which the medium was

replaced with complete medium and cultured for an additional 4 days in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

**Cortical actin staining.** Mouse islets were dispersed into single cells by incubation for 11 min at 37°C in calcium-free buffer followed by gentle trituration with a flame-polished glass pipette, and then the cells were attached overnight to a cover slip. The cells were starved for 1 h in KRB (1mmol/L glucose and 0.1% (wt/vol.) BSA), followed by incubation at indicated conditions. Next, cells were fixed with Z-FIX (Anatech, Battle Creek, MI, USA) and stained for insulin (rabbit anti-insulin primary antibody; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; and Alexa Fluor 594- or Alexa Fluor 350-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody; Invitrogen) and for filamentous actin (F-actin) (Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 565-conjugated phalloidin; Invitrogen). Cells were imaged with a Zeiss Axio Observer.Z1 microscope and x63 Plan ApoChromat objective (1.4 NA). Excitation was with a COLIBRITM (Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada) LED light source with 350, 495 or 555 nm filter set. Insulin-positive cells were used for F-actin intensity measurement.

**Cellular fractionation.** INS832/13 cells were washed with cold PBS 1X and homogenized at 4 °C in buffer A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5/2 mmol/L EDTA. 0.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 µg/mL leupeptin, 0.1 mg/mL aprotinin and 0.33 mol/L sucrose) and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The supernatant fraction was ultracentrifuged at 100,000 g for 30 min at 4°C and the resultant supernatant fraction was retained as the cytosolic fraction. The pellets were washed and resuspended in buffer B (buffer A without sucrose) and homogenized again. The homogenates were solubilized in buffer B with 1% (wt/vol.) Triton X-100. After incubating for 45 min, soluble fractions were obtained by ultracentrifugation at 100,000 g for 30 min and were retained as membrane fractions.

**Western blots.** Protein extracts were separated on 7.5% (wt/vol.) SDS-PAGE, blotted to nitrocellulose membranes, incubated overnight at 4°C with primary antibodies and visualised with horseradish peroxidase-labeled anti-

rabbit or anti-mouse IgG as secondary antibodies. Bands were quantified by ImageJ software.

**Quantitative RT-PCR.** The method for quantitative RT-PCR and list of primers are described in electronic supplementary materials (ESM) methods.

**Statistics.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analysed by one or two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc adjustment for multiple comparisons, or Student's paired *t* test, where appropriate.  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

**Oleate potentiates the second phase of GSIS in isolated mouse islets in large part via GPR40.** Fatty acids are known to potentiate GSIS via both GPR40-dependent and -independent pathways. To determine the kinetics of the potentiation of GSIS by fatty acids and the contribution of GPR40 to phasic insulin release, insulin secretion was measured in perfusion experiments from islets isolated from *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice and WT littermates in response to 16.7 mmol/L glucose in the presence or absence of 0.5 mmol/L oleate (Fig. 1a, b). We observed that GSIS was similar between WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. The addition of oleate greatly potentiated the glucose response in islets from WT mice (AUC:  $1.6 \pm 0.3$  vs.  $0.3 \pm 0.1$  arbitrary units,  $n=4$ ,  $p < 0.001$ ), and essentially restored a large second phase of insulin secretion. Oleate potentiation of GSIS was strongly reduced in islets from *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice (AUC:  $0.7 \pm 0.1$  vs.  $1.6 \pm 0.3$  arbitrary units,  $n=4$ ,  $p < 0.001$ ). These results indicate that oleate potentiates predominantly the second phase of GSIS and that GPR40 mediates more than half of this effect.

**Oleate promotes cortical actin depolymerisation via GPR40.** Potentiation of insulin secretion is associated, if not directly enabled, by reorganisation of the cytoskeleton to promote access of secretory granules to the plasma membrane [26]. Based on the predominant stimulation of second-phase GSIS by fatty acids (Fig. 1a, b), we examined the effects of oleate on cortical

actin depolymerisation. After incubation in 16.7 mmol/L glucose with or without 0.5 mmol/L oleate, single beta cells from WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice were fixed and stained for insulin and F-actin and visualised by epifluorescence microscopy (Fig. 2a, b). Under non-stimulatory conditions, F-actin staining appeared as a ring in close proximity to the plasma membrane (Fig. 2a). As expected, glucose time-dependently induced F-actin depolymerisation (shown in Fig. 2a by the disappearance of the ring-shaped F-actin staining) in both WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> beta cells. Oleate rapidly reduced F-actin intensity in WT beta cells, but was ineffective in *Gpr40*<sup>-/-</sup> beta cells after 5 min of incubation, whereas the depolymerizing agent latrunculin was equally effective in beta cells from both genotypes. After 15 min of incubation with oleate, F-actin intensity was decreased by about 15%, consistent with the observation that oleate retained some ability to potentiate GSIS in the absence of GPR40 (Fig. 1a), an effect likely due to intracellular metabolism of fatty acids [27]. Thus, oleate promotes rapid F-actin depolymerisation in a GPR40-dependent manner.

**DAG mimics the effect of oleate on GSIS independently from GPR40.** To test the involvement of the DAG branch of GPR40 signalling on insulin secretion, we exposed isolated islets from WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice to glucose in the absence or presence of oleate and/or the cell permeable 1,2 dioctanoyl-DAG (100 µmol/L; Fig. 3a, b). In WT islets, exogenous DAG had no effect on insulin secretion at basal glucose concentration but potentiated GSIS to a similar level as oleate. The stimulation of GSIS by DAG was not additive to that of oleate (Fig. 3a). In contrast, the cAMP-raising agent IBMX (100 µmol/L) further potentiated insulin secretion induced by glucose and oleate (Fig. 3c), excluding the possibility that the maximal secretory capacity had been reached with oleate. In *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets oleate did not potentiate GSIS but the effect of DAG was preserved (Fig. 3b). These results are consistent with the possibility that DAG acts as a signalling molecule downstream of GPR40.

**Oleate phosphorylates PKD via GPR40.** PKD is a DAG-sensitive kinase involved in the regulation of insulin secretion in response to the M3-

muscarinic receptor [28, 29]. There are three isoforms of PKD (PKD1-3) encoded by three different genes. Of these, we found PKD1 to be the most abundantly produced at the mRNA level in isolated mouse islets (ESM Fig. 1a). Also, PKD1 protein was readily detected in islets but undetectable in pancreatic exocrine cells (ESM Fig. 1b). In response to  $G_{\alpha q/11}$  stimulation, DAG binding to the C1 domain of PKD1 promotes its translocation to the plasma membrane [30] and its activation by sequential phosphorylation at Ser-744 and Ser-748 in the activation loop and autophosphorylation at Ser-916, which promotes the full catalytic activity of the kinase [31]. We observed that incubation of INS832/13 cells with oleate induced rapid PKD phosphorylation at both Ser-744/748 and Ser-916 with no changes in total PKD1 levels in whole-cell extracts (Fig. 4a). The effect was detected at 5 min, reached a maximum at 20 min, remained stable for 1 h for Ser-744/748, and decreased thereafter for Ser-916 (Fig. 4b, c). Exogenous DAG induced PKD phosphorylation to similar degree as oleate. Cellular fractionation showed that phospho-Ser-744/748 was undetectable in the cytoplasmic fraction but increased in the membrane fraction in response to oleate or DAG (Fig. 4d, f). Interestingly, total PKD1 levels also increased at the membrane in response to oleate or DAG, suggesting translocation of the enzyme.

Phosphorylation of PKD at both Ser-744/748 and Ser-916 in response to oleate was completely abolished in *Gpr40*<sup>-/-</sup> islet (Fig. 4g). In contrast, exogenous DAG was equally effective in WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. Altogether, these data show that oleate activates PKD in a GPR40-dependent manner, and suggest that this effect might be mediated by intracellular DAG.

**PKD1 mediates fatty-acid potentiation of GSIS via GPR40.** We used pharmacological and molecular approaches to assess the functional role of PKD1 in the potentiation of GSIS by oleate in 1-h static incubations in islets. First, the PKD inhibitor rottlerin (10  $\mu$ mol/L, Fig. 5a, inset) completely blocked the potentiating effect of oleate ( $p < 0.001$ ) in WT islets (Fig. 5a). Second, isolated islets from *Prkd1*<sup>flox/flox</sup> mice were infected with Ad-Cre or Ad-GFP as a control. Ad-Cre-infected islets had a ~75% reduction in PKD1 protein levels



(Fig. 5b, inset) and a marked reduction in the potentiation of GSIS by oleate, without significant changes in GSIS (Fig. 5b).

PKC $\delta$  is a DAG-activated isoform of PKC that is also inhibited by rottlerin and has been suggested to phosphorylate PKD at Ser-744/748 [32]. Therefore, we assessed the potential involvement of PKC $\delta$  in GPR40 signalling by measuring insulin secretion in islets from *Prkcd*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5c). We observed that both GSIS and its potentiation by oleate were completely preserved in *Prkcd*<sup>-/-</sup> islets (Fig. 5c). Altogether, these results indicate that PKD1, but not PKC $\delta$ , is required for the potentiation of GSIS by oleate.

**Cortical actin depolymerisation in response to oleate requires PKD1.** To assess the involvement of PKD1 in GPR40-mediated F-actin depolymerisation, single beta cells from *Prkd1*<sup>flox/flox</sup> islets infected with Ad-Cre or Ad-GFP were incubated with 16.7 mmol/L glucose in the presence or absence of oleate for 5 minutes (Fig. 6 a, b). Oleate induced F-actin depolymerisation in Ad-GFP-infected beta cells, but this effect was completely abrogated in Ad-Cre infected beta cells. The effects of glucose and the depolymerising agent latrunculin were unaltered by PKD1 deletion. These results demonstrate that PKD1 is necessary for oleate to promote F-actin depolymerisation.

## Discussion

The aim of this study was to identify the signalling pathway activated downstream of the fatty-acid receptor GPR40 in pancreatic beta cells. We found that oleate potentiates preferentially the second phase of GSIS, largely through GPR40. This effect is associated with rapid and GPR40-dependent F-actin depolymerisation and activation of PKD. Further, pharmacological inhibition or deletion of the gene encoding PKD1, but not PKC $\delta$ , blocks fatty-acid potentiation of GSIS. Finally, deletion of the gene encoding PKD1 blocks the ability of oleate to induce F-actin depolymerisation. These results uniquely

demonstrate that PKD1 is activated downstream of GPR40 and is required for the potentiation of insulin secretion by fatty acids.

Since its deorphanisation as a GPCR activated by medium- to long-chain fatty acids [4-6], GPR40 received considerable attention as potential target for type 2 diabetes therapy. The druggability of GPCRs in general, the relative selectivity of GPR40 expression in beta cells, and the 'incretin-like' effects of long-chain fatty acids, which only stimulate insulin secretion when glucose levels are elevated, all favour the development of GPR40 agonists to enhance insulin secretion in type 2 diabetes without the risk of hypoglycaemia [4,5]. However, because prolonged exposure to elevated levels of fatty acids is detrimental to beta cell function [33], the possibility that chronic stimulation of GPR40 might be deleterious led some groups to propose that GPR40 antagonists - rather than agonists - should be designed for therapeutic purposes [34,35]. Thus, Steneberg et al. [35] reported that *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice are protected from high-fat-diet-induced insulin resistance and glucose intolerance and that transgenic overexpression of GPR40 in beta cells impairs insulin secretion. However, subsequent studies in *Gpr40*<sup>-/-</sup> [14, 16] and transgenic mice [10] or using GPR40 agonists [11-13] all concur to support the agonist approach. In fact, several GPR40 agonists are under clinical development, and one of them showed very promising results in a phase 2 clinical trial [18, 19].

Despite the intense interest in the pharmacology of GPR40 as a therapeutic target, comparatively little is known regarding the biology of the receptor. In this study we first examined the kinetics of fatty-acid effects on GSIS in perfusion experiments. As expected in mouse islets [36], the response to glucose was biphasic: a rapid first phase was followed by a relatively flat second phase. Also in line with previous reports [4, 7], GSIS was similar between WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. Interestingly, oleate potentiated preferentially the second phase of insulin secretion in WT islets, and at least half of this effect was eliminated in *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. This is consistent with our previous observations that the second phase of insulin secretion is reduced

by approximately 50% in *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice both in response to Intralipid [7] and during intravenous glucose tolerance tests following high-fat feeding [14]. Overall, these findings suggest that approximately half of the stimulating effects of fatty acids on insulin secretion is mediated by GPR40, the other half being likely related to their intracellular metabolism [8, 27]. A model to explain the biphasic nature of insulin release induced by nutrients proposes that first-phase secretion is mediated by the release of a readily releasable pool of insulin secretory granules pre-docked at the plasma membrane, whereas the second phase of insulin release involves the transport of insulin granules from an intracellular reserve pool to the plasma membrane [26]. Consistent with this model, intracellular granule transport is associated with remodelling of the actin cytoskeleton, and blockade of F-actin depolymerisation specifically reduces second-phase insulin secretion [37, 38]. Here we observed that fatty acids largely amplified the second phase of GSIS and that this was associated with a rapid and GPR40-dependent depolymerisation of F-actin. This suggests that GPR40 signalling regulates the actin cytoskeleton and, thereby, second-phase insulin secretion. In apparent contradiction with our results, a GPR40 agonist has been reported to potentiate both first- and second-phase insulin release [39]. This discrepancy might be due either to differences between fatty acids and the agonist, or to the fact that in that study the islets were pre-treated with the agonist before the insulin secretion test, which might have 'primed' the pathway.

GPR40 is thought to couple to G<sub>αq/11</sub>, which classically activates PLC [5, 7, 20]. Although the rise in IP3 levels in response to fatty acids does not occur in *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets [8], the functional role of IP3 in the potentiation of insulin secretion by fatty acids remains unclear. In fact, the increase in the level of intracellular calcium in response to fatty acids appears to be due to modulation of ATP-sensitive potassium channel and L-type calcium channel activities rather than to Ca<sup>2+</sup> mobilization from ER stores [21, 40]. Thus, inhibition of the ER calcium ATPase pump that leads to depletion of ER Ca<sup>2+</sup> stores does not prevent the rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> in response to oleic acid

[21]. In addition, inhibition of IP3-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER has no effect on the potentiation of insulin secretion by a GPR40 agonist [41]. Here we showed that exogenous DAG mimicked the potentiating effect of oleate on insulin secretion in both WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets. This is consistent with the possibility that DAG generation in response to GPR40 activation mediates most of the GPR40-dependent effects of fatty acids on insulin secretion, with only a minor contribution (if any) of the IP3 branch of the pathway (Fig. 7).

PKD is a serine/threonine kinase initially described as an atypical protein kinase C (PKC $\mu$ ) but now classified as a subfamily of the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase superfamily [42]. The role of PKD in beta cell function was first demonstrated by Sumara et al. [29], who showed that PKD1 was negatively regulated by the  $\delta$  isoform of p38 mitogen-activated protein kinase and promoted both insulin secretion and beta cell survival. Kong et al. [28] further showed that PKD1 mediates insulin secretion in response to muscarinic stimulation. Here we provide unique evidence that PKD is also activated rapidly, in a GPR40-dependent manner, in response to oleate. Further, pharmacological inhibition or deletion of the gene encoding PKD1 abrogates the potentiation of GSIS by oleate without significantly affecting GSIS itself. These results therefore demonstrate a key role for PKD1 in GPR40 signalling in response to fatty acids.

One question that arises from these findings is: how is PKD1 activated in response to fatty acids? Our observation that exogenous DAG promotes PKD phosphorylation at both Ser-744/748 and Ser-916 suggests the involvement of a  $G_{\alpha q/11}$ -dependent signalling pathway, PLC activation and DAG generation. In aortic smooth muscle cells, PKD is first activated by PKC $\delta$ -mediated trans-phosphorylation at Ser-744/748 [32]. In beta cells, however, our [43,44] and other [45] previous observations that glucose and phorbol ester-stimulated insulin secretion are unaltered by deletion or overexpression of a kinase-negative isoform of PKC $\delta$ , as well as the current results showing normal fatty-acid potentiation of GSIS in *Prkcd*<sup>-/-</sup> islets, suggest that PKC $\delta$  is unlikely involved, in this context, in trans-

phosphorylation of PKD. Alternatively, it is possible that GPR40 signalling activates PKD via  $G_{\alpha q}$ -dependent autophosphorylation [31, 46] or, as shown for M3-muscarinic receptor stimulation of insulin release, by G-protein-independent,  $\beta$ -arrestin-dependent activation [28]. However, since exogenous DAG mimics the effect of oleate on PKD activation and insulin secretion, and since inhibition of  $G_{\alpha q/11}$  inhibits fatty-acid potentiation of GSIS [7], it is likely that GPR40 signalling involves a  $G_{\alpha q/11}$ -dependent pathway rather than a G-protein independent mechanism.

A second question arising from our results is: how does PKD1 promote second-phase insulin secretion in response to fatty acids? In this regard, our finding that deletion of the gene encoding PKD1 in islets prevents oleate-induced F-actin depolymerisation is consistent with the observation that PKD phosphorylates several proteins that regulate F-actin remodelling in other cell types and control insulin secretion in beta cells, such as the small GTPase RhoA [47, 48] or p21-activated kinase [37, 49], although the nature of PKD1 targets in this particular context remains to be identified.

In conclusion, our findings are consistent with the model depicted in Fig. 7 by which fatty-acid stimulation of GPR40, coupled to  $G_{\alpha q/11}$ , results in the generation of DAG via PLC-mediated hydrolysis of membrane phospholipids, activation of PKD1, F-actin depolymerisation, and potentiation of second-phase GSIS. These observations provide valuable mechanistic information as GPR40 is being considered as a target for type 2 diabetes therapy and several GPR40 agonists are in the advanced phase of clinical development.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP 86545 to V. Poitout) and the Canadian Diabetes Association (to P. E. MacDonald). M. Ferdaoussi is supported by fellowships from Diabète Québec and the CRCHUM. V. Poitout holds the Canada Research Chair (CRC) in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. M. Prentki holds the CRC in Diabetes and Metabolism. P. E.

MacDonald holds the CRC in Islet Biology and a scholarship from Alberta Innovates – Health Solutions (AI-HS). J. Kolic is supported by doctoral studentships from AI-HS and the CIHR. We thank: M. Ethier (CRCHUM) and G. Fergusson (CRCHUM) for valuable technical assistance; A. Smith (University of Alberta) for assistance with image analysis; D. C. Lin and H. Baribault (Amgen) for providing *Gpr40*<sup>-/-</sup> breeders and M. Leitges (Biotechnology Centre of Oslo, Oslo, Norway) for providing *Pkcδ*<sup>-/-</sup> mice.

**Duality of interest:** V. Poitout has served as a consultant to Takeda and Merck Research Laboratories in the past 12 months. All other authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

**Author Contributions:** MF and VP designed research and wrote the paper. All authors contributed to acquisition, analysis and interpretation of data, revised the manuscript and approved the final version.

## References

1. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J (2011) IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 94: 311-321
2. Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802-1812
3. Newsholme P, Gaudel C, McClenaghan NH (2010) Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. *Adv Exp Med Biol* 654: 91-114
4. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422: 173-176
5. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, et al (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278: 11303-11311
6. Kotarsky K, Nilsson NE, Olde B, Owman C (2003) Progress in methodology. Improved reporter gene assays used to identify ligands acting on orphan seven-transmembrane receptors. *Pharmacol Toxicol* 93: 249-258
7. Latour MG, Alquier T, Oseid E, et al (2007) GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 56: 1087-1094
8. Alquier T, Peyot ML, Latour MG, et al (2009) Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* 58: 2607-2615
9. Schmidt J, Liebscher K, Merten N, et al (2011) Conjugated linoleic acids mediate insulin release through islet G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. *J Biol Chem* 286: 11890-11894
10. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, et al (2009) Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes* 58: 1067-1076

11. Doshi LS, Brahma MK, Sayyed SG, et al (2009) Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. *Metabolism* 58: 333-343
12. Lin DC, Zhang J, Zhuang R, et al (2011) AMG 837: A Novel GPR40/FFA1 Agonist that Enhances Insulin Secretion and Lowers Glucose Levels in Rodents. *PLoS One* 6: e27270
13. Tsujihata Y, Ito R, Suzuki M, et al (2011) TAK-875, an Orally Available G Protein-Coupled Receptor 40/Free Fatty Acid Receptor 1 Agonist, Enhances Glucose-Dependent Insulin Secretion and Improves Both Postprandial and Fasting Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 339: 228-237
14. Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V (2008) The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes* 57: 2432-2437
15. Tan CP, Feng Y, Zhou YP, et al (2008) Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes* 57: 2211-2219
16. Lan H, Hoos LM, Liu L, et al (2008) Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes* 57: 2999-3006
17. Wu P, Yang L, Shen X (2010) The relationship between GPR40 and lipotoxicity of the pancreatic beta-cells as well as the effect of pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun* 403: 36-39
18. Araki T, Hirayama M, Hiroi S, Kaku K (2012) GPR40-induced insulin secretion by the novel agonist TAK-875: first clinical findings in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 14: 271-278
19. Burant CF, Viswanathan P, Marcinak J, et al (2012) TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 379: 1403-1411



20. Schroder R, Janssen N, Schmidt J, et al (2010) Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat Biotechnol* 28: 943-949
21. Fujiwara K, Maekawa F, Yada T (2005) Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E670-E677
22. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, et al (2008) Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3059-3063
23. Leitges M, Mayr M, Braun U, et al (2001) Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase Cdelta-null mice. *J Clin Invest* 108: 1505-1512
24. Fontes G, Zarrouki B, Hagman DK, et al (2010) Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 53: 2369-2379
25. Briaud I, Harmon JS, Kelpe CL, Segu VB, Poitout V (2001) Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 50: 315-321
26. Wang Z, Thurmond DC (2009) Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* 122: 893-903
27. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, et al (2004) A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53: 1007-1019
28. Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P, et al (2010) M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21181-21186

29. Sumara G, Formentini I, Collins S, et al (2009) Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136: 235-248
30. Rey O, Young SH, Cantrell D, Rozengurt E (2001) Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. *J Biol Chem* 276: 32616-32626
31. Rybin VO, Guo J, Steinberg SF (2009) Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916. *J Biol Chem* 284: 2332-2343
32. Tan M, Xu X, Ohba M, Ogawa W, Cui MZ (2003) Thrombin rapidly induces protein kinase D phosphorylation, and protein kinase C delta mediates the activation. *J Biol Chem* 278: 2824-2828
33. Poitout V, Robertson RP (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29: 351-366
34. Brownlie R, Mayers RM, Pierce JA, Marley AE, Smith DM (2008) The long-chain fatty acid receptor, GPR40, and glucolipotoxicity: investigations using GPR40-knockout mice. *Biochem Soc Trans* 36: 950-954
35. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 1: 245-258
36. Zawalich WS, Yamazaki H, Zawalich KC (2008) Biphasic insulin secretion from freshly isolated or cultured, perfused rodent islets: comparative studies with rats and mice. *Metabolism* 57: 30-39
37. Wang Z, Oh E, Clapp DW, Chernoff J, Thurmond DC (2011) Inhibition or ablation of p21-activated kinase (PAK1) disrupts glucose homeostatic mechanisms in vivo. *J Biol Chem* 286: 41359-41367
38. Wang Z, Oh E, Thurmond DC (2007) Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *J Biol Chem* 282: 9536-9546
39. Yashiro H, Tsujihata Y, Takeuchi K, Hazama M, Johnson PR, Rorsman P (2012) The effects of TAK-875, a selective G protein-coupled receptor

- 40/free fatty acid 1 agonist, on insulin and glucagon secretion in isolated rat and human islets. *J Pharmacol Exp Ther* 340: 483-489
40. Zhao YF, Pei J, Chen C (2008) Activation of ATP-sensitive potassium channels in rat pancreatic beta-cells by linoleic acid through both intracellular metabolites and membrane receptor signalling pathway. *J Endocrinol* 198: 533-540
41. Ullrich S, Pfeleiderer M, Liebscher K, Katja F, Drews G, Christiansen E, Häring H, Ulven T (2011) Effects of Small FFA1 Receptor Agonists in Insulin Secreting Cells. *Diabetes* 60 [Suppl 1]: 2023P (Abstract)
42. Wang QJ (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 27: 317-323
43. Cantley J, Boslem E, Laybutt DR, et al (2010) Deletion of protein kinase Cdelta in mice modulates stability of inflammatory genes and protects against cytokine-stimulated beta cell death in vitro and in vivo. *Diabetologia* 54: 380-389
44. Carpenter L, Mitchell CJ, Xu ZZ, Poronnik P, Both GW, Biden TJ (2004) PKC alpha is activated but not required during glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets. *Diabetes* 53: 53-60
45. Hennige AM, Ranta F, Heinzelmann I, et al (2010) Overexpression of kinase-negative protein kinase Cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 59: 119-127
46. Waldron RT, Innamorati G, Torres-Marquez ME, Sinnott-Smith J, Rozengurt E (2012) Differential PKC-dependent and -independent PKD activation by G protein alpha subunits of the Gq family: selective stimulation of PKD Ser autophosphorylation by Galphaq. *Cell Signal* 24: 914-921
47. Pusapati GV, Eiseler T, Rykx A, et al (2012) Protein kinase D regulates RhoA activity via rhotekin phosphorylation. *J Biol Chem* 287: 9473-9483
48. Tomas A, Yermen B, Regazzi R, Pessin JE, Halban PA (2010) Regulation of insulin secretion by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Traffic* 11: 123-137

49. Spratley SJ, Bastea LI, Doppler H, Mizuno K, Storz P (2011) Protein Kinase D Regulates Cofilin Activity through p21-activated Kinase 4. *J Biol Chem* 286: 34254-34261

## Figure Legends

**Figure 1. Oleate potentiates the second phase of GSIS largely via GPR40.** (a) Insulin secretion in response to 2.8 mmol/L glucose from -10 to 0 min (all groups), 16.7 mmol/L glucose (black and green lines) or 16.7 mmol/L glucose +0.5 mmol/L oleate (blue and red lines) from 0 to 40 min, and 2.8 mmol/L glucose from 40 to 70 min (all groups) in WT (black and red) or *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets (green and blue lines) in perfusion experiments. (b) Calculation of the area under the curve from 0 to 10 minutes (white bars), from 10 to 40 minutes (hatched bars), and from 0 to 40 minutes (black bars). Results are mean ± SEM of four independent experiments. G, glucose; OL, oleate. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001 compared with the 16.7 G condition for each genotype, † *p*<0.001 compared with the respective condition in WT

**Figure 2. Oleate induces cortical F-actin depolymerisation.** (a) Representative images for F-actin staining (green) for each incubation condition with intensity line scans for F-actin staining intensity. Dashed lines represent the F-actin intensity means for 2.8 mmol/L glucose (2.8 G) condition. Beta cells were identified by insulin staining (red). (b) Mean ± SEM of F-actin intensities from 40-62 cells from three WT (white bars) or *Gpr40*<sup>-/-</sup> (black bars) mice. a.u., arbitrary units; G, glucose; Latr, Latrunculin; OL, oleate. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001 compared with the 2.8 G condition for each genotype, † *p*<0.001 compared with the respective condition in WT

**Figure 3. Exogenous DAG potentiates GSIS in islets from WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> mice.** (a, b) Insulin secretion from WT (a) and *Gpr40*<sup>-/-</sup> (b) islets was assessed in 1 h static incubations in the presence of 2.8 mmol/L glucose (white bars), 16.7 mmol/L glucose (hatched bars) or 16.7 mmol/L glucose +0.5 mmol/L oleate (black bars) ±0.1 mmol/L 1,2-dioctanoyl-DAG. (c) Insulin secretion from WT islets was assessed in the presence of 2.8 mmol/L glucose (white bars), 16.7 mmol/L glucose (hatched bars) or 16.7 mmol/L glucose +0.5 mmol/L oleate (black bars) ±0.1 mmol/L IBMX. Data are mean ± SEM of three independent experiments. ns, not significant; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and

\*\*\* $p < 0.001$  compared with the 16.7 mmol/L glucose (16.7 G) condition for each genotype

**Figure 4. Oleate phosphorylates PKD1 in a GPR40-dependent manner.**

(a) Representative immunoblots of phospho-Ser-744/748 (S744/748) PKD, phospho-Ser-916 (S916) PKD, and total PKD1 in protein extracts of INS832/13 cells exposed at indicated time to 16.7 mmol/L glucose  $\pm$  0.5 mmol/L oleate or 0.1 mmol/L 1,2 dioctanoyl-DAG. The arrow shows S916 PKD based on the expected molecular mass. (b, c) Quantitative measurements of phospho-Ser-744/748 PKD (b) and phospho-Ser-916 PKD (c) in INS832/13 cells. (d) Representative immunoblots of phospho-S744/748 PKD and total PKD1 in cytosolic and membrane fractions of INS832/13 cells exposed to 16.7 mmol/L glucose  $\pm$  0.5 mmol/L oleate (OL) or 0.1 mmol/L 1,2 dioctanoyl-DAG. Immunoblots of P38 and IGF1R were used as cytosolic and membrane markers, respectively. (e, f) Quantitative measurements of phospho-S744/748 PKD (e) and total PKD1 (f) in cytosolic fractions. (g) Representative immunoblots of S744/748 PKD, S916 PKD and total PKD1 in WT and *Gpr40*<sup>-/-</sup> islets exposed for 30 minutes to 16.7 mmol/L glucose  $\pm$  0.5 mmol/L oleate or 0.1 mmol/L 1,2 dioctanoyl-DAG. Data are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with time 0

**Figure 5. PKD1 mediates the potentiation of GSIS by oleate.**

(a) WT islets were preincubated with 10  $\mu$ mol/L rottlerin for 40 minutes, and insulin secretion was assessed in 1-h static incubation in the presence of 2.8 mmol/L glucose (white bars), 16.7 mmol/L glucose (hatched bars) or 16.7 mmol/L glucose + 0.5 mmol/L oleate (OL; black bars)  $\pm$  10  $\mu$ mol/L rottlerin. Inset: Representative immunoblot of S916 PKD  $\pm$  rottlerin. (b) Insulin secretion from Ad-GFP or Ad-Cre-infected *Prkd1*<sup>flox/flox</sup> islets was assessed in 1-h static incubations in the presence of 2.8 mmol/L glucose (white bars), 16.7 mmol/L glucose (hatched bars) or 16.7 mmol/L glucose + 0.5 mmol/L oleate (black bars). Inset: Representative immunoblots of deletion efficiency. (c) Insulin secretion from WT and *Prkcd*<sup>-/-</sup> islets was assessed in 1-h static incubations

in the presence of 2.8 mmol/L glucose (white bars), 16.7 mmol/L glucose (hatched bars) or 16.7 mmol/L glucose + 0.5 mmol/L oleate (black bars). Data are mean  $\pm$  SEM of three or four independent experiments  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$  compared with the 16.7 mmol/L glucose (16.7 G) condition for each genotype

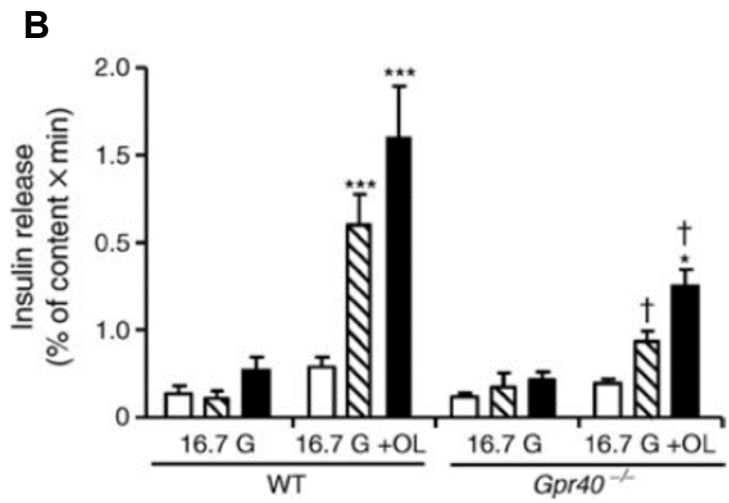
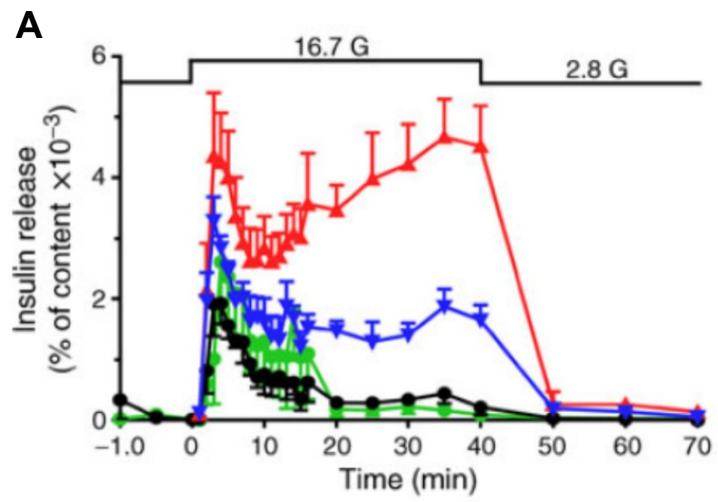
**Figure 6. PKD1 is necessary for oleate-mediated F-actin depolymerisation.** (a) Representative images for F-actin staining (red) for each incubation condition with intensity line scans for F-actin staining intensity. Dashed lines represent the F-actin intensity means for the 2.8 G condition. Beta cells were identified by insulin staining (blue). (b) Mean  $\pm$  SEM F-actin intensities from 20-35 cells from three mice of Ad-GFP (white bars)- or Ad-Cre (black bars)-infected *Prkd1<sup>flox/flox</sup>* islets. a.u., arbitrary units; Latr, Latrunculin.  $***p < 0.001$  compared with the 2.8 mmol/L glucose (2.8 G) condition for each condition, †  $p < 0.001$  compared with the respective condition in Ad-GFP

**Figure 7. A model for GPR40-dependent potentiation of GSIS by fatty acids (FA).**

**Supplementary Figure 1: Expression of PKD isoforms in islets.** (A) Measurement of PKD1, PKD2 and PKD3 mRNA levels in isolated WT mice islets by RT-PCR and normalized to  $\beta$ -actin. Data are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.  $***P < 0.001$  compared with PKD1. (B) Immunoblot analysis of PKD1 protein expression in isolated islets and pancreatic exocrine cells from WT mice

**Supplemental Methods :** Quantitative RT-PCR. RNA was extracted from aliquots of 150 islets each and RT-PCR was carried out using the following primers: PKD1: forward, 5'-GTGCAGAGATGCAAGATCCA-3'; reverse, 5'-TCATCACAGTGCTGCTCCTC-3'; PKD2: forward, 5'-TCATTGACAACTGCGCTTC-3'; reverse, 5'-TGCACCTCGAGGTTTACAATC-3'; PKD3: forward, 5'-CACAGCGTTTATGGCAGTTG-3'; reverse, 5'-AATGTGCAGGGTCAAAGTCC-3'.T mice.

Figure 1





**Figure 2**

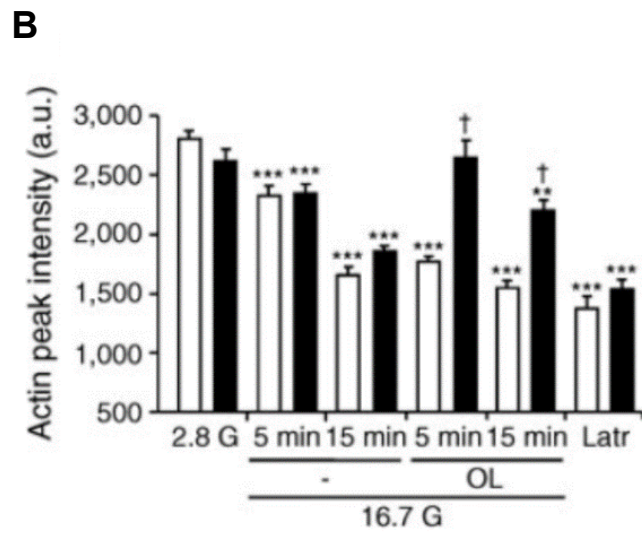
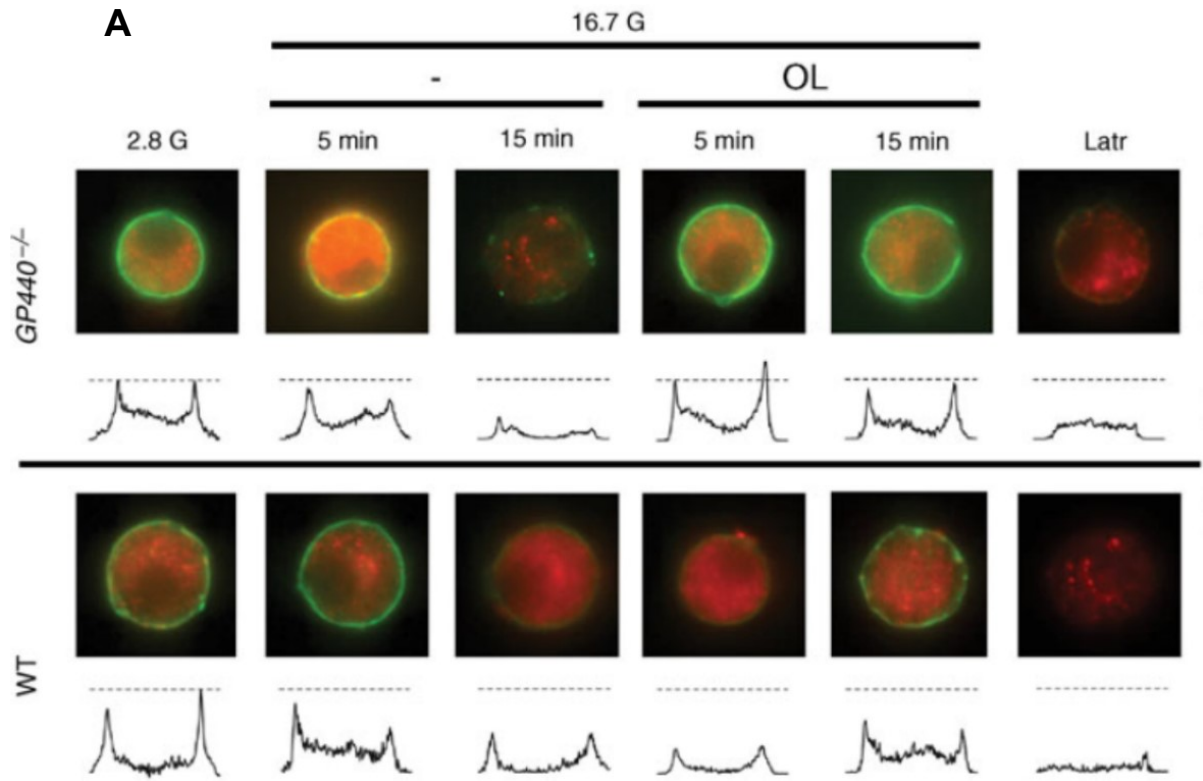
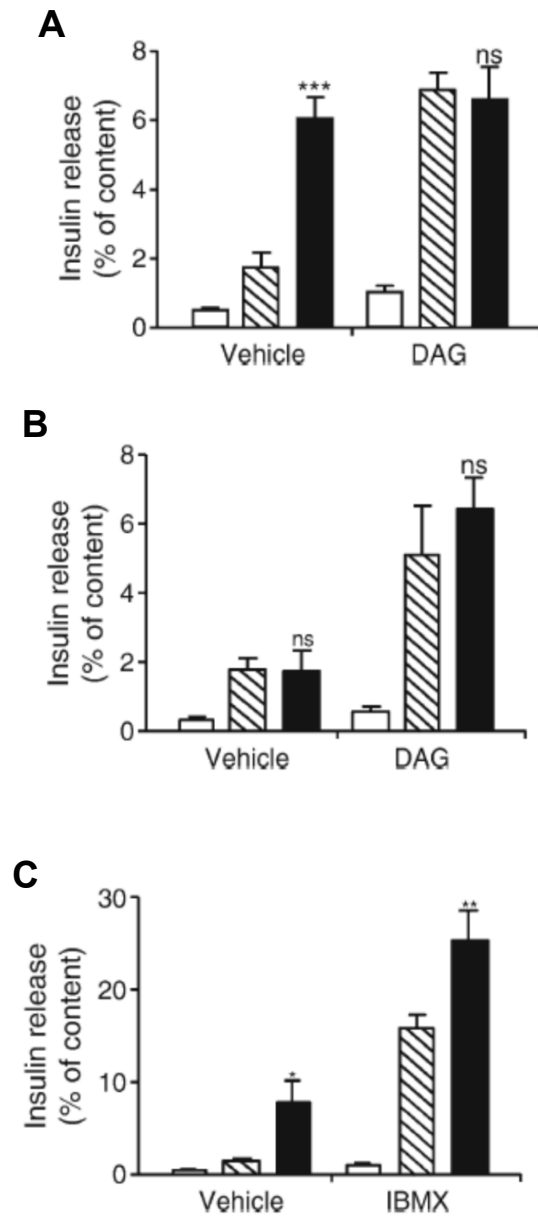


Figure 3



**Figure 4**

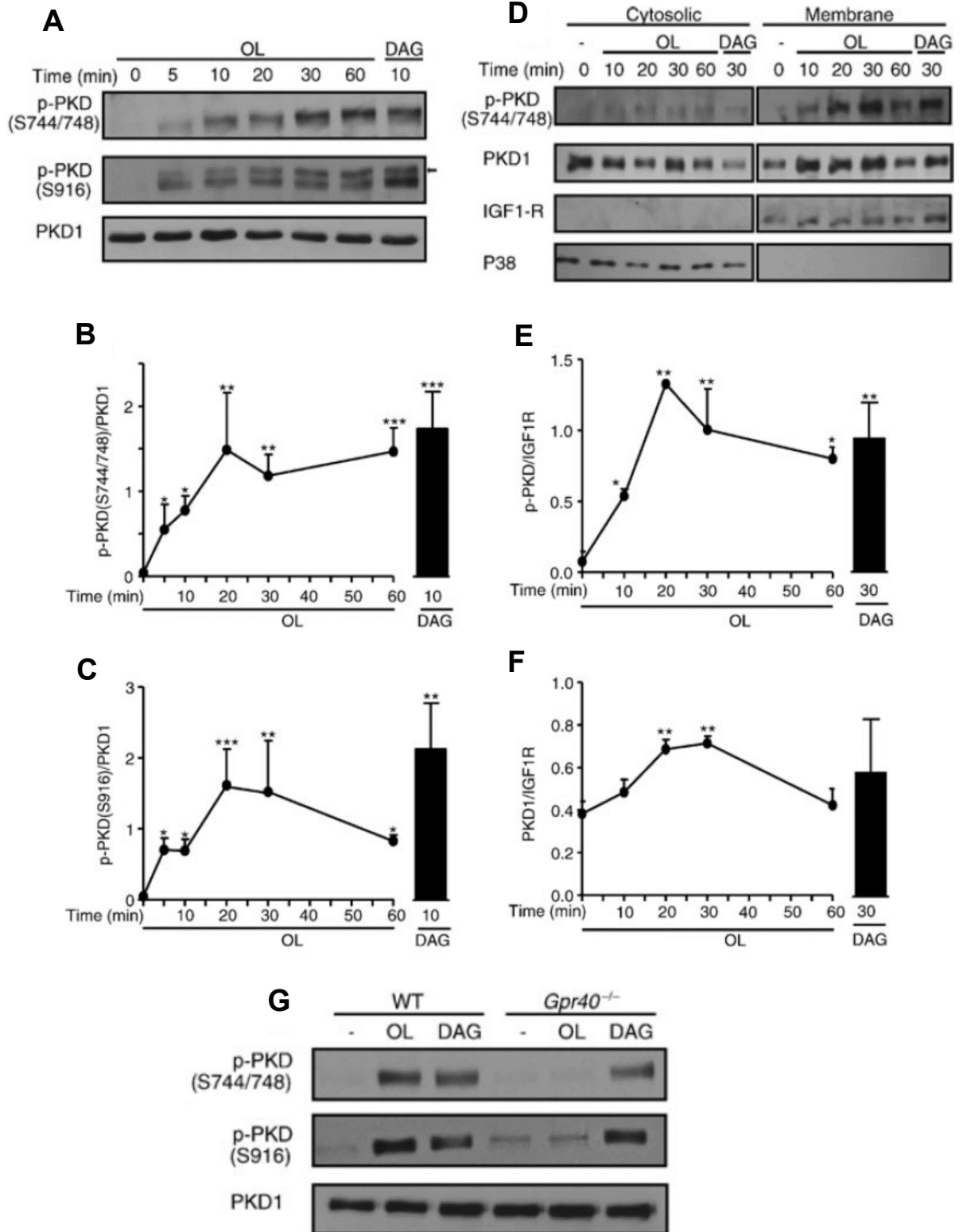


Figure 5

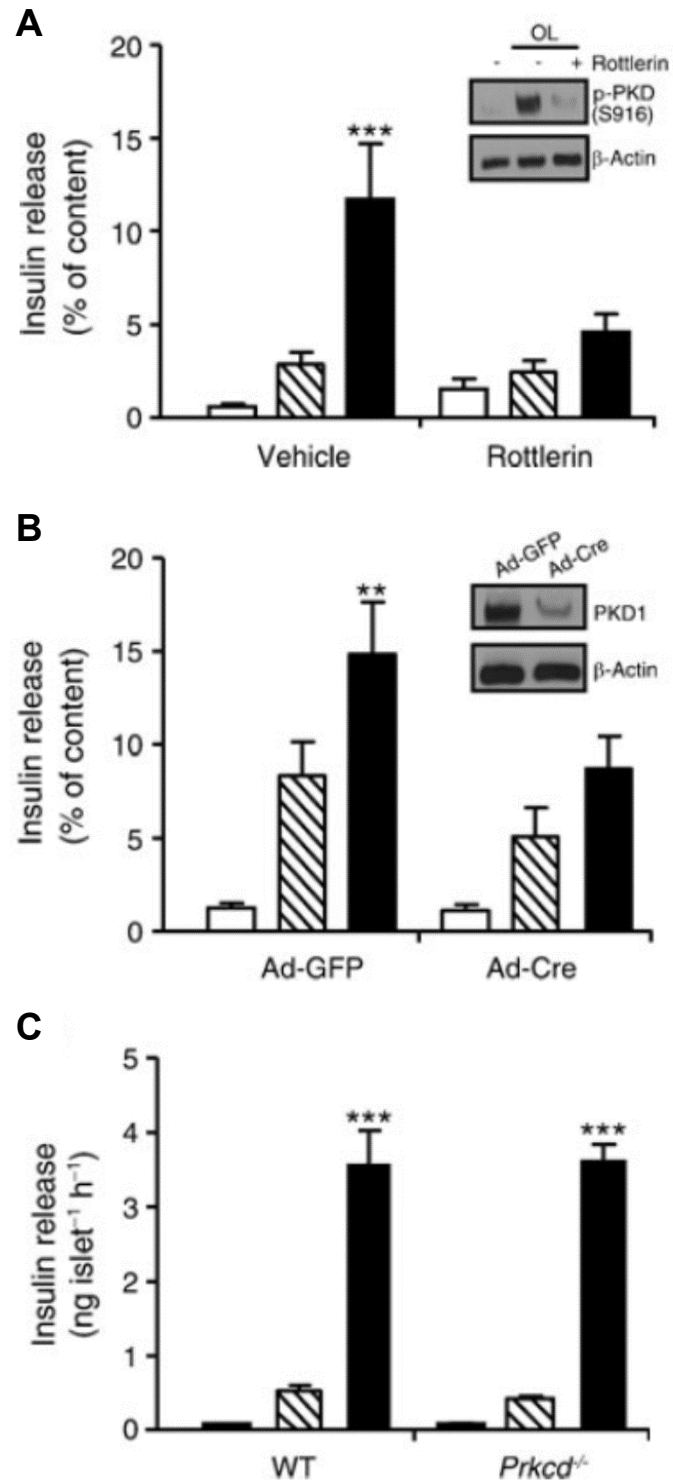
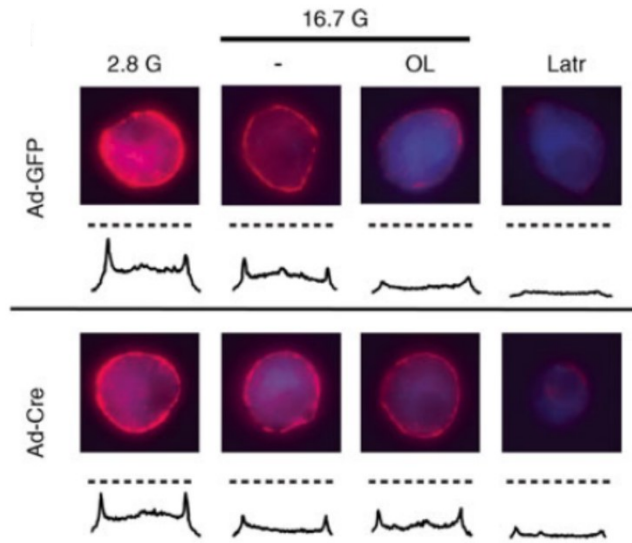


Figure 6

**A**



**B**

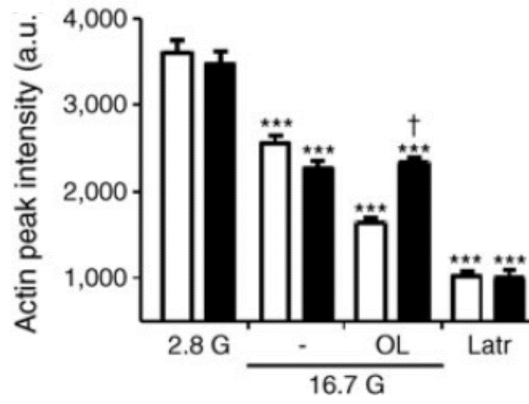
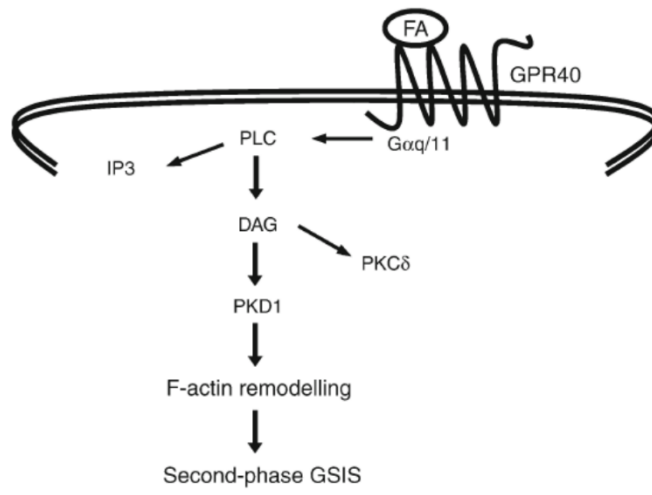
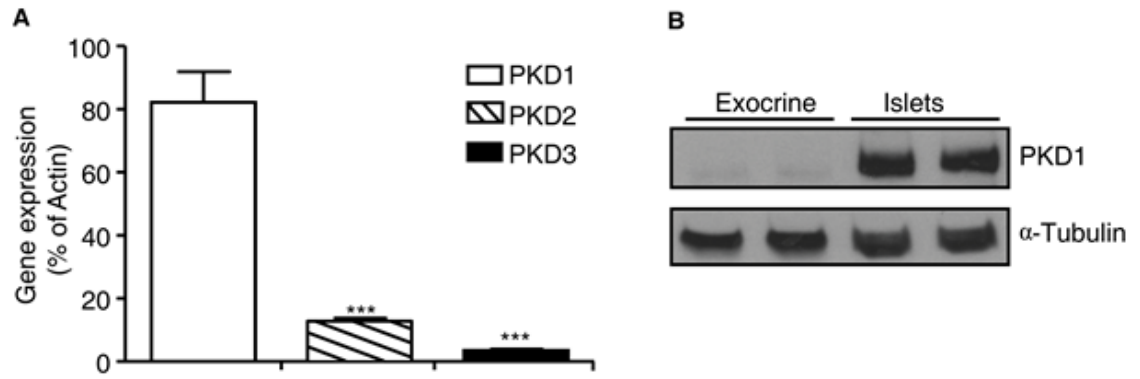


Figure 7



## Supplementary Figure 1

Figure S1



## **Discussion de l'article 1**

### **Rappel des résultats**

Dans ce premier article publié, nous avons observé que l'oléate potentialise les deux phases de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Nous avons aussi constaté que la présence du récepteur GPR40 est nécessaire pour obtenir une potentialisation significative de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline en réponse à l'oléate. Nous avons aussi observé que l'oléate potentialise la dépolymérisation des filaments d'actines corticaux induite par le glucose dans les îlots de Langerhans de souris, et ce seulement en présence du récepteur GPR40 et de la protéine PKD1. De plus, nous avons déterminé que PKD1 est phosphorylée en réponse à l'oléate dans les îlots de Langerhans seulement en présence du récepteur GPR40. Les résultats des expériences de fractionnement cellulaire ont permis de démontrer que la phosphorylation de PKD1 en réponse à l'oléate ou le DAG se traduit en un déplacement de PKD1 du cytosol à la membrane dans la lignée cellulaire pancréatique INS832/13. Nous avons aussi démontré que le DAG peut restaurer la potentialisation de la sécrétion d'insuline et la phosphorylation de PKD1 dans les îlots GPR40KO.

### **Interprétation des résultats**

Nous avons confirmé dans cette étude que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose des îlots GPR40KO est identique à celle des îlots sauvages (89). La sécrétion d'insuline induite par le glucose se produit en deux phases ; une première phase rapide et élevée suivie d'une deuxième phase moins élevée et beaucoup plus longue. Nous avons observé pour la première fois que les deux phases de la sécrétion d'insuline sont plus élevées lorsque l'oléate est ajouté au milieu de périfusion des îlots sauvages. L'aire sous la courbe de la deuxième phase de sécrétion d'insuline augmente ainsi de façon significative en réponse à l'oléate comparativement à la réponse avec le glucose seul. Cette potentialisation de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline est cependant réduite de 50% dans les îlots GPR40KO



en réponse à l'oléate. Cette observation corrèle avec la sécrétion d'insuline chez les souris GPR40KO en réponse à une infusion composée à 20% d'acides gras insaturés provenant d'huile de soja (89). La voie de signalisation du récepteur GPR40 cible donc des molécules effectrices impliquées dans la deuxième phase de la sécrétion d'insuline afin de potentialiser la sécrétion d'insuline.

Il est généralement accepté que la première phase de sécrétion d'insuline résulte de la fusion de granules d'insuline déjà ancrés à la membrane (*ready releasable pool* (RRP)) alors que la deuxième phase de sécrétion d'insuline résulte de la fusion de granules récemment recrutés à la membrane (254, 255). Le transport de granules d'insuline du cytosol à la membrane implique plusieurs composantes du cytosquelette, et une dépolymérisation des filaments d'actines corticaux est essentielle à une deuxième phase de sécrétion d'insuline normale (60, 62). Dans notre étude, la dépolymérisation des filaments d'actine en réponse au glucose n'est pas altérée dans les cellules bêta pancréatiques d'îlots GPR40KO. Les filaments d'actines corticaux sont cependant beaucoup plus dépolymérisés en réponse à l'oléate qu'en réponse au glucose seul dans les cellules bêta pancréatiques d'îlots sauvages comparativement aux îlots GPR40KO. Il est donc probable que la voie de signalisation de GPR40 potentialise la deuxième phase de la sécrétion d'insuline en ciblant des molécules impliquées dans le remodelage des filaments d'actine corticaux.

Le récepteur GPR40 peut activer la protéine Gq et ainsi augmenter l'activité de la PLC et la production de DAG. Afin d'estimer le potentiel de DAG comme second messager dans la voie de signalisation du récepteur GPR40, la sécrétion d'insuline d'îlots GPR40KO en réponse au DAG a été mesurée. Nous avons observé dans cette étude que le DAG peut potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les îlots GPR40KO et la quantité d'insuline sécrétée est semblable à celle sécrétée en réponse à l'oléate dans les îlots sauvages. D'autre part, l'ajout de DAG n'amplifie pas la potentialisation de la sécrétion d'insuline par l'oléate. À titre

comparatif, l'IBMX qui augmente l'AMP cyclique amplifie la potentialisation de la sécrétion d'insuline par l'oléate. Ces observations suggèrent que le DAG et l'oléate emploient les mêmes mécanismes pour potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Comme le DAG potentialise la sécrétion d'insuline en empruntant des mécanismes similaires à l'oléate dans les îlots sauvages et restaure la potentialisation de la sécrétion d'insuline dans les îlots GPR40KO, le DAG pourrait être le second messenger principal en aval du récepteur GPR40.

PKD1 est activée à des sites riches en DAG (209) et sa phosphorylation est associée à son activation (205, 207). Il est donc intéressant de constater que le DAG et l'oléate peuvent induire la phosphorylation de PKD1 sur deux sérines différentes dans les îlots sauvages. Dans les îlots GPR40KO cependant, seul le DAG peut induire la phosphorylation de PKD1. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de PKD1 en réponse à l'oléate découle du second messenger DAG dans la voie de signalisation de GPR40.

PKD1 est impliquée dans le remodelage des filaments d'actine dans plusieurs modèles cellulaires (216, 217). Comme l'activation de GPR40 résulte en un remodelage des filaments d'actine corticaux importants, il est probable que PKD1 soit une des molécules responsables de ce remodelage des filaments d'actine en aval du récepteur GPR40. D'une part, le déplacement de PKD1 du cytosol vers la membrane en réponse à l'oléate observé dans notre étude suggère une interaction directe de PKD1 avec des molécules impliquées dans le remodelage des filaments d'actine. D'autre part, les filaments d'actines corticaux sont moins dépolymérisés en réponse à l'oléate dans les cellules bêta d'îlots déficients pour PKD1. La sécrétion d'insuline en réponse à l'oléate est aussi moins importante dans les îlots déficients pour PKD1. Le remodelage des filaments d'actine qui résulte de l'activation de PKD1 semble donc jouer un rôle important pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline découlant de l'activation de GPR40. Nos résultats suggèrent donc que PKD1 est une molécule effectrice de la

voie de signalisation du récepteur GPR40 et qu'elle est essentielle pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.

### **Forces de l'étude**

Bien que l'importance du récepteur GPR40 dans la sécrétion d'insuline ait été explorée précédemment (89), notre étude est la première à étudier le rôle du cytosquelette et le profil de sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans GPR40KO en réponse aux acides gras. Notre étude est ainsi la première à démontrer que l'activation du récepteur GPR40 potentialise considérablement la deuxième phase de sécrétion d'insuline et le remodelage des filaments d'actine corticaux. Notre étude est aussi la première qui démontre le rôle essentiel de PKD1 dans la potentialisation par les acides gras de la sécrétion d'insuline et de la dépolymérisation des filaments d'actines corticaux.

Outre les résultats concernant la voie de signalisation du récepteur GPR40, les conclusions de cette étude sont appuyées par une variété d'approches techniques. La sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans GPR40KO a été étudiée par incubation statique et par périfusion. Afin d'évaluer l'importance de PKD1 dans la sécrétion d'insuline, la sécrétion d'insuline a été mesurée en présence d'un inhibiteur pharmacologique de PKD1 et à la suite de son invalidation génique. De plus, l'activation de PKD1 en réponse aux acides gras a été étudiée en mesurant sa phosphorylation sur deux sérines différentes et en mesurant sa translocation du cytosol à la membrane. Ainsi, dans cette étude nous avons utilisé plusieurs approches complémentaires pour appuyer nos conclusions.

### **Limites de l'étude**

Néanmoins, quelques conclusions résultent d'observations indirectes. Nous assumons dans cette étude que l'activation de PKD1 en aval du DAG est responsable de la dépolymérisation des filaments d'actine et de la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse à l'oléate. Il aurait donc été intéressant d'étudier la sécrétion d'insuline et la dépolymérisation des filaments d'actine suivant l'ajout du DAG dans les îlots de Langerhans

GPR40KO et dans les îlots déficients pour PKD1. Selon les conclusions de cette étude, DAG aurait provoqué la dépolymérisation des filaments d'actine dans les îlots GPR40KO, mais non pas dans les îlots déficients pour PKD1. L'absence d'une potentialisation de la sécrétion d'insuline par DAG dans les îlots déficients pour PKD1 aurait confirmé de manière convaincante que DAG restaure la potentialisation de la sécrétion d'insuline dans les îlots GPR40KO en activant PKD1.

Dans cette étude, nous avons démontré que PKD1 joue un rôle dans le remodelage des filaments d'actine corticaux dans les cellules bêta pancréatiques. En effet, nous avons remarqué une diminution du remodelage des filaments d'actine en réponse à l'oléate dans les îlots déficients pour PKD1. De plus, nous avons observé une translocation de PKD1 vers la membrane dans les cellules bêta pancréatiques en réponse à l'oléate. Il aurait donc été intéressant d'effectuer des marquages par immunohistochimie pour PKD1 et l'actine dans des sections d'îlots sauvages fixés à la suite d'une stimulation avec l'oléate. Cette expérience aurait permis de déterminer si PKD1 interagit directement avec les filaments d'actine.

### **Travaux futurs**

L'étape suivante consiste à identifier les molécules effectrices en aval du second messager DAG et de PKD1 qui permettent aux acides gras de potentialiser la sécrétion d'insuline lorsqu'ils interagissent avec le récepteur GPR40 (article 2). Il sera aussi intéressant d'étudier le rôle de PKD1 dans la sécrétion d'insuline en réponse aux acides gras in vivo (article 3).

### **Conclusions**

Notre étude a permis d'identifier que le récepteur GPR40 potentialise de manière significative la deuxième phase de la sécrétion d'insuline en favorisant le remodelage des filaments d'actine. Notre étude a aussi identifié PKD1 comme étant une molécule effectrice importante de la voie de signalisation du récepteur GPR40. En effet, nos résultats démontrent que PKD1 est nécessaire pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline et le

remodelage des filaments d'actine en réponse aux acides gras. Ce premier article établit ainsi la direction des prochains articles décrits dans cette thèse ; soit l'étude d'une cible potentielle de PKD1 dans la sécrétion d'insuline et l'importance de PKD1 pour la sécrétion d'insuline lorsque les souris sont nourries une diète riche en lipides.

## Article 2

**Titre : The P21-activated kinase PAK4 is implicated in fatty-acid potentiation of insulin secretion downstream of free fatty acid receptor 1**

**Auteurs :** Bergeron V, Ghislain J, Poitout V

**Article publié dans :** Islets. 2016. 8 (6):157-164 (DOI:10.1080/19382014.2016.1243191)

Contributions des auteurs :

**Bergeron V :** Auteure principale ayant élaboré les hypothèses, effectué la majorité des expériences, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

**Ghislain J :** Coauteur ayant participé à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

**Poitout V :** Investigateur principal ayant dirigé et supervisé l'ensemble de ce projet de l'élaboration de l'hypothèse à la rédaction du manuscrit.

## Mise en contexte de l'article 2

Lors de l'étude de la voie de signalisation du récepteur GPR40 dans le premier article de cette thèse, nous avons identifié PKD1 comme étant une molécule effectrice nécessaire à la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras. Nous avons aussi observé que PKD1 est nécessaire à la dépolymérisation des filaments d'actine en réponse aux acides gras. La prochaine molécule effectrice en aval de la voie de signalisation de GPR40 est donc probablement une molécule qui peut être phosphorylée par PKD1 et peut interagir avec les filaments d'actine. PAK4 possède ces caractéristiques (219, 248, 253).

Dans ce deuxième article publié dans le journal *Islets*, nous avons tout d'abord étudié la phosphorylation de PAK4 en réponse à l'oléate dans les îlots de Langerhans humains. Nous avons ensuite étudié la phosphorylation de PAK4 dans la lignée cellulaire INS832/13. Nous avons confirmé que la phosphorylation observée correspond à la phosphorylation de PAK4 dans des cellules INS832/13 transfectées par électroporation avec des ARN qui interfèrent avec l'expression des PAKs du groupe 2. L'expression des PAKs a été mesurée par technique de réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Q-PCR). Nous avons ensuite étudié la phosphorylation de PAK4 en réponse au glucose et en réponse à l'oléate dans les îlots de Langerhans de souris sauvages et GPR40KO. Finalement, nous avons étudié la sécrétion d'insuline en réponse au glucose avec ou sans oléate dans la lignée cellulaire INS832/13 à la suite de transfections par électroporation d'ARN interférents ciblant PAK4.

# **The P21-activated kinase PAK4 is implicated in fatty-acid potentiation of insulin secretion downstream of free fatty acid receptor 1**

Valérie Bergeron<sup>1,2</sup>, Julien Ghislain<sup>1</sup> and Vincent Poitout<sup>1,2</sup>

**Islets. 2016. 8 (6):157-164**

1. Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, QC, Canada

2. Department of Medicine, University of Montreal, QC, Canada

Running title: PAK4 is implicated in FFA1 signaling

## **Corresponding author:**

Vincent Poitout

CRCHUM, 900 Saint-Denis Street, Montreal, QC, Canada, H2X 0A9

Tel.: 1-514-890-8044

Fax: 1-514-412-7648

E-mail: [vincent.poitout@umontreal.ca](mailto:vincent.poitout@umontreal.ca)



## **Abstract**

Free fatty acid receptor 1 (FFA1/GPR40) plays a key role in the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by fatty acids in pancreatic  $\beta$  cells. We previously demonstrated that GPR40 signaling leads to cortical actin remodeling and potentiates the second phase of insulin secretion. In this study, we examined the role of p21 activated kinase 4 (PAK4), a known regulator of cytoskeletal dynamics, in GPR40-dependent potentiation of insulin secretion. The fatty acid oleate induced PAK4 phosphorylation in human islets, in isolated mouse islets and in the insulin secreting cell line INS832/13. However, oleate-induced PAK4 phosphorylation was not observed in GPR40-null mouse islets. siRNA-mediated knockdown of PAK4 in INS832/13 cells abrogated the potentiation of insulin secretion by oleate, whereas PAK7 knockdown had no effect. Our results indicate that PAK4 plays an important role in the potentiation of insulin secretion by fatty acids downstream of GPR40.

**Key words:** Fatty acids; Free fatty acid receptor 1; G protein-coupled receptor 40; Insulin secretion; P21-activated kinase

**Abbreviations:** FFA (free fatty acids); FFA1 (free fatty acid receptor 1); GPR40 (G protein-coupled receptor 40); GPR40KO (GPR40-null); GSIS (glucose-stimulated insulin secretion); PAK (p21-activated kinase); PKD1 (protein kinase D1); siRNA (small interfering ribonucleic acid); RT-qPCR (reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction); WT (wild-type)

## Introduction

The maintenance of glucose homeostasis relies on the precise regulation of insulin secretion from the pancreatic  $\beta$  cell, alterations of which cause type 2 diabetes. Glucose is the main trigger for insulin secretion and in healthy individuals an elevation of blood glucose levels induces biphasic insulin secretion. Following uptake by the  $\beta$  cell, glucose metabolism leads to closure of ATP-dependent  $K^+$  channels, membrane depolarization, opening of voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  channels, and insulin exocytosis [1]. The fusion of docked and primed insulin secretory granules dominates the acute 1<sup>st</sup> phase, whereas the 2<sup>nd</sup> phase is characterized by the priming of pre-docked granules and mobilization of intracellular granule stores to docking sites at the membrane prior to fusion, a process that is facilitated by cortical actin remodeling [2]. In addition to glucose, a number of metabolic, hormonal, and neural signals modulate insulin secretion. Amongst those, medium to long-chain free fatty acids (FFA) potentiate glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in large part by binding to the G protein-coupled receptor free fatty acid receptor 1 (FFA1/GPR40) [3, 4]. Because FFA do not trigger insulin release at low glucose levels but only augment insulin secretion when glucose levels are elevated, therapeutic compounds that activate GPR40 offer the potential benefit of enhancing insulin secretion without the associated risk of iatrogenic hypoglycemia. One such compound, TAK-875, showed promising results in early clinical trials [5] providing an impetus for further research into the mechanism of GPR40 signaling.

Activation of GPR40 by FFA potentiates the 2<sup>nd</sup> phase of insulin secretion [6]. GPR40 mainly couples to the  $G_{\alpha q/11}$  G-protein subunit, which leads to phospholipase C (PLC)-mediated membrane lipid hydrolysis, generation of diacylglycerol (DAG), activation of protein kinase D1 (PKD1), and cortical actin remodeling [6]. However, the precise mechanisms by which GPR40-dependent signaling controls 2<sup>nd</sup> phase insulin secretion remain to be elucidated.

The serine/threonine p21-activated kinase (PAK) family proteins are critical regulators of cell proliferation, cell survival and cytoskeletal reorganization and are divided in 2 groups based on their domain architecture and regulation [7]. Group I PAKs includes PAK1, PAK2 and PAK3 and group II PAKs includes PAK4, PAK6 and PAK7 (also known as PAK5). The activity of PAK proteins is regulated by phosphorylation. PAK4 phosphorylation on serine 99 (S99) regulates its localization, protein complex formation and activity in cytoskeletal remodeling [8]. On the other hand, S474 in the activation loop of the kinase domain is considered as an auto-phosphorylation site. S474 phosphorylation is associated with translocation of PAK4 from the cytoplasm to the Golgi and correlates with kinase activity [9].

Recent studies suggest PAKs are important regulators of insulin secretion. PAK1 is necessary for GSIS in mouse and human islets, regulating glucose-dependent actin dynamics via ERK1/2 and the LIM kinase-ADF/COFILIN pathways [10-13]. *In vivo*, PAK1 deficiency in mice compromises insulin secretion and glucose tolerance under basal and metabolic stress conditions [11, 14]. Interestingly, PAK1 expression is decreased in islets from diabetic patients [11]. In addition, knockdown of PAK7 in insulin-secreting cells impairs GSIS and genome-wide expression analysis identified an inverse correlation between PAK7 expression in islets and HbA1c levels [15]. These studies suggest that deregulation of PAK1 or PAK7 may contribute to diabetes. However, despite the compelling data implicating PAKs in GSIS, to our knowledge, a potential role of PAKs as effectors of FFA potentiation of insulin secretion has not been investigated. Given the implication of PAKs in cortical actin remodeling [10-13], we investigated the role of the group II PAK4 in the potentiation of insulin secretion by FFA.

## Results and Discussion

**Oleate induces PAK4 phosphorylation in human islets.** We first investigated whether FFA induce PAK4 phosphorylation on S99 by Western blotting of human extracts exposed to the long chain mono-unsaturated FFA oleate, a potent GPR40 agonist [6]. As antibodies against total PAK4 protein were unreliable, phospho-PAK4 (S99) levels were normalized to tubulin. Following a 5 min exposure to 0.5 mM oleate, PAK4 phosphorylation was significantly increased compared to 5 mM glucose alone (Fig. 1A and B). These data suggest that PAK4 phosphorylation on S99 is stimulated by FFA in human islets.

**Oleate and glucose induce PAK4 phosphorylation in INS832/13 cells.**

We then studied the role of PAK4 in insulin secretion in INS832/13 cells since they are amenable to siRNA-mediated knockdown and the potentiating effects of FFA on insulin secretion is GPR40-dependent in these cells [16]. We first confirmed that PAK4 was phosphorylated in INS832/13 cells in response to oleate. We were unable to detect phospho-PAK4 (S99) by Western blotting (data not shown), although the antibody was expected to react with both rat and human proteins. As an alternative, we used an antibody against phospho-group II PAKs. To confirm phospho-PAK4 (S474) could be detected in Western blots with this phospho-group II PAK antibody, we knocked-down PAK4, PAK6 or PAK7 using siRNAs. Reverse transcriptase-quantitative PCR (RT-qPCR) analyses of INS832/13 cells transfected with siRNA to PAK4, PAK6 or PAK7 revealed a significant and specific knockdown of each PAK (PAK4, 91%; PAK6, 72%; PAK7, 85% reduction compared to control siRNA) (Fig. 2A-C). In Western blots, only PAK4 knockdown lead to the disappearance of an approximately 70 kDa band (the expected molecular weight of PAK4), which therefore corresponds to phospho-PAK4 (S474) (Fig. 2D and E). Treatment of INS832/13 cells with 0.5 mM oleate led to a significant increase in PAK4 phosphorylation on S474 compared to cells exposed to 2 mM glucose alone (Fig. 2F and G).

Interestingly, treatment with 10 mM glucose alone also led to a significant increase in PAK4 S474 phosphorylation compare to 2 mM glucose (Fig. 2F and G). Hence, PAK4 is phosphorylated on S474 in response to glucose or oleate in INS832/13 cells.

**Oleate-induced PAK4 phosphorylation is GPR40-dependent.** To verify whether PAK4 phosphorylation was similarly regulated in primary  $\beta$  cells, we first exposed isolated mouse islets to 2.8 vs 16.7 mM glucose for 5 min (Fig. 3A and B). In contrast to INS832/13 cells, glucose stimulation of islets did not lead to an increase in PAK4 S474 phosphorylation. We then analyzed phospho-PAK4 (S474) levels following oleate stimulation of wild-type (WT) and GPR40-null (GPR40KO) mouse islets. Stimulation of WT islets for 5 min with 0.5 mM oleate in the presence of either 2.8 (Fig. 3C and D) or 16.7 (Fig. 3E and F) mM glucose led to a significant increase in phospho-PAK4 (S474). This increase was not observed in GPR40KO islets (Fig. 3C-F) suggesting that PAK4 S474 phosphorylation in response to oleate is GPR40-dependent in mouse islets.

**PAK4 is necessary for the potentiation of insulin secretion by oleate.** To examine the functional impact of PAK4 phosphorylation in response to oleate we investigated its role in insulin secretion in INS832/13 cells. Despite the increased PAK4 phosphorylation in response to glucose in INS832/13 cells (Fig. 2F), siRNA-mediated PAK4 knockdown had no impact on insulin secretion induced by 10 mM glucose alone. In contrast, PAK4 knockdown completely blocked the potentiation of insulin secretion in response to 0.5 mM oleate (Fig. 4). Conversely, PAK7 knockdown reduced insulin secretion in response to glucose alone as previously reported [15], but did not alter the potentiating effect of oleate (Fig. 4). These results indicate PAK4 is necessary for the potentiation of insulin secretion by FFA.

Several candidate signaling molecules could be implicated in PAK4 phosphorylation/activation downstream of GPR40. CDC42 participates in PAK4 activation and translocation to actin in fibroblasts and endothelial cells [17] and RAC1 activation of ADF/COFILIN is group II PAK-dependent in

platelets [18]. However, unlike group I PAK members, binding of CDC42/RAC1 to PAK4 is not sufficient for activation [19] and whereas CDC42 participates in GSIS via activation of PAK1 [10], evidence supporting a role of these GTPases in GPR40 signaling is lacking. In murine mammary gland NMuMG and HeLa cells the activity and subcellular localization of PAK4 is regulated by protein kinase D1 (PKD1) via phosphorylation on S99 and the activation loop S474 [8, 20, 21]. Furthermore, activated PKD1 co-localizes with PAK4 on actin filaments in HuMEC cells [20]. We previously showed that PKD1 is activated downstream of GPR40 and is necessary for potentiation of insulin secretion by FFA [6]. Whether CDC42/RAC1 and/or PKD1 are involved in PAK4 activation downstream of GPR40 in  $\beta$  cells will require further investigation.

Previously we showed that cytoskeletal remodeling is coupled with GPR40-dependent potentiation of insulin secretion [6]. Actin remodeling is also a prerequisite for efficient 2<sup>nd</sup> phase insulin secretion in response to glucose [22] and many proteins implicated in GSIS regulate actin dynamics. In light of the known role of PAK4 in cytoskeletal reorganization [9, 17, 23-25], we speculate that actin remodeling events involved in the potentiation of insulin secretion by FFA are mediated at least in part by PAK4. PAK4 may also be implicated in insulin granule exocytosis via activation of GEF-H1 [24] that interacts with the exocyst complex subunit Sec5 [26], an important regulator of docking and fusion of newly recruited insulin granule [27]. However, as numerous proteins are involved directly and indirectly in actin remodeling and granule fusion, further investigation will be needed to determine which of these proteins are targeted by PAK4 during the potentiation of insulin secretion by FFA.

In summary, we show here for the first time that the group II PAK family member PAK4 is regulated by FFA signaling via GPR40 and is necessary for the potentiation of GSIS. This study provides valuable mechanistic insight into the mechanism of action of GPR40, a receptor considered as a potential therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes.

## Experimental procedures

**Mice, cell lines, antibodies and reagents.** WT and GPR40KO mice were generated as previously described [28]. Animals were housed on a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard laboratory chow. All procedures were approved by the institutional committee for the protection of animals at the Center Hospitalier de l'Université de Montréal. The rat insulin-secreting INS832/13 cell line (passages 50–56; provided by Dr. Christopher Newgard, Duke University School of Medicine, Durham, NC) was cultured in RPMI 1640 medium (Gibco Life Technologies, 11879-020) supplemented with 11 mM glucose, 10% (wt/vol) FBS (Gibco Life Technologies, 12483-020), 10 mM HEPES (pH 7.4), 2.05 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 50 µmol/L β-mercaptoethanol. Antibodies against phospho-group II PAKs (Cell Signaling, 3241S), phospho-PAK4 (S99) (Bioss, bs-2270R), total PAK4 (Cell Signaling, 3242S) and total PAK4 and tubulin (Abcam, ab19007 and ab4074) were used in Western blotting. Oleate (Sigma, 07501) was pre-complexed for 1 hour at 37°C with fatty-acid-free BSA (Equitech-Bio, BAH66) to a final molar ratio of 1:5 as described [29]. Control conditions contained the same amount of BSA and vehicle (50% (vol/vol) ethanol).

### **siRNA-mediated knockdown, RNA extraction and RT-qPCR.**

Electroporation of INS832/13 cells was performed using the Amaxa nucleofector and Ingenio electroporation kits according to the manufacturer's protocol (Lonza, 90 Boroline Road Allendale, NJ, USA). 60 pM of Silencer Select Pre-designed siRNAs targeting PAK4 and PAK7 (Life Technologies, s146689 and s61202) were used to transfect  $1 \times 10^6$  cells. 48 h after electroporation, total RNA was extracted and knockdown efficiency was determined by RT-qPCR as described previously [30] using primers 5'-CTTGCATCACTTCCATCCAGC-3' and 5'-GTCAAGCAGCAGTGTGAGAGC-3' for PAK4; 5'-TGATGGACCTCAGAAAGCAGC-3' and 5'-ATTGAGGTGCTGGTAGTCACG-3' for PAK6; 5'-

CTCCTGAGGTGATTTCCAGGC-3' and 5'-  
GAGGTAAACTGTCCCGGATCC-3' for PAK7; and 5'-  
CTTGCTGCAGACATGGTCAAC -3' and 5'-  
GCCATTATGGCGTGTGAAGTC- 3' for cyclophilin.

**Islet isolation and culture, INS832/13 cell culture and immunoblotting.**

Upon reception human islets were cultured overnight in Prodo islet media (Prodo Laboratories, PIM-S001GMP) supplemented with 100 U/mL penicillin/streptomycin. The following day, islets were hand-picked and pretreated for 5 h in RPMI 1640 supplemented with 10 % (wt/vol) human albumin solution (Grifols Therapeutics Inc., 61953-0002) and 5 mM glucose followed by 1 h in RPMI 1640 supplemented with 0.5% (wt/vol) BSA and 5 mM glucose. Islets were isolated from 12-week old male WT and GPR40KO mice by collagenase digestion as described [28] and allowed to recover overnight in RPMI 1640 supplemented with 10% (wt/vol) FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 11 mM glucose. The following day islets were hand-picked and pretreated for 4 h in RPMI 1640 supplemented with 10 % (wt/vol) FBS and 2 mM glucose and then for 1 h in RPMI 1640 supplemented with 0.5% (wt/vol) BSA and 2 mM glucose. INS832/13 cells were pretreated overnight with RPMI 1640 supplemented with 5.5 mM glucose and 10%(wt/vol) FBS, and the following day for 5 h in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM glucose, 0.5% (wt/vol) BSA. Human and mouse islets were stimulated for 5 min and INS832/13 cells for 2 min with glucose and oleate in RPMI 1640 as indicated in Figure legends. Protein extracts were subjected to 10% SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with primary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies in 5% (wt/vol) fat-free milk and visualized using Western Lighting Plus ECL (Perkin Elmer, NEL104001EA). Band intensity was quantified using Image J software (National Institutes of Health).

**Insulin secretion assay.** 48 h following electroporation, INS832/13 cells were incubated for 2 h in RPMI 1640 medium supplemented with 1 mM



glucose, 10% (wt/vol) FBS. Media was then replaced with a Krebs-Ringer Bicarbonate with HEPES (KRBH) solution containing 0.1% (wt/vol) BSA and 1 mM glucose for 1 h, followed by 1-h static incubations in KRBH in the presence of glucose and oleate as described in Figure legends. Each condition was run in triplicate. Secreted insulin was measured in the supernatant and intracellular insulin content was measured after acid-alcohol extraction by radioimmunoassay using a rat insulin RIA kit (Millipore, RI-13K).

**Statistics.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significance was tested using Student's paired *t*-test, or one- or 2-way analysis of variance with Bonferroni post hoc adjustment for multiple comparisons, as appropriate, using GraphPad Software.  $p < 0.05$  was considered significant.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP 86545 to VP). VP holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. We thank G. Dodier, M. Ethier, G. Fergusson and C. Tremblay (CRCHUM) for technical assistance; D. C. Lin and H. Baribault (Amgen, Thousand Oaks, California) for providing GPR40KO breeders; Christopher Newgard (Duke University, Durham, North Carolina) for the INS832/13 cells; and members of the Montreal Diabetes Research Center for fruitful discussions.

### **Conflict of interest**

No conflict of interest exists for any of the authors.

### **Author contributions**

VB, JG, VP conceived/designed the study and wrote the manuscript. VB performed experiments and analyzed the data. VB, JG, and VP reviewed/revised the manuscript.

## References

- [1] Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000; 49:1751-60; PMID: 11078440; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.49.11.17512>.
- [2] Kalwat MA, Thurmond DC. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet  $\beta$  cells. *Exp Mol Med* 2013; 45:e37; PMID: 23969997; <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.73>
- [3] Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 2003; 278:11303-11; PMID: 12496284; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211495200>
- [4] Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40. *Nature* 2003; 422:173-6; PMID: 12629551; <http://dx.doi.org/10.1038/nature01478>
- [5] Burant CF, Viswanathan P, Marcinek J, Cao C, Vakilynejad M, Xie B, Leifke E. TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012; 379:1403-11; PMID: 22374408; [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61879-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61879-5)
- [6] Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, et al. G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia* 2012; 55:2682-92; PMID: 22820510; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-012-2650-x>
- [7] Jaffer ZM, Chernoff J. p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34:713-7; PMID: 11950587; [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00158-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00158-3)

- [8] Bastea LI, Doppler H, Pearce SE, Durand N, Spratley SJ, Storz P. Protein kinase D-mediated phosphorylation at Ser99 regulates localization of p21-activated kinase 4. *Biochem J* 2013; 455:251-60; PMID: 23841590; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20130281>
- [9] Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, Jallal B, Smeal T. Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem* 2002; 277:550-8; PMID: 11668177; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105732200>
- [10] Wang Z, Oh E, Thurmond DC. Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *J Biol Chem* 2007; 282:9536-46; PMID: 17289663; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610553200>
- [11] Wang Z, Oh E, Clapp DW, Chernoff J, Thurmond DC. Inhibition or ablation of p21-activated kinase (PAK1) disrupts glucose homeostatic mechanisms in vivo. *J Biol Chem* 2011; 286:41359-67; PMID: 21969371; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.291500>
- [12] Kalwat MA, Yoder SM, Wang Z, Thurmond DC. A p21-activated kinase (PAK1) signaling cascade coordinately regulates F-actin remodeling and insulin granule exocytosis in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem Pharmacol* 2013;85:808-16; PMID:23246867; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.003>
- [13] Uenishi E, Shibasaki T, Takahashi H, Seki C, Hamaguchi H, Yasuda T, Tatebe M, Oiso Y, Takenawa T, Seino S. Actin dynamics regulated by the balance of neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cofilin activities determines the biphasic response of glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 2013; 288:25851-64; PMID: 23867458; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.464420>
- [14] Ahn M, Yoder SM, Wang Z, Oh E, Ramalingam L, Tunduguru R, Thurmond DC. The p21-activated kinase (PAK1) is involved in diet-induced  $\beta$  cell mass expansion and survival in mice and human islets. *Diabetologia* 2016; 59:2145-55; PMID: 27394663; <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-4042-0>

- [15] Fadista J, Vikman P, Laakso EO, Mollet IG, Esguerra JL, Taneera J, Storm P, Osmark P, Ladenvall C, Prasad RB, et al. Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:13924-9; PMID: 25201977; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1402665111>
- [16] Mancini AD, Bertrand G, Vivot K, Carpentier E, Tremblay C, Ghislain J, Bouvier M, Poitout V. b-Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *J Biol Chem* 2015; 290:21131-40; PMID: 26157145; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.644450>
- [17] Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, Belisle B, Minden A. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J* 1998; 17:6527-40; PMID: 9822598; <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.22.6527>
- [18] Pandey D, Goyal P, Dwivedi S, Siess W. Unraveling anovel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombinstimulated platelets. *Blood* 2009; 114:415-24; PMID: 19429871; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-10-183582>
- [19] Baskaran Y, Ng YW, Selamat W, Ling FT, Manser E. Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42. *EMBO Rep* 2012; 13:653-9; PMID: 22653441; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2012.75>
- [20] Spratley SJ, Bastea LI, Doppler H, Mizuno K, Storz P. Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *J Biol Chem* 2011; 286:34254-61; PMID: 21832093; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.259424>
- [21] Doppler H, Bastea LI, Borges S, Spratley SJ, Pearce SE, Storz P. Protein kinase d isoforms differentially modulate cofilin-driven directed cell migration. *PLoS One* 2014; 9: e98090; PMID: 24840177; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098090>

- [22] Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* 2009; 122:893-903; PMID: 19295123; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.034355>
- [23] Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* 2001; 276:32115-21; PMID: 11413130; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100871200>
- [24] Callow MG, Zozulya S, Gishizky ML, Jallal B, Smeal T. PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *J Cell Sci* 2005; 118:1861-72; PMID: 15827085; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02313>
- [25] Kimmelman AC, Hezel AF, Aguirre AJ, Zheng H, Paik JH, Ying H, Chu GC, Zhang JX, Sahin E, Yeo G, et al. Genomic alterations link Rho family of GTPases to the highly invasive phenotype of pancreas cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:19372-7; PMID: 19050074; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0809966105>
- [26] Pathak R, Delorme-Walker VD, Howell MC, Anselmo AN, White MA, Bokoch GM, Dermardirossian C. The microtubule-associated Rho activating factor GEF-H1 interacts with exocyst complex to regulate vesicle traffic. *Dev Cell* 2012; 23:397-411; PMID: 22898781; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.014>
- [27] Xie L, Zhu D, Kang Y, Liang T, He Y, Gaisano HY. Exocyst sec5 regulates exocytosis of newcomer insulin granules underlying biphasic insulin secretion. *PLoS One* 2013; 8:e67561; PMID: 23844030; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067561>
- [28] Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 2007; 56:1087-94; PMID: 17395749; <http://dx.doi.org/10.2337/db06-1532>
- [29] Briaud I, Harmon JS, Kelpel CL, Segu VB, Poitout V. Lipotoxicity of the pancreatic  $\beta$ -cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty

acids into neutral lipids. *Diabetes* 2001; 50:315-21; PMID: 11272142; <http://dx.doi.org/10.2337/diabetes.50.2.315>

[30] Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK, Fontes G, Amyot J, Tremblay C, Semache M, Lausier JA, Roskens V, Mirmira RG, et al. Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 2008; 57:424-31; PMID: 17991758; <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1285>

## Figure Legends

**Figure 1. Oleate induces PAK4 phosphorylation in human islets.** (A) Protein extracts from human islets stimulated for 5 min with 5 mM glucose with or without 0.5 mM oleate were analyzed by Western blot for phospho-PAK4 (S99) and tubulin. (B) Quantification of phospho-PAK4 (S99) normalized to tubulin. Data are mean  $\pm$  SEM for 4 independent experiments; \*,  $p < 0.05$  compared to 5 mM glucose.

**Figure 2. Glucose and oleate induces PAK4 phosphorylation in INS832/13 cells.** (A-C) INS832/13 cells were electroporated with negative control siRNA (NC) or siRNA targeting PAK4 (A), PAK6 (B) or PAK7 (C). 48 h later RNA was extracted and analyzed by RT-qPCR. Quantification of knockdown efficiency is presented as Ct values normalized to cyclophilin for each PAK compared to the normalized Ct value of the negative control and are mean  $\pm$  SEM of 5 independent experiments; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  compared to the negative control. (D) INS832/13 cells electroporated with NC or siRNA targeting PAK4, PAK6 or PAK7 were stimulated for 15 min with 10 mM glucose and 0.5 mM oleate and analyzed by Western blot for phospho-group II PAKs and tubulin. (E) Quantification of phospho-PAK4 (S474) normalized to tubulin. Data are mean  $\pm$  SEM of 5 individual experiments; \*\*,  $p < 0.01$  compared to the negative control. (F) INS832/13 stimulated for 2 min with 2 mM glucose alone, 2 mM glucose + 0.5 mM oleate or 10 mM glucose alone, were analyzed by Western blot for phospho-group II PAKs and tubulin (G) Quantification of phospho-PAK4 (S474) normalized to tubulin. Data are mean  $\pm$  SEM for 6 independent experiments; \*,  $p < 0.05$  compared to 2 mM glucose alone.

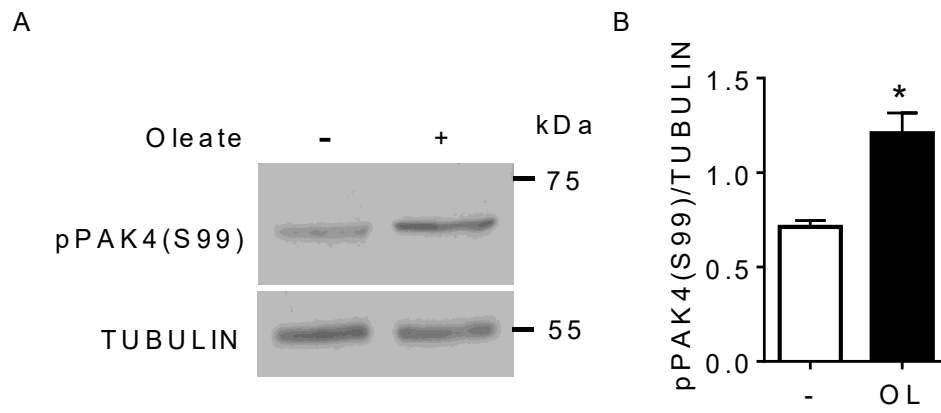
**Figure 3. PAK4 phosphorylation in response to oleate is GPR40-dependent.** (A) Islets from wild-type (WT) mice stimulated for 5 min with 2.8 mM glucose or 16.7 mM glucose were analyzed by Western blot for phospho-group II PAKs and tubulin. (B) Quantification of phospho-PAK4 (S474) normalized to tubulin. Data are mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments.

(C and E) Islets from wild-type (WT) and GPR40-null (KO) mice stimulated for 5 min with 2.8 mM glucose (C) or 16.7 mM glucose (E) with or without 0.5 mM oleate were analyzed by Western blot for phospho-group II PAKs and tubulin. (D and F) Quantification of phospho-PAK4 (S474) normalized to tubulin. Data are mean  $\pm$  SEM of 4-6 independent experiments; \*,  $p < 0.05$ ; compared to 2.8 mM (D) or 16.7 mM (F) glucose.

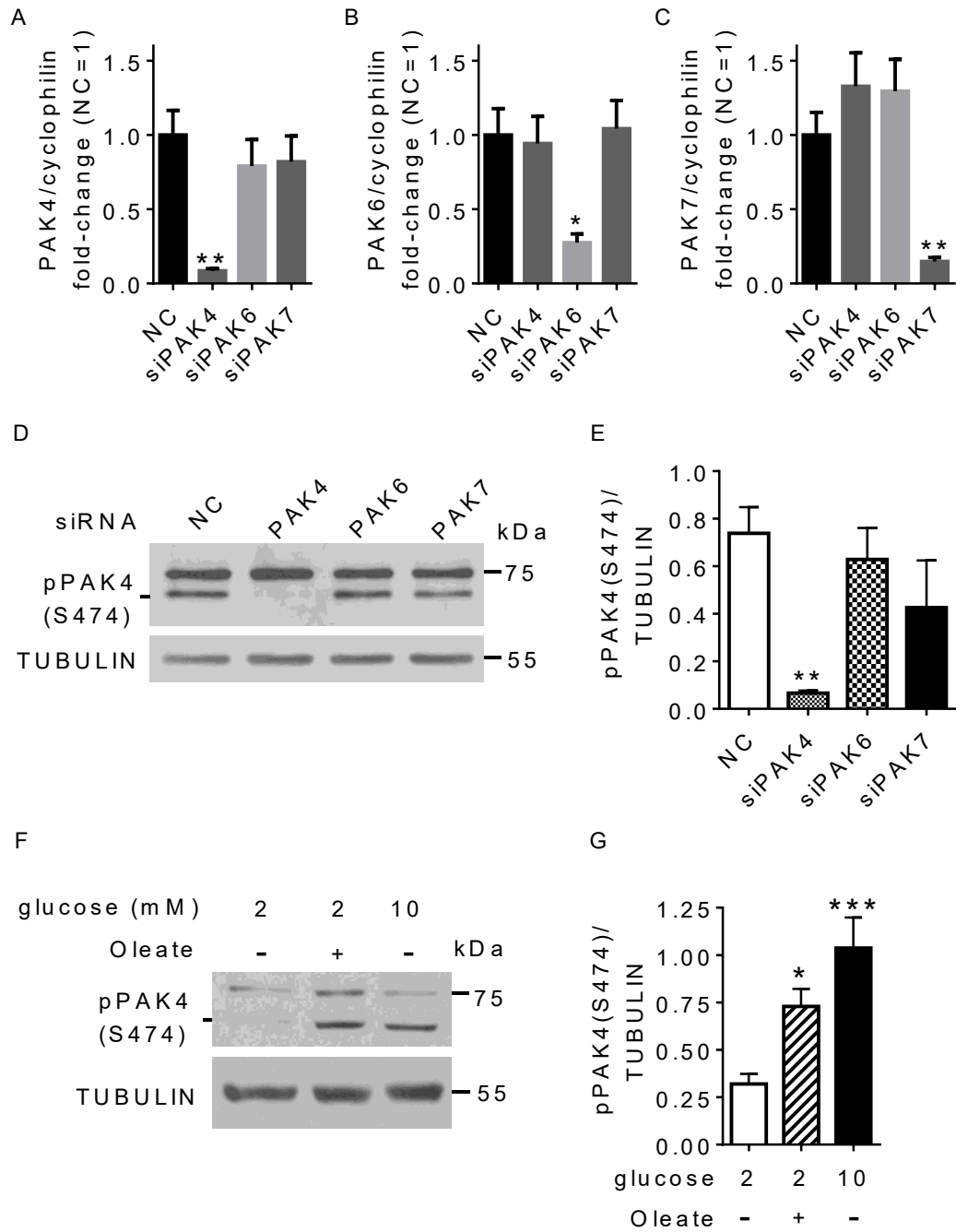
**Figure 4. PAK4 is necessary for oleate potentiation of insulin secretion.** INS832/13 cells were electroporated with negative control siRNA (NC) or siRNA targeting PAK4 or PAK7. 48 h later, cells were treated for 1 h with 1 mM glucose, 10 mM glucose or 10 mM glucose and 0.5 mM oleate and analyzed for insulin secretion. Insulin secretion is presented as a percentage of insulin content and is the mean  $\pm$  SEM for 5 independent experiments run in triplicates; &&&,  $p < 0.001$  compared to the 10 mM glucose condition for the negative control, \*\*,  $p < 0.01$  compared to the corresponding 10 mM glucose condition.



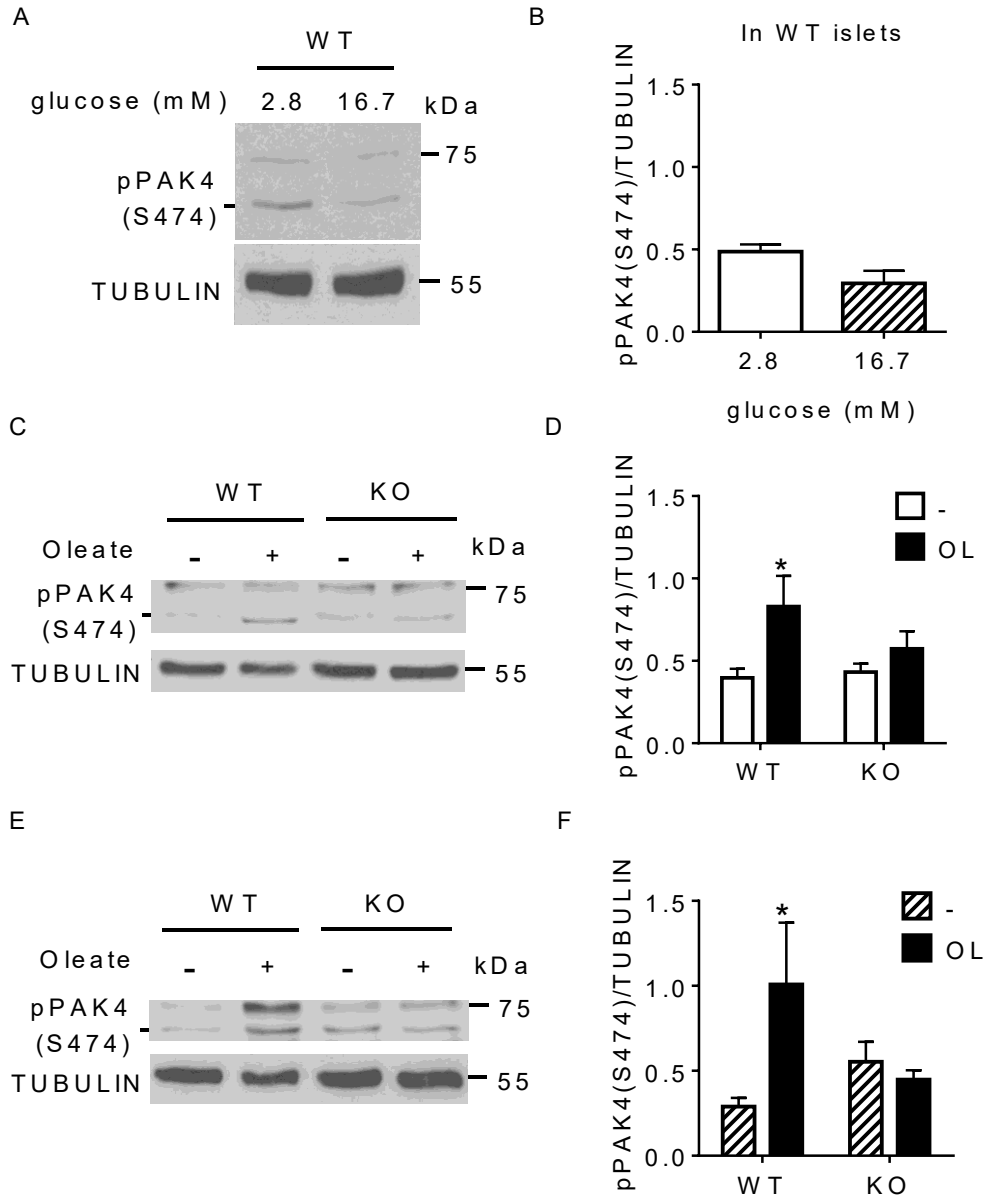
**Figure 1**



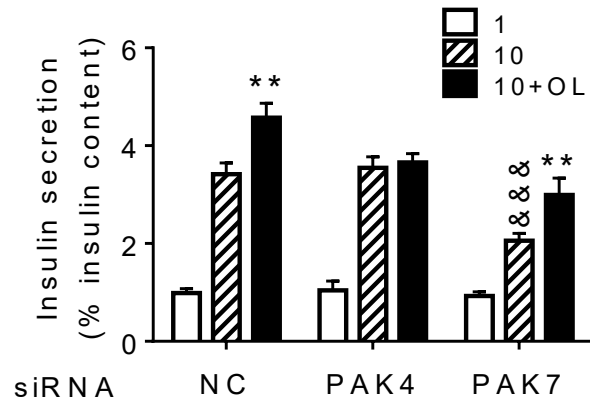
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



## **Discussion de l'article 2**

### **Rappel des résultats**

Dans ce deuxième article publié dans le journal *Islets*, nous avons démontré que PAK4 est phosphorylée sur sa sérine 99 en réponse à l'oléate dans les îlots de Langerhans humains. Nous avons aussi observé que PAK4 est phosphorylée en réponse à l'oléate sur sa sérine 474 dans la lignée cellulaire pancréatique INS832/13 et les îlots de Langerhans de souris sauvages. Nous avons remarqué la phosphorylation de PAK4 en réponse au glucose, mais dans la lignée cellulaire pancréatique INS832/13 seulement. D'autre part, nous avons remarqué que la phosphorylation de PAK4 sur sa sérine 474 en réponse à l'oléate dans les îlots de Langerhans de souris dépend de la présence du récepteur GPR40. Finalement, nous avons démontré que PAK4 est nécessaire à la potentialisation de la sécrétion d'insuline par l'oléate dans la lignée cellulaire pancréatique INS832/13.

### **Interprétation des résultats**

Notre étude a permis de montrer que PAK4 est une molécule effectrice de la voie de signalisation du récepteur GPR40 et qu'elle joue un rôle essentiel dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par l'oléate.

Lors d'études précédentes, des chercheurs ont remarqué que l'expression de PAK7 est diminuée chez les sujets humains hyperglycémiques et que PAK7 joue un rôle dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (237). Nos résultats confirment que PAK7 est nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et démontrent que l'oléate peut potentialiser la sécrétion d'insuline dans ces cellules INS832/13 déficientes pour PAK7. Nous avons observé cependant un profil de sécrétion d'insuline inverse avec les cellules INS832/13 déficientes pour PAK4. En effet, l'oléate ne potentialise pas la sécrétion d'insuline de ces cellules déficientes pour PAK4, bien que ces dernières sécrètent l'insuline normalement en réponse au glucose. Nous avons ainsi conclu que PAK4

joue un rôle spécifique et essentiel pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.

Lors d'études précédentes, la phosphorylation de PAK1 a été observée en réponse à une concentration élevée de glucose dans les cellules insulinosécrétrices MIN6 (60). Il est intéressant de constater dans cette étude que l'oléate peut induire la phosphorylation de PAK4 en absence d'une concentration élevée de glucose dans les cellules INS832/13, dans les îlots de Langerhans de souris sauvages et dans les îlots de Langerhans humains. Comme la phosphorylation de PAK4 induite par l'oléate est réduite de façon significative dans les îlots GPR40KO, nous avons conclu que la phosphorylation de PAK4 découle de l'interaction de l'oléate avec le récepteur GPR40. Comme PAK4 joue un rôle essentiel dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras, il est probable que PAK4 soit parmi les molécules effectrices de la voie de signalisation de GPR40 qui sont responsables de la potentialisation de la sécrétion d'insuline.

D'autre part, la phosphorylation de PAK4 est induite en aval du récepteur GPR40 en l'absence d'une concentration de glucose stimulant la sécrétion d'insuline. Notre étude démontre ainsi que la voie de signalisation du récepteur GPR40 peut activer ses molécules effectrices même lorsque la sécrétion d'insuline n'est pas induite. Ces observations appuient l'hypothèse que le récepteur GPR40 potentialise la sécrétion d'insuline par des mécanismes qui favorisent le recrutement des granules à la membrane. Ce recrutement des granules d'insuline est alors indépendant de l'exocytose des granules d'insuline. Cette exocytose dépend plutôt des protéines SNAREs dont l'activité est contrôlée par l'augmentation intracellulaire de calcium induite par le glucose (29).

### **Forces de l'étude**

Une des forces de l'étude est de toute évidence la confirmation de nos observations dans les cellules de rongeurs dans les îlots de Langerhans humains. En effet, certaines voies de signalisation activées chez les rongeurs ne provoquent pas les mêmes effets chez les humains et expliquent

partiellement les échecs de certaines études translationnelles (256, 257). Ainsi, il est intéressant de constater que l'oléate seul peut induire la phosphorylation de PAK4 dans les îlots de Langerhans humains.

Une autre force de l'étude est l'utilisation de cellules déficientes pour PAK7 parmi les contrôles pour l'étude du profil de sécrétion d'insuline des cellules déficientes pour PAK4. En effet, les différences significatives des profils de sécrétion d'insuline des cellules déficientes pour PAK4 ou PAK7 suggèrent que les PAKs influencent la sécrétion d'insuline en aval de voies nettement différentes. Bien que PAK4 et PAK7 soient toutes deux des PAKs du groupe 2, PAK7 est nécessaire pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose alors que PAK4 est nécessaire pour une potentialisation de celle-ci par l'oléate. La potentialisation par l'oléate d'une sécrétion d'insuline défectueuse en réponse au glucose dans les cellules déficientes pour PAK7 est encore plus intrigante. Nos résultats suggèrent que les mécanismes permettant de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse à l'oléate sont distincts des mécanismes impliqués dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Du moins, ces mécanismes sont suffisamment distincts pour augmenter cette dernière même lorsqu'elle est défectueuse. Ces observations confirment indirectement le potentiel thérapeutique du récepteur GPR40 pour le diabète de type 2. En effet, même lorsque la sécrétion d'insuline est réduite en réponse au glucose, les acides gras réussissent à potentialiser celle-ci.

L'activité de PAK4 a seulement été étudiée précédemment dans les adénocarcinomes pancréatiques (239) afin de démontrer son implication dans la survie, la prolifération et les propriétés invasives de ces cellules (240, 243). Notre étude est donc la première à étudier le rôle de PAK4 dans les cellules pancréatiques humaines dont la fonction est normale. Notre observation que PAK4 est nécessaire à la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras est particulièrement intéressante dans le contexte actuel des approches pharmacologiques considérées pour le traitement des cancers. En effet, une de ces approches consiste en

l'utilisation d'un inhibiteur de PAK4 afin de diminuer la croissance et le potentiel invasif de divers types de tumeurs (244, 245). Notre étude est la première à suggérer qu'une telle thérapie pourrait avoir un effet sur la sécrétion d'insuline et donc sur l'homéostasie du glucose du patient.

### **Limites de l'étude**

Les limites de l'étude résident dans les techniques employées pour étudier l'activation de PAK4. En effet, il aurait été intéressant d'étudier la phosphorylation de PAK4 sur ses sérines 99 et 474 dans tous les modèles utilisés dans l'étude. Malheureusement, nous avons observé que l'anticorps décelant la phosphorylation sur la sérine 99 de PAK4 ne détecte pas PAK4 dans les extraits protéiques de cellules insulinosécrétrices INS832/13 ou d'îlots de Langerhans de souris sauvages. De plus, nous avons observé que l'anticorps décelant la phosphorylation sur la sérine 474 de PAK4 ne détecte pas PAK4 dans les extraits protéiques des îlots de Langerhans humains. Ces limites techniques réduisent la portée de nos résultats puisque la corrélation de l'activation de PAK4 avec sa phosphorylation sur ces deux sérines est critiquée dans la littérature. En effet, un groupe de chercheurs a proposé que la phosphorylation sur la sérine 474 de PAK4 est constitutive (233). Une autre étude a déterminé que celle-ci a possiblement lieu après la phosphorylation de la sérine 99 ou de façon indépendante à cette dernière (253). Ainsi, notre étude aurait été enrichie par l'étude de la phosphorylation de ces deux sérines dans tous les modèles cellulaires utilisés.

D'autre part, PAK4 est une cible de PKD1 (253) et nous avons démontré dans le premier article de cette thèse que PKD1 est activée en aval de GPR40. Une autre limite de l'étude est ainsi l'absence de l'étude de la phosphorylation de PAK4 dans un modèle déficient pour PKD1. La phosphorylation de la sérine 99 semble plus dépendante de PKD1 que la phosphorylation sur la sérine 474 (253). Il aurait donc été intéressant de mesurer la phosphorylation sur la sérine 99 dans les îlots humains en réponse à l'oléate à la suite d'une diminution de l'activité ou de l'expression de PKD1.



## Travaux futurs

Dans cette étude, nous avons identifié une nouvelle molécule effectrice de la voie de signalisation du récepteur GPR40 qui joue aussi un rôle dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras. L'étape suivante serait d'identifier les mécanismes que PAK4 emploie pour potentialiser la sécrétion d'insuline. En effet, il serait intéressant d'étudier si PAK4 potentialise la sécrétion d'insuline comme PKD1 en influençant le remodelage des filaments d'actine (article 1), ou si elle augmente la fusion des granules à la membrane en phosphorylant des molécules telles que GEF-H1 (247, 258, 259) (Figure 22).

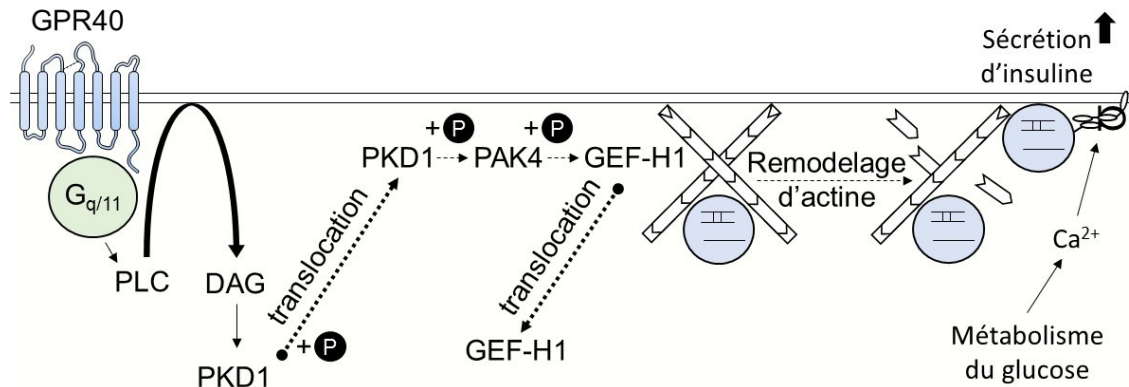


Figure 22 : Modèle de l'hypothèse pour les travaux futurs

## Conclusions

Cette étude a permis d'élucider pour la première fois un rôle pour PAK4 dans la sécrétion d'insuline. Plus précisément, notre étude a permis de déterminer que PAK4 est essentielle pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse aux acides gras. De plus, notre étude a identifié PAK4 comme étant une molécule effectrice de la voie de signalisation du récepteur GPR40. Enfin, la phosphorylation de PAK4 en réponse aux acides gras est également observée dans les îlots humains.

## Article 3

**Titre : Deletion of protein kinase D1 in pancreatic beta cells impairs glucose induced insulin secretion in high-fat fed mice**

**Auteurs :** Bergeron V, Ghislain J, Vivot K, Tamarina N, Philipson LH, Fielitz J et Poitout V

**Article publié dans :** (soumis)

**Contributions des auteurs :**

**Bergeron V :** Auteure principale ayant élaboré les hypothèses, effectué la majorité des expériences, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

**Ghislain J :** Coauteur ayant participé à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit.

**Kevin Vivot :** Coauteur ayant fourni une aide technique pour les clamps hyperglycémiques.

**Natalia Tamarina :** Coauteur et collaborateur ayant généré les souris exprimant la CRE<sup>ERT</sup> en aval du promoteur de l'insuline.

**Louis Philipson :** Coauteur et collaborateur.

**Jens Fielitz :** Coauteur et collaborateur ayant généré les souris dont le gène pour PKD1 contient des insertions loxP.

**Poitout V :** Investigateur principal ayant dirigé et supervisé l'ensemble de ce projet de l'élaboration de l'hypothèse à la rédaction du manuscrit.

*À noter : Contribution en aide technique de Grace Fergusson et de Mélanie Ethier de la plateforme de phénotypage métabolique des rongeurs.*

### Mise en contexte de l'article 3

Lors de l'étude de la voie de signalisation du récepteur GPR40 dans l'article 1, nous avons observé que PKD1 joue un rôle important dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras ex vivo. Dans le troisième article rédigé pour cette thèse, dont la soumission à un journal est imminente, nous avons étudié le rôle de PKD1 dans la sécrétion d'insuline chez des souris soumises à une diète riche en lipides.

Pour ce faire, nous avons généré une lignée de souris qui résulte d'un croisement entre des souris dont le gène pour PKD1 est encadré de séquences loxP et des souris exprimant la protéine recombinase CRE inducible par le tamoxifène en aval du promoteur de l'insuline. La recombinaison à la suite de l'injection du tamoxifène et la déficience subséquente en PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques ont été confirmées par immunobuvardage de type Western. Nous avons ensuite comparé le profil de tolérance au glucose des souris déficientes pour PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques ( $\beta$ PKD1KO) avec des souris provenant de la même portée pouvant être considérées comme des souris témoins. Nous avons établi en premier lieu le meilleur génotype pour la souris témoin afin d'éviter un biais lors des comparaisons avec la souris  $\beta$ PKD1KO. Ensuite, les souris ont reçu une diète normale constituée de 18% de protéines et 5% de lipides ou une diète riche en lipides dont 60% des calories proviennent de graisses de porc (saindoux). Durant la diète, la glycémie et l'insulinémie des souris ont été mesurées à plusieurs reprises. Comme la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est fortement réduite chez la souris GPR40KO à la suite d'une diète riche en lipides (178), nous avons mesuré l'insulinémie des souris  $\beta$ PKD1KO en réponse à une administration de glucose par voie orale et par voie intraveineuse. Nous avons aussi analysé les pancréas des souris afin de déterminer si PKD1 influence la taille des îlots de Langerhans et la masse des cellules bêta pancréatiques durant une diète riche en lipides.

# **Deletion of protein kinase D1 in pancreatic beta cells impairs insulin secretion in high-fat fed mice**

Valérie Bergeron<sup>1,2</sup>, Julien Ghislain<sup>1</sup>, Kevin Vivot<sup>1</sup>, Natalia Tamarina<sup>3</sup>, Louis H. Philipson<sup>3</sup>, Jens Fielitz<sup>4,5,6</sup> and Vincent Poitout<sup>1,2</sup>

**(Submitted to Diabetes)**

1. Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM
2. Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada
3. Kovler Diabetes Center, University of Chicago, Chicago, IL, USA
4. Experimental and Clinical Research Center (ECRC), Charité-Universitätsmedizin Berlin, Max Delbrück Center (MDC) for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, 13125 Berlin, Germany
5. DZHK (German Center for Cardiovascular Research), partner site Greifswald, Greifswald, Germany
6. University Medicine Greifswald, Department of Internal Medicine B, Greifswald, Germany

## **Corresponding author:**

Vincent Poitout, DVM, PhD

CRCHUM

900 rue St Denis

Montréal, QC, H2X 0A9 - CANADA

Tel: (514) 890-8044

E-mail: [vincent.poitout@umontreal.ca](mailto:vincent.poitout@umontreal.ca)

## Abstract

Beta-cell adaptation to insulin resistance is necessary to maintain glucose homeostasis in obesity. Failure of this mechanism is a hallmark of type 2 diabetes (T2D). Hence, factors controlling functional beta-cell compensation are potentially important targets for the treatment of T2D. Protein kinase D1 (PKD1) integrates diverse signals in the beta cell and plays a critical role in the control of insulin secretion. However, the role of beta-cell PKD1 in glucose homeostasis in vivo is essentially unknown. Using beta-cell specific, inducible PKD1 knock-out mice ( $\beta$ PKD1KO), we examined the role of beta-cell PKD1 under basal conditions and during high-fat feeding.  $\beta$ PKD1KO mice under chow diet presented no significant difference in glucose tolerance or insulin secretion compared to mice expressing the Cre transgene alone; however, when compared to wild-type mice, both groups developed glucose intolerance. Under high-fat diet, deletion of PKD1 in beta cells worsened hyperglycemia, hyperinsulinemia and glucose intolerance. This was accompanied by impaired glucose-induced insulin secretion both in vivo in hyperglycemic clamps and ex vivo in isolated islets from high-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice, without changes in islet mass. This study demonstrates an essential role for PKD1 in the beta-cell adaptive secretory response to high-fat feeding in mice.

**Key words:** Protein kinase D1, Free fatty acid receptor 1, G protein-coupled receptor 40, Insulin secretion, Free fatty acids, Type 2 diabetes

**Abbreviations:**  $\beta$ PKD1KO (beta-cell specific PKD1 knock-out mice); CRE (MIP- CRE<sup>ERT</sup> expressing mice); FFA (free fatty acids); FFA1 (Free fatty acid receptor 1); FL (PKD1<sup>fl/fl</sup> expressing mice); GIR (glucose infusion rate); GPR40 (G protein-coupled receptor 40); GPR40KO (GPR40-null mice); GSIS (glucose-stimulated insulin secretion); HF (high-fat diet); HGC (hyperglycemic clamps); MIP-CRE<sup>ERT</sup> (tamoxifen-inducible Cre recombinase under control of the mouse insulin promoter); ND (normal diet); OGTT (oral glucose tolerance test); OL (oleate); PKD1 (protein kinase D1); T2D (Type 2 diabetes); WT (wild-type mice)

## Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is characterized by insufficient insulin secretion from the pancreatic beta cell. Functional beta-cell adaptation is a central mechanism by which the body overcomes insulin resistance to maintain glucose homeostasis in obese individuals. Over time, however, failure of this mechanism can lead to T2D [1]. Insulin secretion is a tightly regulated process controlled by a number of metabolic, hormonal, and neural cues, many of which are mediated by G protein-coupled receptors [2]. G protein-coupled receptors are validated targets for the treatment of T2D and among these, the fatty-acid receptor GPR40/FFAR1 has been the subject of considerable interest in recent years [3]. GPR40 is predominantly expressed in beta cells and is implicated in the second phase of insulin secretion in response to fatty acids in vivo and in vitro [4-6]. GPR40 preferentially couples to the G protein subunit Gαq and, as shown by our group in isolated mouse islets [7], its downstream signaling cascade involves protein kinase D1 (PKD1), a serine/threonine protein kinase of the calcium/calmodulin-dependent kinase family. PKD1 is also involved in the potentiation of insulin secretion by M3 muscarinic receptor signaling via beta-arrestins [8]. Mechanistically, PKD1 promotes insulin vesicle fission at the trans-Golgi network [9; 10] and controls remodeling of the actin cytoskeleton [7]. Hence, inhibition of PKD1 activity in cultured beta cells reduces insulin secretion by preventing the replenishment of secretion competent insulin granules at the plasma membrane [9; 11]. Together these studies suggest that PKD1 activity regulates insulin granule formation and secretion. However, the precise role of beta-cell PKD1 in glucose homeostasis in vivo remains to be elucidated.

To this aim, we generated tamoxifen-inducible, beta-cell specific PKD1 knock-out mice and examined glucose homeostasis and beta-cell function and mass under basal conditions and in response to high-fat feeding.

## Research design and methods

**Animals and diets.** All procedures involving animals were approved by the institutional committee for the protection of animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Mice were housed on a 12-h light/dark cycle with free access to water and standard laboratory chow (Teklad Global 18% protein rodent diet 2918, Harlan Teklad, Madison, WI). Mice carrying LoxP sites between exon 11 and 12 and exons 14 and 15 of one *Prkd1* allele [12] and transgenic MIP-CreERT<sup>1Lphi</sup> (MIP-CreERT) mice [13; 14] were backcrossed to C57Bl/6N (Charles River, Saint-Constant, QC) for 9 generations and genotyped as described [12; 13]. PKD1<sup>+fl</sup> female and MIP-CreERT; PKD1<sup>+fl</sup> male were crossed to generate experimental groups. Tamoxifen (Sigma, Oakville, ON) was injected IP (125 mg/kg) at 48-h intervals for a total of 3 injections in 9-week-old males as described [15]. All experimental animals received tamoxifen. Three weeks following tamoxifen injections (week 0), mice were either kept on standard chow or given a high-fat diet (60% fat, 15% protein and 25% carbohydrate on a caloric basis; Bioserv Diets, S3282, Frenchtown, NJ) for up to 13 weeks. Body weight composition was assessed with the EchoMRI Analyzer-700 (Echo Medical System, Houston, TX).

**Oral glucose tolerance test and hyperglycemic clamps.** Oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed in 4 hour-fasted mice by measuring tail blood glucose and plasma insulin after oral glucose administration (2 g/kg) by gavage as described [16].

One-step hyperglycemic clamps were performed in conscious, ad libitum fed animals as described [6]. Briefly, a 20% dextrose solution (Baxter, Mississauga, ON) was infused via a jugular catheter. Mice initially received a 90-second bolus (140 mg/kg/minute) and then the glucose infusion rate (GIR) was adjusted to maintain blood glucose between 18 and 21 mmol/L for 80 min. Blood samples were collected from the tail to measure glucose using the hand-held glucometer Accu-Chek (Roche, Indianapolis, IN) and plasma

insulin and C-peptide were measured with a mouse ultrasensitive insulin ELISA (Alpco Diagnostics, Salem, NH) at the time points indicated in the Figure legends. The insulin sensitivity index (M/I) was calculated as the glucose infusion rate (M) divided by the average insulinemia during the last 30 min of the clamp (I).

**Islet mass measurements.** Immediately following the HGC, the pancreas was removed and islet mass was measured on paraffin sections using an anti-chromogranin A antibody (Ab85554, Abcam, Toronto, ON) to label endocrine cells as described [17].

**Static incubations.** Islets were isolated by collagenase (Sigma, Oakville, ON) digestion as described [4] and recovered in RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 10% (wt/vol) FBS (Gibco Life Technologies, Burlington, ON), 100 U/mL penicillin/streptomycin and 11 mmol/L glucose. Triplicate batches of 10 islets each were incubated in KRBH with 0.1% BSA and 2.8 mmol/L glucose twice for 20 minutes followed by a 1-h static incubation in KRBH in the presence of glucose, oleate (Sigma, Oakville, ON) as indicated in the Figure legends. Oleate was complexed for 1 h at 37°C with fatty-acid-free BSA (BAH66, Equitech-Bio, Kerrville, TX) to a final molar ratio of 1:5 prior to use as described [18]. Control conditions contained the same amount of BSA and vehicle (50% (vol/vol) ethanol). Secreted insulin was measured in the supernatant and intracellular insulin content was measured after acid–alcohol extraction by radioimmunoassay using a rat insulin RIA kit (Millipore, Billerica, MA).

**Western blots.** Islet protein extracts were subjected to 10% SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with primary antibodies against PKD1 (1:500; Cell Signaling, New England Biolabs, Whitby, ON) or tubulin (1:5000; Abcam, Toronto, ON), then horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG secondary antibodies in 5% (wt/vol) milk, and visualized using Western Lighting Plus ECL (Perkin Elmer, Woodbridge, ON). Band intensity was quantified using Image J software (National Institutes of Health).



**Statistical analyses.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significance was tested using one-way ANOVA with Tukey or Dunnett post hoc test, or two-way ANOVA with post hoc adjustment for multiple comparisons, as appropriate, using GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA).  $P < 0.05$  was considered significant.

## Results

**Efficient beta-cell specific deletion of PKD1.** MIP-CreERT;PKD1<sup>fl/fl</sup> ( $\beta$ PKD1KO) mice were born at the expected Mendelian ratio. At 9 weeks of age, male mice from all 4 experimental groups were injected with tamoxifen. Three weeks later, PKD1 protein levels were assessed by Western blotting in isolated islets. PKD1 protein levels were significantly reduced in  $\beta$ PKD1KO mice compared to MIP-CreERT, PKD1<sup>fl/fl</sup> or wild-type (WT) littermates (Suppl. Fig. 1A&B).

**MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice develop glucose intolerance.** We first performed sequential OGTTs in a first cohort of chow-fed animals from all 4 genotypes starting three weeks after tamoxifen injections (week 0). As shown in Fig. 1, glucose tolerance was reduced, though not significantly, in MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice compared to WT mice at week 0 (Fig. 1A). At week 8, glucose tolerance of MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice became significant different from WT mice (Fig. 1B), and it remained so for  $\beta$ PKD1KO mice at week 12 (Fig. 1C). Insulin levels were unaffected (Fig. 1D-F). The development of glucose intolerance in both MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice suggests that this phenotype is likely due to the presence of the Cre transgene rather than PKD1 deletion.

Second, to further examine the impact of the Cre transgene on insulin secretion, animals from the 4 genotypes were subjected to hyperglycemic clamps at week 13 (Fig. 2). Mice were catheterized at the beginning of week 13 and allowed to recover for 3-5 days. During the clamp, target blood glucose levels were achieved in all 4 groups and were stable between 50 and

80 minutes (Fig. 2A). Although insulin levels during the clamp were not significantly different (Fig. 2B&C), plasma C-peptide levels were significantly reduced in MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice compared to WT mice (Fig. 2D). Both MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice had reduced GIR compared to WT mice (Fig. 2E), although the difference was statistically significant only for  $\beta$ PKD1KO mice. However, the M/I index of insulin sensitivity was not significantly different between all 4 groups (Fig. 2F).

Third, to examine whether the lower C-peptide levels in MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice during the clamp reflected an intrinsic insulin secretory defect, we performed 1-h static incubations in islets isolated at week 0 (Fig. 3). As shown in Fig. 3A, glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was similar in all 4 groups. The potentiation of GSIS by oleate was slightly but significantly diminished in  $\beta$ PKD1KO islets vs. WT islets (Fig. 3A). Insulin content was not significantly different between the 4 genotypes (Fig. 3B). Overall, these data suggest that 1) expression of the MIP-CreERT transgene results in glucose intolerance, lower glucose-induced C-peptide secretion in vivo, but no obvious defect in GSIS ex vivo; and 2) beta-cell PKD1 is dispensable for normal glucose homeostasis in mice under basal conditions. Given the phenotype of the MIP-CreERT mice, this group was used as a control against which the  $\beta$ PKD1KO mice were compared in all subsequent experiments.

**Deletion of PKD1 in beta cells exacerbates hyperglycemia, hyperinsulinemia, and glucose intolerance under high-fat diet.** We administered a high-fat diet (58% calories from fat) to a second cohort of MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice for 12 weeks, beginning at week 0 (3 weeks after tamoxifen injections). PKD1 protein levels assessed by Western blot of isolated islets confirmed that PKD1 remained significantly reduced in  $\beta$ PKD1KO islets compared to MIP-CreERT islets after 12 weeks of diet (Suppl. Fig 1C&D). During the 12-week diet, caloric intake (Fig. 4A) and weight gain (Fig. 4B) were not different between both groups, except for a transient increase in weight gain in  $\beta$ PKD1KO mice between weeks 5 and 7

(Fig. 4B). Lean (Fig. 4C) and fat (Fig. 4D) mass respectively decreased and increased in response to high-fat feeding, but were not different between both genotypes. Fed and fasted glucose (Fig. 4E&F) and insulin (Fig. 4G&H) levels were similar between normal-chow fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice. In contrast, high-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice became more severely hyperglycemic than high-fat fed MIP-CreERT mice after 8 weeks, especially in the fed state. This was accompanied by elevated levels of circulating insulin (Fig. 4G&H). OGTTs were performed following a 4-h fast in chow and high-fat diet fed groups at weeks 8 and 12 (Fig. 5). As expected, glucose intolerance (Fig. 5A&B) and hyperinsulinemia (Fig. 5C&D) were observed in both high-fat fed groups during the OGTT.  $\beta$ PKD1KO mice were more severely glucose intolerant than MIP-CreERT mice at week 8 (Fig. 5A), although this difference was no longer significant at week 12 (Fig. 5B). Insulin levels during the OGTT were not different between both genotypes (Fig. 5C&D). These data indicate that beta-cell specific PKD1 deletion exacerbates high-fat diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia and glucose intolerance.

**Deletion of PKD1 in beta cells is associated with defective GSIS in high-fat fed mice.** A cohort of MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice underwent catheterization under general anesthesia after 12 weeks of diet and were allowed to recover from surgery while on the same respective diet regimen, after which insulin secretion in vivo was assessed by hyperglycemic clamps (Fig. 6). Target blood glucose levels during the clamp were achieved in all 4 groups and were stable between 50 and 80 minutes (Fig. 6A). High-fat fed MIP-CreERT mice displayed a robust insulin response to glucose during the clamp (Fig. 6B), both at early time points (Fig. 6C) and during the steady-state period (Fig. 6D). In contrast, the glucose-stimulated insulin response of high-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice was significantly reduced compared to high-fat fed MIP-CreERT mice (Fig. 6B) and indistinguishable from that of chow-fed controls (Fig. 6B-D). Similar to insulin, C-peptide levels during the steady state of the clamp were increased in high-fat fed MIP-CreERT but not  $\beta$ PKD1KO mice (Fig. 6E). The glucose infusion rate (Fig. 6F) during the

clamp and M/I index of insulin sensitivity (Fig. 6G) trended lower in both high-fat fed groups, suggestive of insulin resistance, but were not different between  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice. Taken together, these data indicate that deletion of PKD1 in beta cells impairs insulin secretion in vivo after high-fat feeding.

To examine whether this phenotype was associated with defective GSIS ex vivo, we performed 1-h static incubations of islets isolated from high-fat fed mice. While insulin secretion in response to 2.8 and 8.3 mmol/L glucose was similar between  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice (Fig. 7A), the stimulation index calculated as insulin secretion at 16.7 mmol/L glucose / insulin secretion at 2.8 mmol/L glucose was significantly reduced in  $\beta$ PKD1KO islets (Fig. 7B) without changes in insulin content (Fig. 7C). This was not associated with significant changes in islet mass or total islet number (Suppl. Fig. 2), although high-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice tended to have a greater proportion of larger islets (Suppl. Fig. 2D).

## Discussion

The objective of this study was to delineate the contribution of PKD1 in beta cells to glucose homeostasis. To this aim, we analyzed the metabolic consequence of beta-cell specific PKD1 deletion in mice under basal conditions and in response to high-fat feeding. We showed that  $\beta$ PKD1KO mice became more hyperglycemic, hyperinsulinemic and glucose intolerant than control MIP-CreERT mice under high-fat diet. High-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice had defective GSIS in hyperglycemic clamps in vivo and in isolated islets ex vivo, without significant changes in islet mass. Our findings demonstrate a key contribution of PKD1 to the beta-cell functional adaptation to high-fat feeding.

Under normal diet, both MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO mice became glucose intolerant with age as compared to PKD1<sup>fl/fl</sup> or WT mice (Fig. 1), suggesting that this phenotype was due to the MIP-CreERT transgene rather than

deletion of PKD1. Although insulin levels were not significantly lower during the OGTT (Fig. 1), C-peptide levels during the hyperglycemic clamps were significantly reduced (Fig. 2), which likely contributes to the glucose intolerance. As all mice in our study were on the same C57Bl/6N background, the difference between Cre-expressing (MIP-CreERT and  $\beta$ PKD1KO) and non-Cre-expressing (PKD1<sup>fl/fl</sup> and WT) mice is likely due to the human growth hormone minigene included in the MIP-CreERT transgene [14]. In a previous study [14] we observed normal glucose tolerance in MIP-CreERT mice of similar age (equivalent to week 0 in this study) on the C57Bl/6J background, an observation subsequently confirmed by Carboneau et al. [19]. We attribute the apparent discrepancy (at week 8 and 12 in this study) to the fact that both of these previous studies used MIP-CreERT mice on a C57Bl/6J background while ours were on a C57Bl/6N background. Such possibility is supported by the known phenotypic differences between the 6J and 6N sub-strains [16; 20-23]. These findings further highlight the importance of including Cre-expressing mice as controls for beta-cell specific knockout mice generated with the MIP-CreERT construct [13; 14].  $\beta$ PKD1KO mice were very similar to MIP-CreERT mice under normal diet (Fig. 1&2), suggesting that beta-cell PKD1 is dispensable for glucose tolerance and insulin secretion under basal conditions, although we cannot entirely rule out the possibility that the glucose intolerance due to expression of the Cre transgene might have masked a subtle phenotype induced by PKD1 deletion.

As expected, oleate potentiation of GSIS was reduced in islets from  $\beta$ PKD1KO mice (Fig. 3), although this reduction was less pronounced than previously observed in PKD1<sup>fl/fl</sup> islets transduced with an adenovirus encoding Cre [7]. This suggests that sustained deletion of PKD1 for several weeks in the present study might have triggered compensatory mechanisms not observed upon acute PKD1 knockdown in isolated islets.

During the course of high-fat feeding,  $\beta$ PKD1KO mice exhibited more severe hyperglycemia, hyperinsulinemia, and glucose intolerance than their MIP-CreERT littermates (Fig. 4&5). The possibility that this was due to more

severe insulin resistance in high-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice appears unlikely since the M/I index of insulin sensitivity calculated from the hyperglycemic clamps at the end of the diet period was not different from that of MIP-CreERT mice (Fig. 6). The difference in glucose tolerance between high-fat fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice was no longer significant after 12 weeks (Fig. 5). This could be due to the fact that glucose tolerance in mice is largely independent of insulin secretion dynamics, especially under elevated insulin concentrations [24]. Regardless of any differences in insulin sensitivity or glucose effectiveness between  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice, fasting and fed hyperglycemia (Fig. 4) and oral glucose intolerance (Fig. 5) in high-fat fed  $\beta$ PKD1KO mice are indicative of a defect in beta-cell compensation. This conclusion is supported by the results of the hyperglycemic clamps (Fig. 6) and static incubations of isolated islets (Fig. 7), both demonstrating a defect in GSIS after 13 weeks of high-fat diet.

The observed defect in GSIS in  $\beta$ PKD1KO mice is in agreement with previous findings indicating a positive correlation between PKD1 activity and insulin secretion. An increase in PKD1 activity in beta cells resulting from the loss of mitogen-activated protein kinase p38  $\delta$  [11] or peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  [25] enhances GSIS and improves glucose tolerance. Conversely, down-regulation of PKD1 in insulin-secreting cell lines reduces GSIS [9; 11] and defective PKD1 activation in phosphorylation-deficient M(3)-muscarinic receptor mutant mice (M3RKI) decreases GSIS and glucose tolerance [8]. In contrast, our data indicating that islet mass was not altered in  $\beta$ PKD1KO mice (Suppl. Fig. 2) diverge from previous studies supporting a role of PKD1 in beta-cell proliferation and survival [11; 25].

Previously we demonstrated that PKD1 is necessary for GPR40-mediated potentiation of GSIS in response to long-chain fatty acids [7]. High-fat fed mice deficient for GPR40 secrete significantly less insulin in response to glucose [5], a profile that resembles the phenotype of the high-fat fed  $\beta$ PKD1KO described in this study. This similarity is consistent with an important role of PKD1 in the GPR40 signaling cascade. PKD1 is necessary

for the replenishment of insulin granules [7; 9; 10], hence it is tempting to speculate that delayed renewal of this vesicle pool in  $\beta$ PKD1KO mice may yield a more profound phenotype under metabolic stress of high-fat feeding, when insulin demand is higher, than under basal conditions. Further studies will be required to elucidate the precise molecular whereby PKD1 is implicated in functional beta-cell compensation.

In conclusion, we provide the first in vivo and ex vivo analysis of a beta-cell specific PKD1 knock-out mouse and show that PKD1 in beta cells is dispensable under basal conditions but necessary for the compensatory increase in GSIS in response to high-fat feeding, furthering our understanding of the implication of this kinase in the control of beta-cell function.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP 86545 to VP) and the National Institutes of Health (R01DK092616 and P30DK020595 to LHP). VP holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. K.V. was supported by a postdoctoral fellowship from the Fond de Recherche Québec Santé.

We thank Eric Olson of the University of Texas Southwestern Medical Center for providing key reagents; G. Fergusson and M. Éthier of the Rodent Metabolic Phenotyping core facility of the CRCHUM for performing the clamp studies; M. Guévremont, J. Morin and the Cellular Physiology Service core of the CRCHUM for quantification of islet mass; and C. Tremblay (CRCHUM) for valuable technical assistance.

V.B. designed the experiments and acquired the data. V.B., J.G. and V.P. researched data, analyzed the results, and wrote the manuscript. K.V. acquired the data. V.P. conceived and designed the project. N.T., L.H.P. and J.F. provided key reagents. All authors revised the manuscript and approved the final version. V.P. is the guarantor of this work and, as such, takes full responsibility for the work. The authors have no relevant conflict of interest to disclose. Parts of this study were presented in abstract form at the 74th

Scientific Sessions of the American Diabetes Association, San Francisco,  
CA, 13-17 June 2015.



## References

1. Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:1802-1812
2. Ahren B: Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:369-385
3. Ghislain J, Poitout V: The Role and Future of FFA1 as a Therapeutic Target. *Handb Exp Pharmacol* 2017;236:159-180
4. Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V: GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 2007;56:1087-1094
5. Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V: The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes* 2008;57:2432-2437
6. Alquier T, Peyot ML, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, Ronald Kahn C, Smith RD, Jetton TL, Metz TO, Prentki M, Poitout V: Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* 2009;58:2607-2615
7. Ferdaoussi M, Bergeron V, Zarrouki B, Kolic J, Cantley J, Fielitz J, Olson EN, Prentki M, Biden T, MacDonald PE, Poitout V: G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia* 2012;55:2682-2692
8. Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P, Jones D, Wess J, Hamdan FF, Werry T, Rosethorne EM, Charlton SJ, Munson SE, Cragg HA, Smart AD, Tobin AB: M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:21181-21186
9. Gehart H, Goginashvili A, Beck R, Morvan J, Erbs E, Formentini I, De Matteis MA, Schwab Y, Wieland FT, Ricci R: The BAR domain protein

Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Developmental cell* 2012;23:756-768

10. Saini DK, Karunarathne WK, Angaswamy N, Saini D, Cho JH, Kalyanaraman V, Gautam N: Regulation of Golgi structure and secretion by receptor-induced G protein betagamma complex translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:11417-11422

11. Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R: Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 2009;136:235-248

12. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:3059-3063

13. Tamarina NA, Roe MW, Philipson L: Characterization of mice expressing Ins1 gene promoter driven CreERT recombinase for conditional gene deletion in pancreatic beta-cells. *Islets* 2014;6:e27685

14. Oropeza D, Jouvret N, Budry L, Campbell JE, Bouyakdan K, Lacombe J, Perron G, Bergeron V, Neuman JC, Brar HK, Fenske RJ, Meunier C, Sczelecki S, Kimple ME, Drucker DJ, Sreaton RA, Poitout V, Ferron M, Alquier T, Estall JL: Phenotypic Characterization of MIP-CreERT1Lphi Mice With Transgene-Driven Islet Expression of Human Growth Hormone. *Diabetes* 2015;64:3798-3807

15. Fu A, Ng AC, Depatie C, Wijesekara N, He Y, Wang GS, Bardeesy N, Scott FW, Touyz RM, Wheeler MB, Sreaton RA: Loss of Lkb1 in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. *Cell metabolism* 2009;10:285-295

16. Fergusson G, Ethier M, Guevremont M, Chretien C, Attane C, Joly E, Fioramonti X, Prentki M, Poitout V, Alquier T: Defective insulin secretory

response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab* 2014;3:848-854

17. Moulle VS, Vivot K, Tremblay C, Zarrouki B, Ghislain J, Poitout V: Glucose and fatty acids synergistically and reversibly promote beta cell proliferation in rats. *Diabetologia* 2017;60:879-888

18. Briaud I, Harmon JS, Kelpel CL, Segu VB, Poitout V: Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 2001;50:315-321

19. Carboneau BA, Le TD, Dunn JC, Gannon M: Unexpected effects of the MIP-CreER transgene and tamoxifen on beta-cell growth in C57Bl/6J male mice. *Physiol Rep* 2016;4

20. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A, Quarterman J, Freeman HC, Ashcroft FM, Cox RD: A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57Bl/6J mice. *Diabetologia* 2005;48:675-686

21. Aston-Mourney K, Wong N, Kebede M, Zraika S, Balmer L, McMahon JM, Fam BC, Favaloro J, Proietto J, Morahan G, Andrikopoulos S: Increased nicotinamide nucleotide transhydrogenase levels predispose to insulin hypersecretion in a mouse strain susceptible to diabetes. *Diabetologia* 2007;50:2476-2485

22. Fontaine DA, Davis DB: Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57Bl/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes* 2016;65:25-33

23. Attane C, Peyot ML, Lussier R, Zhang D, Joly E, Madiraju SR, Prentki M: Differential Insulin Secretion of High-Fat Diet-Fed C57Bl/6NN and C57Bl/6NJ Mice: Implications of Mixed Genetic Background in Metabolic Studies. *PloS one* 2016;11:e0159165

24. Pacini G, Thomaseth K, Ahren B: Contribution to glucose tolerance of insulin-independent vs. insulin-dependent mechanisms in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2001;281:E693-703

25. Iglesias J, Barg S, Vallois D, Lahiri S, Roger C, Yessoufou A, Pradevand S, McDonald A, Bonal C, Reimann F, Gribble F, Debril MB, Metzger D, Chambon P, Herrera P, Rutter GA, Prentki M, Thorens B, Wahli W: PPARbeta/delta affects pancreatic beta cell mass and insulin secretion in mice. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:4105-4117

## Figure Legends

**Figure 1: Age-related changes in oral glucose tolerance and insulin levels in  $\beta$ PKD1KO and control mice.** Blood glucose (A-C) and plasma insulin (D-F) in mice during OGTT at week 0 (A,D) and after 8 (B,E) and 12 weeks (C,F) on normal diet. Data are mean  $\pm$  SEM of 5 to 10 animals per group. \*  $p < 0.05$  compared to WT following two-way ANOVA with Dunnett post hoc adjustment for multiple comparisons.

**Figure 2: Hyperglycemic clamps in  $\beta$ PKD1KO and control mice.** Blood glucose (A) and plasma insulin (B) in mice during hyperglycemic clamps performed after 13 weeks on normal diet. Average plasma insulin (C), average plasma C-peptide (D), GIR (E), and M/I index (F) as assessed during the steady-state of the clamp (50 to 80 min). Data are mean  $\pm$  SEM of 7 to 11 animals per group. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  compared to WT following one-way ANOVA with Dunnett post hoc adjustment for multiple comparisons.

**Figure 3: Insulin secretion from  $\beta$ PKD1KO and control mouse islets ex vivo.** Insulin secretion presented as a percentage of islet insulin content was assessed in 1-hour static incubations in response to glucose in the absence or presence of oleate (A). Total islet insulin content (B). Data are mean  $\pm$  SEM of 7 to 10 animals per group. \*  $p < 0.05$  compared to WT following two-way ANOVA with Dunnett post hoc adjustment for multiple comparisons.

**Figure 4: Glucose homeostasis in chow and high-fat diet fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice.** Caloric intake (A), weight gain (B), lean (C) and fat (D) mass and fed (E&G) and 4-hour fasted (F&H) blood glucose (E&F) and plasma insulin (G&H) in normal (ND) or high-fat (HF) diet fed mice at the week indicated (A, B, E-H) or at week 12 (C, D). Data are mean  $\pm$  SEM of 9 to 13 animals per group. &  $p < 0.05$  compared to respective ND control or \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  comparing  $\beta$ PKD1KO-HF to MIP-CreERT-HF following two-way ANOVA with Tukey post hoc adjustment for multiple comparisons. (£) values were obtained at time 0 during the OGTT.

**Figure 5: Oral glucose tolerance and insulin levels in chow and high-fat diet fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice.** Blood glucose (A&B) and plasma insulin (C&D) in mice during OGTT following 8 (A&C) or 12 (B&D) weeks of normal chow (ND) or high-fat (HF) diet. Data are mean  $\pm$  SEM of 9 to 12 animals per group. &  $p < 0.05$  and &&  $p < 0.01$  compared to respective ND control or \*\*  $p < 0.01$  compared to MIP-CreERT-HF following two-way ANOVA with Tukey post hoc adjustment for multiple comparisons.

**Figure 6: Hyperglycemic clamps in chow and high-fat diet fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice.** Blood glucose (A) and plasma insulin (B) in mice during hyperglycemic clamps after 13 weeks on normal chow (ND) or high-fat (HF) diet. Area under the curve (AUC) for plasma insulin during the first 15 min (C) and average insulin (D), average C-peptide (E), GIR (F) and M/I index (G) as assessed during the clamp (50 to 80 min). Data are mean  $\pm$  SEM of 7 to 12 animals per group. &  $p < 0.05$  compared to respective ND control or \*  $p < 0.05$  comparing  $\beta$ PKD1KO-HF to MIP-CreERT-HF following two-way ANOVA with Tukey post hoc adjustment for multiple comparisons.

**Figure 7: Insulin secretion from high-fat fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mouse islets ex vivo.** Insulin secretion presented as a percentage of islet insulin content was assessed in 1-hour static incubations in response to glucose (A). Stimulation index calculated by the ratio of insulin secretion at 16.7 mmol/L / insulin secretion at 2.8 mmol/L glucose (B) and total islet insulin content (C). Data are mean  $\pm$  SEM of 6 to 7 replicate experiments. \*  $p < 0.05$  compared to MIP-CreERT following one-tailed Student's *t*-test.

**Supplementary Figure 1: PKD1 protein levels in  $\beta$ PKD1KO and control mice.** Representative Western blots (A&C) and quantification (B&D) of PKD1 and tubulin (as a loading control) protein expression in islet extracts from mice 3 weeks following tamoxifen injection (A&B) or after 12 weeks of high-fat diet (C&D). Data are mean  $\pm$  SEM of 4 to 9 animals in each group. \*\*  $p < 0.01$  compared to WT following one-way ANOVA with Dunnett post hoc test (B) or \*\*\*  $p < 0.001$  compared to MIP-CreERT following two-tailed Student's *t*-test (D).

**Supplementary Figure 2: Islet morphometry in chow and high-fat diet fed  $\beta$ PKD1KO and MIP-CreERT mice.** Beta-cell area (A), islet mass (B), islet number per pancreas section (C) and islet size distribution (D) after 13 weeks on normal (ND) or high-fat (HF). Data are mean  $\pm$  SEM of 7 to 12 animals in each group. \*  $p < 0.05$  compared to MIP-CreERT-HF following two-way ANOVA with Tukey post hoc adjustment for multiple comparisons.

**Figure 1**

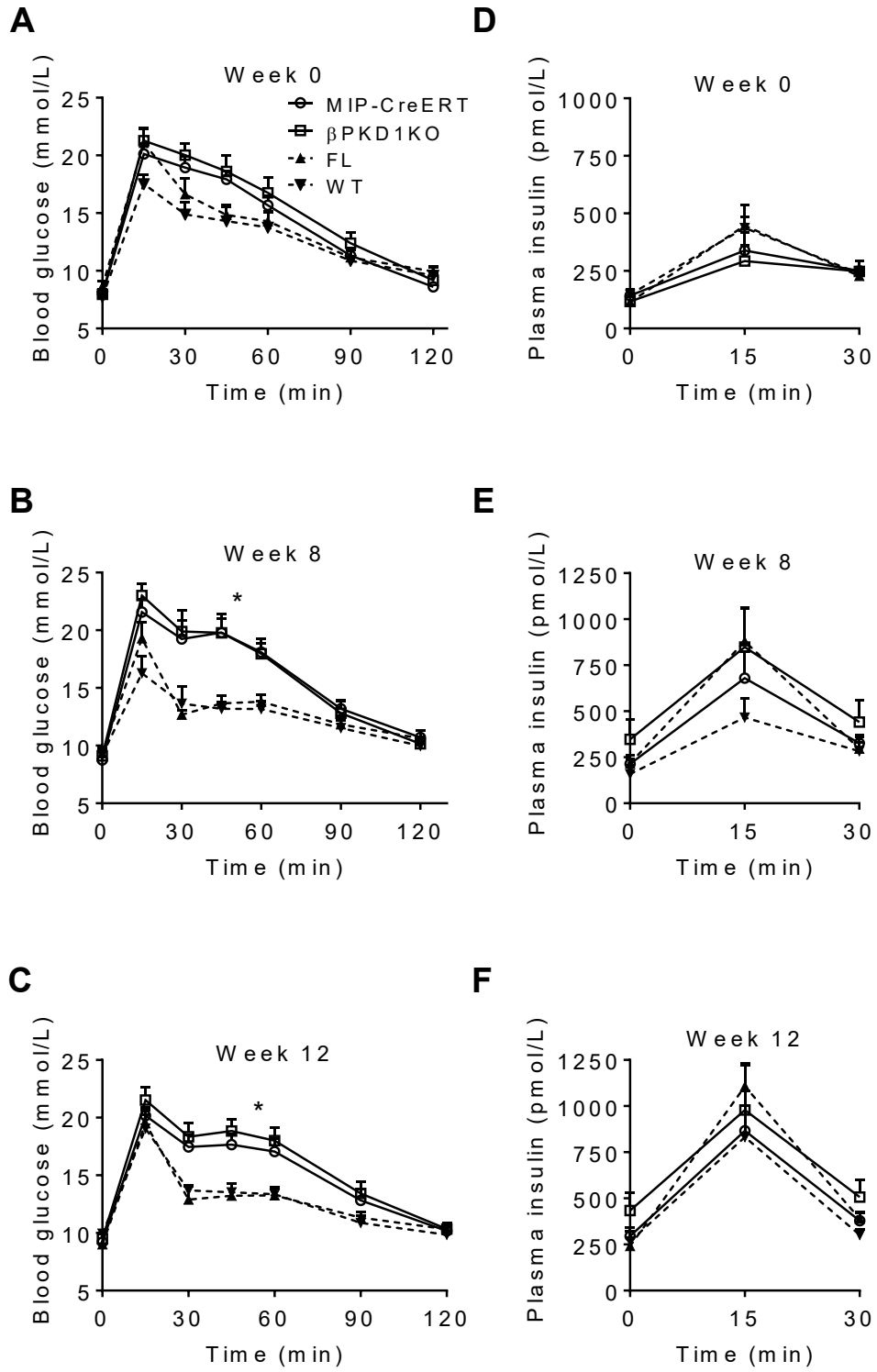
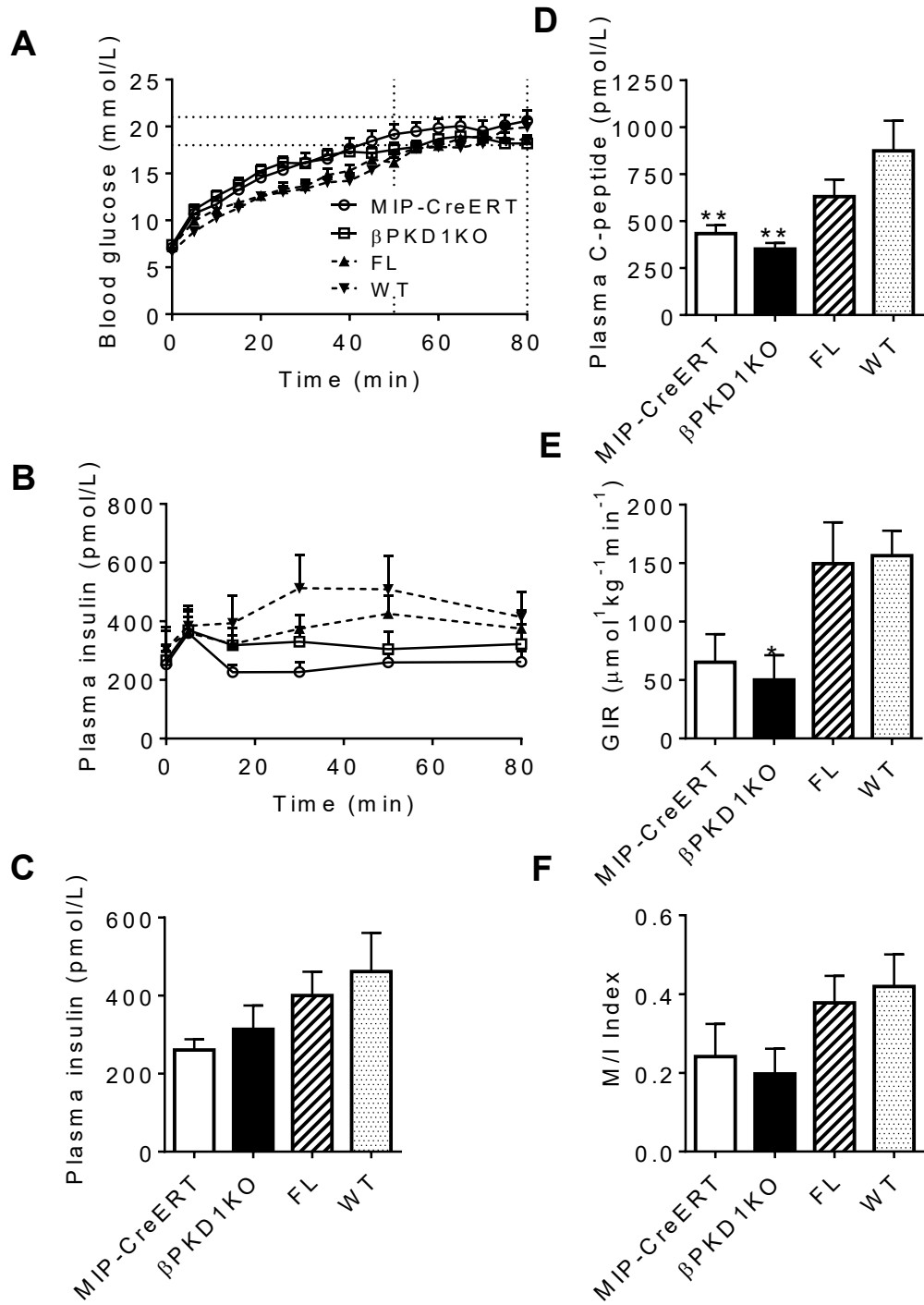
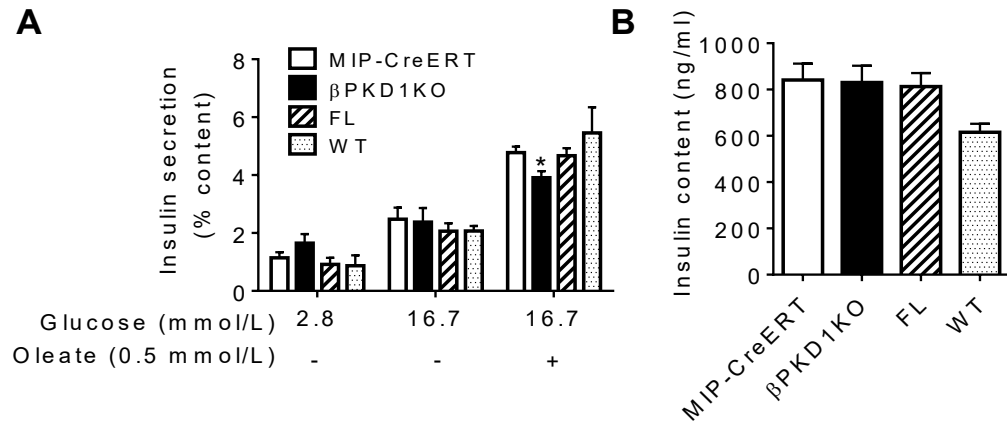




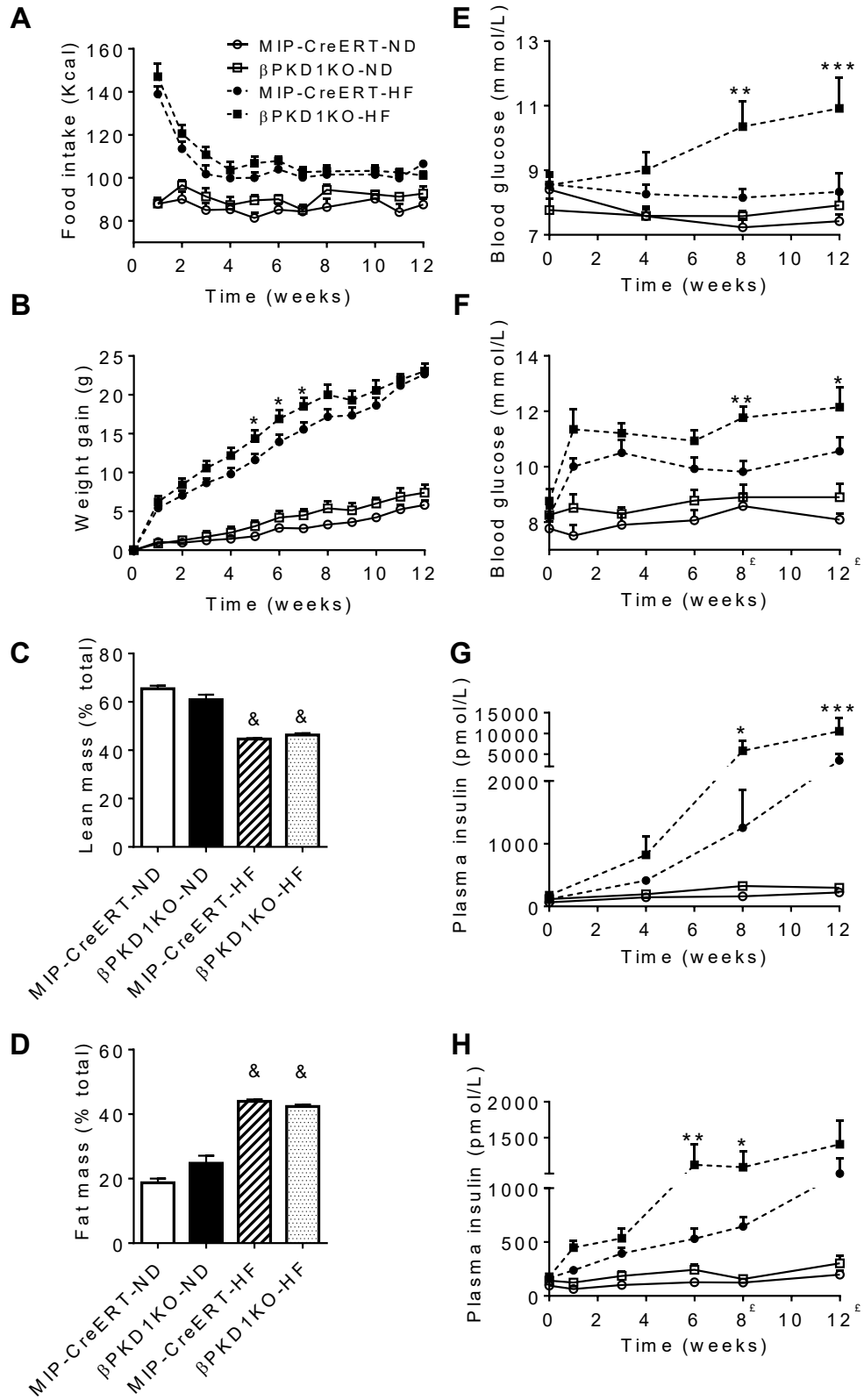
Figure 2



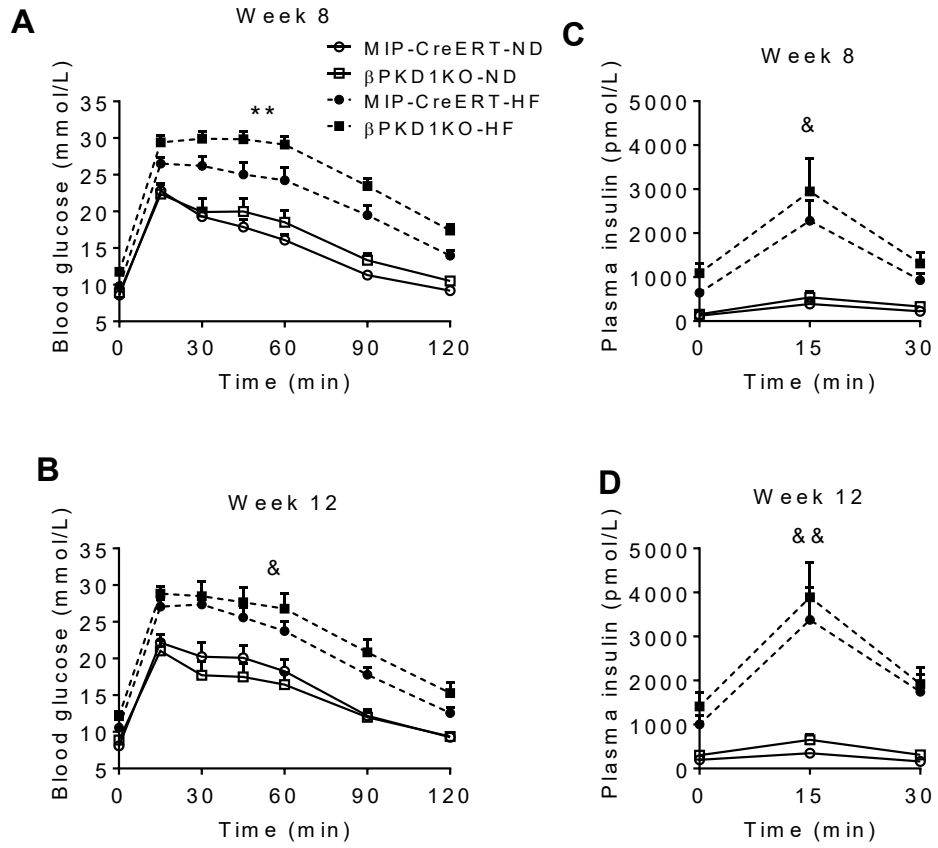
**Figure 3**



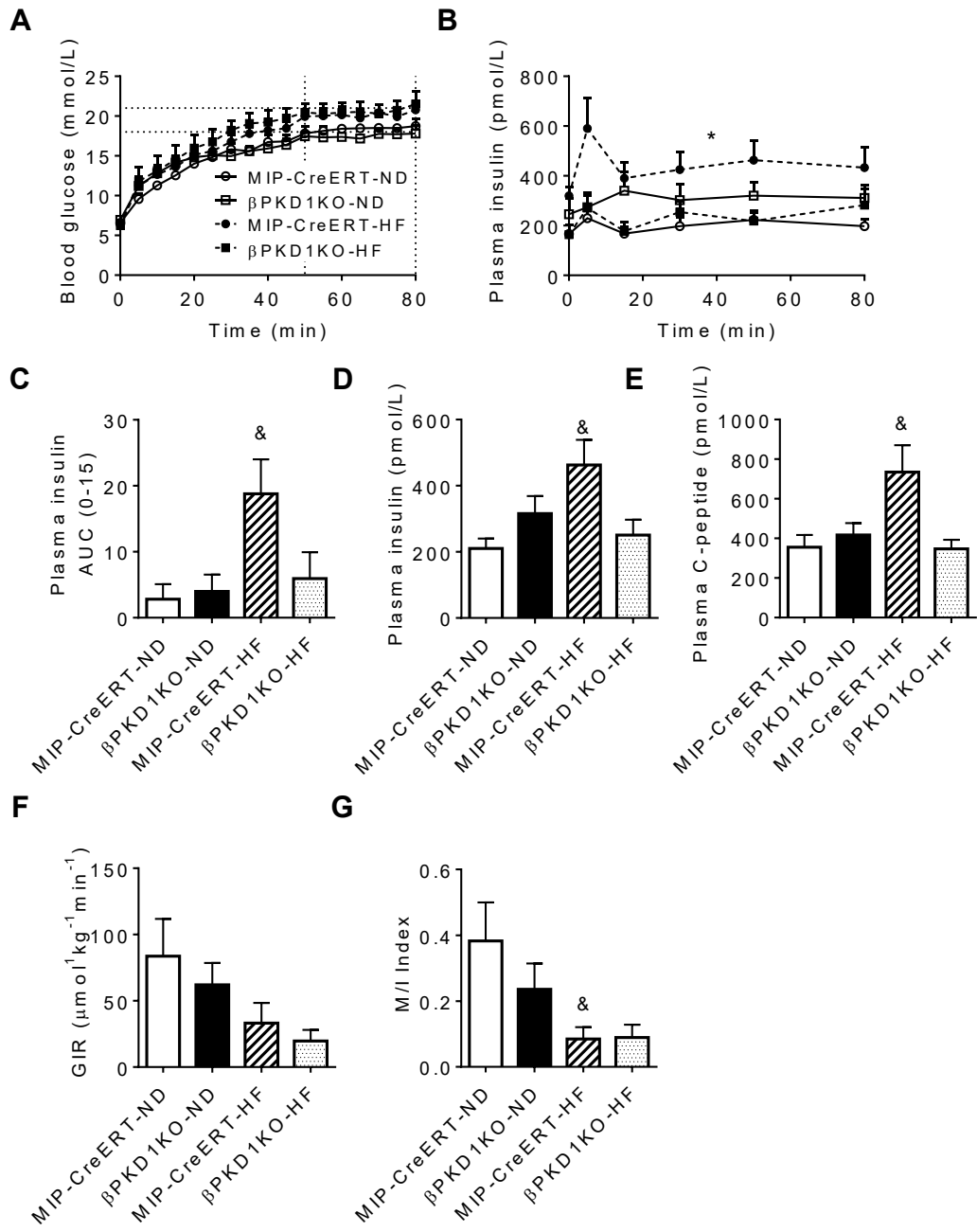
**Figure 4**



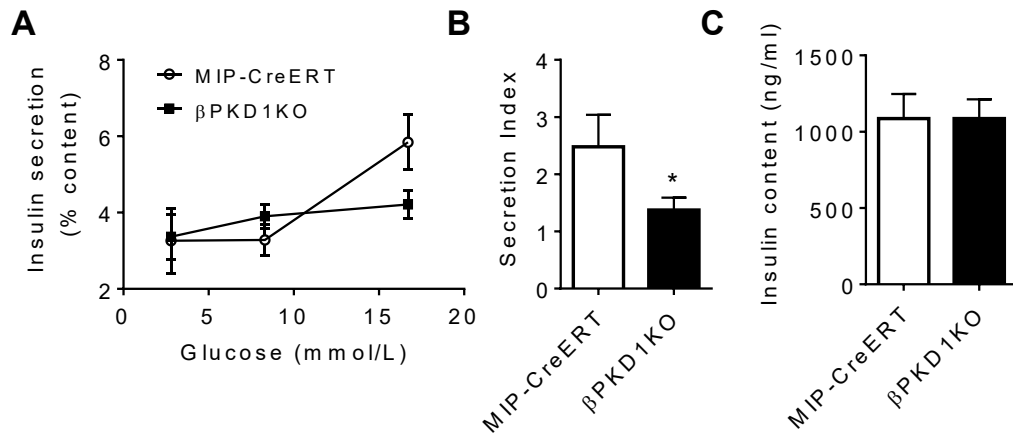
**Figure 5**



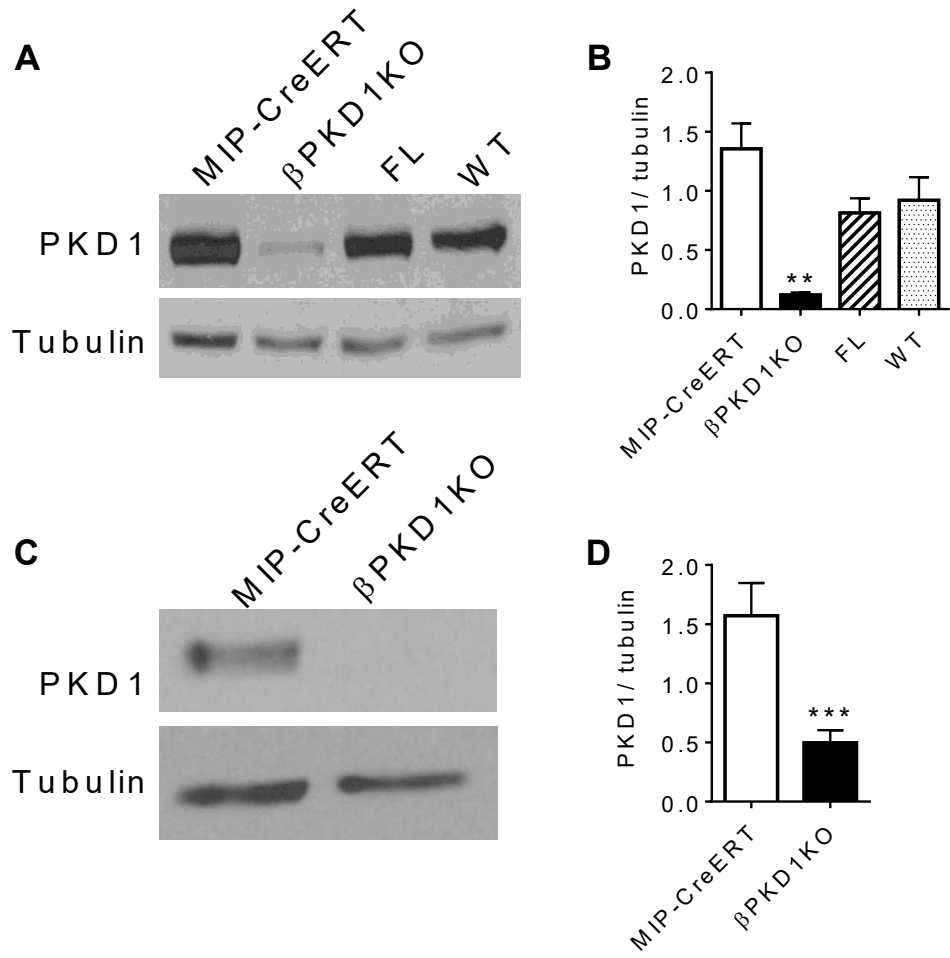
**Figure 6**



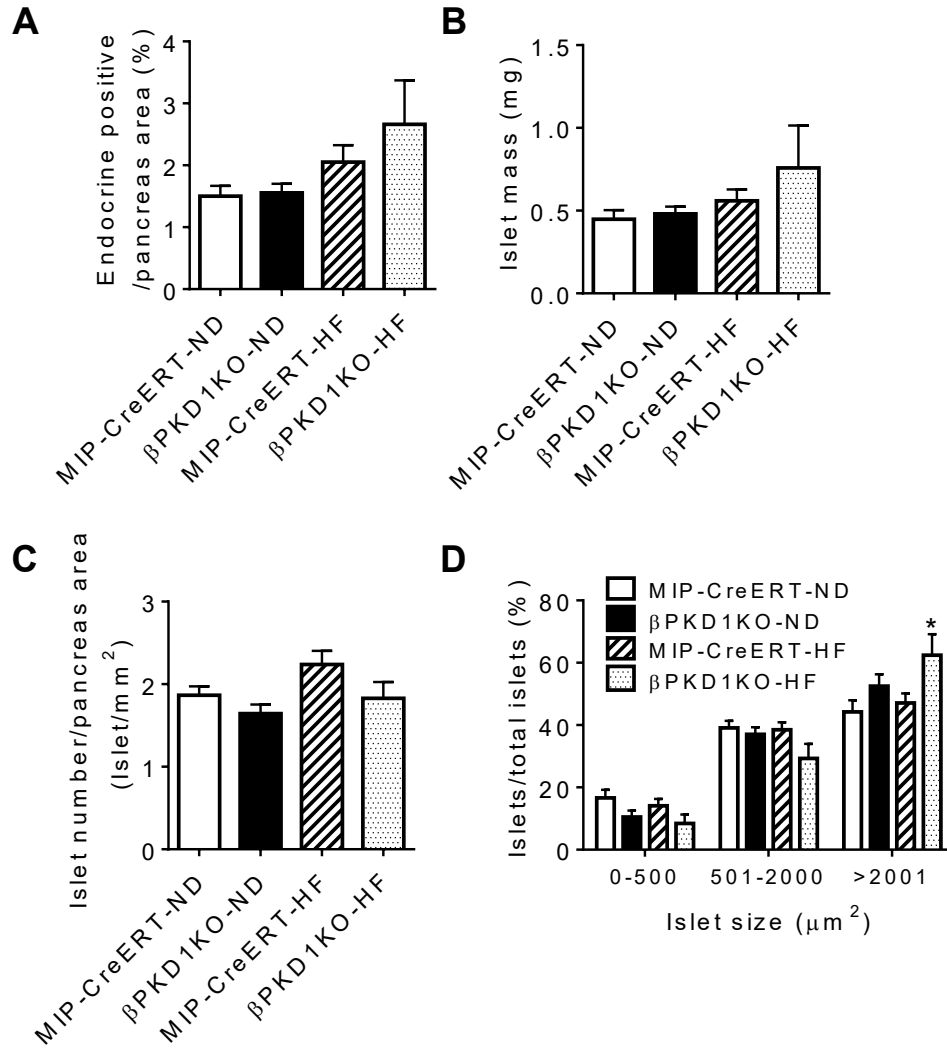
**Figure 7**



### Supplementary Figure 1



**Supplementary Figure 2**





## **Discussion de l'article 3**

### **Rappel des résultats**

Dans le troisième article de cette thèse, nous avons observé que PKD1 est essentielle dans l'îlot de Langerhans afin d'obtenir une augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline provoquée par une diète riche en lipides. En premier lieu, nous avons établi que la souris transgénique exprimant la CRE<sup>ERT</sup> (protéine CRE associée au récepteur d'estrogène (ERT)) en aval du promoteur de l'insuline (MIP-CreERT) constitue le meilleur groupe témoin pour les souris déficientes pour PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques ( $\beta$ PKD1KO). En effet, les souris exprimant la recombinaise CRE<sup>ERT</sup> développent une intolérance au glucose comparativement aux souris sauvages. Néanmoins, les souris MIP-CreERT et  $\beta$ PKD1KO sur une diète normale ont une prise alimentaire, une prise de poids et une tolérance au glucose similaires. Les souris  $\beta$ PKD1KO sur une diète riche en lipides développent cependant une hyperglycémie et une hyperinsulinémie plus marquées comparativement aux souris MIP-CreERT. Nous avons aussi observé un défaut important de la sécrétion d'insuline durant le clamp hyperglycémique chez les souris  $\beta$ PKD1KO comparativement aux souris MIP-CreERT suivant une diète riche en lipides. Ce défaut de sécrétion d'insuline n'est pas dû à une différence significative de la taille des îlots ou de la masse des cellules endocrines du pancréas chez les souris  $\beta$ PKD1KO.

### **Interprétation des résultats**

Notre étude a permis de démontrer que la présence de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique est essentielle pour obtenir une augmentation compensatoire adéquate de la sécrétion d'insuline à la suite d'une diète riche en lipides.

Lors de cette étude, nous avons remarqué que le phénotype des souris  $\beta$ PKD1KO est comparable aux souris GPR40KO. D'une part, les souris  $\beta$ PKD1KO sur diète normale présentent une tolérance au glucose

similaire aux souris MIP-CreERT. Nous avons précédemment remarqué que l'absence de GPR40 n'affecte pas la tolérance au glucose des souris sur une diète normale (89). La taille des îlots de Langerhans et la masse de cellules endocrines du pancréas des souris  $\beta$ PKD1KO ne sont pas différentes des souris MIP-CreERT. De même, la masse de cellules bêta pancréatiques n'est pas altérée chez les souris GPR40KO (98). En réponse à une diète riche en lipides, les souris  $\beta$ PKD1KO deviennent hyperglycémiques plus rapidement que les souris MIP-CreERT. Nous avons précédemment remarqué que l'absence de GPR40 accélère elle aussi l'apparition de l'hyperglycémie induite par une diète riche en lipides (178). Les souris  $\beta$ PKD1KO sur une diète riche en lipides sécrètent moins d'insuline que les souris MIP-CreERT en réponse à une administration intraveineuse de glucose durant le clamp hyperglycémique. Nous avons remarqué précédemment que l'absence de GPR40 chez les souris sur une diète riche en lipides provoque elle aussi une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une administration intraveineuse de glucose (178). Les profils d'insulinémies des souris  $\beta$ PKD1KO et des souris GPR40KO sont ainsi très similaires. Comme PKD1 est une cible en aval de la voie de signalisation du récepteur GPR40 (article 1), il est fort probable que le phénotype des souris GPR40KO en réponse à une diète riche en lipides soit dû à une activité réduite de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique de ces souris.

Cependant, l'absence de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique affecte de manière beaucoup plus significative la tolérance au glucose en réponse à une diète riche en lipides que l'absence du récepteur GPR40. En effet, à la suite d'une administration de glucose par voie orale, les glycémies et les insulinémies mesurées dans les souris GPR40KO sont très similaires aux souris sauvages après 8 et 11 semaines d'une diète riche en lipides (178, 180). Seule une étude démontre que les glycémies des souris GPR40KO sont plus élevées que les souris sauvages après une diète riche en lipides, mais ces glycémies ne sont pas significativement différentes et l'administration de glucose pour ce test de tolérance était par voie

intrapéritonéale (179). Ainsi, il est intéressant de constater que les glycémies sont significativement plus élevées chez les souris  $\beta$ PKD1KO après 8 semaines de diète riche en lipides alors que les insulinémies mesurées à la suite d'une administration de glucose par voie orale sont similaires aux souris MIP-CreERT. Bien que l'intolérance au glucose des souris  $\beta$ PKD1KO ne demeure pas significativement plus élevée que les souris MIP-CreERT après 12 semaines de diète riche en lipides, l'absence de PKD1 dans les cellules bêta pancréatiques aggrave et accélère le développement de l'intolérance au glucose induite par une diète riche en lipides.

L'absence de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique accélère aussi l'apparition de phénotypes associés à une diète riche en lipides. D'une part, les souris  $\beta$ PKD1KO prennent rapidement plus de poids que les souris MIP-CreERT en réponse à une diète riche en lipides. À titre comparatif, le poids des souris GPR40KO sur une diète riche en lipides est à peine plus élevé que les souris sauvages (179). À l'inverse, la prise alimentaire n'est pas significativement plus élevée chez les souris  $\beta$ PKD1KO alors que les souris GPR40KO consomment significativement plus de nourriture que les souris sauvages lorsqu'elles commencent une diète riche en lipides (179). Ainsi, la prise de poids temporairement plus importante chez les souris  $\beta$ PKD1KO est possiblement une conséquence de l'apparition prématurée des autres phénotypes associés à une diète riche en lipides.

L'absence de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique accélère l'apparition de l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induite par une diète riche en lipides. Bien que les souris GPR40KO en réponse à une diète riche en lipides développent elles aussi une hyperglycémie plus rapidement que les souris sauvages, il a été proposé que cette hyperglycémie résulte de leur sécrétion d'insuline réduite (178). Il est donc plus difficile d'expliquer l'hyperglycémie observée chez les souris  $\beta$ PKD1KO en réponse à une diète riche en lipides puisqu'elles sont hyperinsulinémiques. Néanmoins, les souris  $\beta$ PKD1KO présentent un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose des îlots durant les clamps hyperglycémiques après 12 semaines de

diète riche en lipides. Ainsi, ces observations suggèrent que les îlots des souris  $\beta$ PKD1KO durant une diète riche en lipides peuvent produire et sécréter l'insuline, mais qu'ils ne sécrètent pas l'insuline adéquatement en réponse au glucose. Cette conclusion est appuyée ex vivo par la sécrétion d'insuline réduite en réponse au glucose des îlots de souris  $\beta$ PKD1KO suite à une diète riche en lipides. Cette sécrétion d'insuline dérégulée est intéressante puisqu'il est généralement accepté dans la littérature que l'hyperinsulinémie résulte de la compensation de la cellule bêta pancréatique en réponse à la résistance à l'insuline (134). Il est aussi généralement accepté que la compensation à long terme est responsable de la perte de fonction des îlots de Langerhans de patients diabétiques de type 2 qui résulte en une diminution de l'exocytose d'insuline en réponse au glucose (134, 260).

Les insulinémies mesurées chez les souris  $\beta$ PKD1KO semblent plutôt indiquer que la dérégulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ne résulte pas d'un épuisement de la cellule bêta pancréatique. Il est possible que la dérégulation de la sécrétion d'insuline précède la compensation de la cellule bêta pancréatique durant une diète riche en lipides chez les souris  $\beta$ PKD1KO. Ainsi, l'hyperinsulinémie pourrait être une forme de compensation, non pas contre la résistance à l'insuline dans ce modèle animal, mais plutôt contre l'incapacité de la cellule bêta pancréatique à répondre adéquatement au glucose lorsque les souris  $\beta$ PKD1KO sont nourries une diète riche en lipides. Cette hyperinsulinémie chronique compensatoire chez les souris  $\beta$ PKD1KO pourrait alors expliquer la prise de poids plus importante initialement durant la diète riche en lipides. La dérégulation de la sécrétion d'insuline et l'hyperinsulinémie peuvent accélérer et induire le développement de l'obésité (261, 262). Puisque les phénotypes associés à une diète riche en lipides apparaissent plus tôt chez les souris  $\beta$ PKD1KO, il est possible que la résistance à l'insuline apparaisse elle aussi de manière prématurée. Puisque l'index de la sensibilité à l'insuline (*M/I index*) n'est pas différent suivant 12 semaines de diète riche en lipides chez les souris  $\beta$ PKD1KO, il est plus probable que ce soit le moment de l'apparition

de la résistance à l'insuline plutôt que sa sévérité qui explique l'apparition plus rapide de l'intolérance au glucose et de l'hyperglycémie chronique chez les souris  $\beta$ PKD1KO en réponse à une diète riche en lipides.

Il est intéressant d'observer dans cette étude que la perte d'une seule protéine, et ce uniquement dans la cellule bêta pancréatique, est suffisante pour occasionner de telles modifications métaboliques en réponse à une diète riche en lipides. Nos résultats témoignent du rôle essentiel que joue la cellule bêta pancréatique dans le contrôle de l'homéostasie du glucose et la fragilité de cet équilibre glycémique à la moindre dysfonction de la cellule bêta pancréatique.

### **Force de l'étude**

Les études ayant précédemment démontré l'importance de PKD1 pour une sécrétion d'insuline normale in vivo sont parvenues à cette conclusion en corrélant l'activité de PKD1 avec la sécrétion d'insuline (224-226). Notre étude est la première à mesurer la sécrétion d'insuline dans un modèle d'inactivation génique de PKD1. D'une part, l'utilisation d'une stratégie d'inactivation génique de type 'inductible' est nécessaire lorsque l'inactivation de cette protéine est létale à l'étape embryonnaire (263). De plus, l'utilisation d'un modèle in vivo dans lequel la délétion d'une protéine est spécifique à un tissu permet de définir son rôle dans le tissu d'intérêt indépendamment de son rôle potentiel dans les tissus périphériques. Dans cette étude, l'utilisation d'un tel modèle in vivo a permis de mieux observer l'incapacité de la cellule bêta pancréatique déficiente pour PKD1 à s'adapter correctement aux conditions de stress métabolique qui résultent d'une diète riche en lipides.

Une autre force de l'étude est la mesure longitudinale d'insulinémies et de glycémies durant la diète riche en lipides de même que la variété des approches techniques. Ces mesures nous ont permis de bien discerner les différences occasionnées par la perte de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique des souris durant le développement d'un modèle de diabète de type 2. En effet, c'est grâce aux mesures répétitives au cours de la diète riche en lipides que nous avons pu conclure que la perte de PKD1 dans la cellule

bêta pancréatique accélère le développement du diabète de type 2 chez les souris.

### **Limites de l'étude**

Plusieurs modèles animaux utilisés pour générer des rongeurs déficients pour une protéine dans la cellule bêta pancréatique spécifiquement sont critiqués actuellement dans la littérature. Le choix du promoteur pour limiter l'expression de la protéine recombinante CRE<sup>ERT</sup> à la cellule bêta pancréatique est souvent questionné (264). La lignée de souris utilisée dans cette étude pour générer les souris  $\beta$ PKD1KO emploie un promoteur qui permet l'expression de la CRE<sup>ERT</sup> spécifiquement dans la cellule bêta pancréatique (265). Cependant, le transgène codant pour la protéine recombinante CRE<sup>ERT</sup> dans cette lignée contient également un mini-gène codant pour l'hormone de croissance qui affecte la taille des îlots et cause une résistance à l'induction du diabète par la streptozotocine (STZ) chez les rongeurs (266). Dans notre étude, nous avons confirmé que la tolérance au glucose n'est pas modifiée par la présence de la protéine recombinante CRE<sup>ERT</sup> peu de temps après l'administration de tamoxifène (266). Cependant, nous avons remarqué que huit et douze semaines plus tard la tolérance au glucose est diminuée chez les souris exprimant la protéine CRE<sup>ERT</sup> comparativement aux souris sauvages. Notre observation est comparable au profil observé dans une autre étude (267). Notre étude rejoint ainsi plusieurs études publiées récemment qui révèlent les limites de l'utilisation de la souris transgénique exprimant CRE<sup>ERT</sup>.

Une hypothèse évoquée dans cette thèse est que la déficience pour PKD1 dans la cellule bêta pancréatique accélère le développement de la résistance à l'insuline chez les souris  $\beta$ PKD1KO en réponse à une diète riche en lipides. La résistance à l'insuline chez les souris  $\beta$ PKD1KO durant une diète riche en lipides résulterait de l'apparition prématurée de l'hyperinsulinémie chez ces souris. Une limite de l'étude est ainsi l'absence de mesure spécifique de la sensibilité à l'insuline durant la diète riche en lipides afin d'évaluer cette hypothèse.

Une seconde hypothèse possible est que l'absence de PKD1 affecte la formation des granules d'insuline au niveau du Golgi dans les cellules bêta pancréatiques (211). Ainsi, il est possible que les modifications post-traductionnelles de l'insuline nécessaires afin que cette dernière soit mature et fonctionnelle sur les tissus périphériques ne soient pas réalisées (*Figure 5*). Ainsi, une limite de l'étude est l'absence de mesures des niveaux de proinsuline circulants après huit semaines de diète riche en lipides. Ces mesures auraient permis d'évaluer si un problème de maturation de l'insuline est la source de cette apparente insensibilité à l'action de l'insuline chez les souris  $\beta$ PKD1KO.

### **Travaux Futurs**

Dans cette étude, nous avons établi que PKD1 est importante dans la cellule bêta pancréatique afin d'obtenir une sécrétion d'insuline appropriée en réponse à une diète riche en lipides. La prochaine étape serait maintenant d'identifier les cibles de PKD1 qui sont responsables des modifications observées chez les souris  $\beta$ PKD1KO lors d'une diète riche en lipides. Une telle cible pourrait être PAK4, identifiée dans l'article précédent de cette thèse comme étant une composante importante de la voie de signalisation du récepteur GPR40. Une autre cible potentielle de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique est l'AMPK.

L'intérêt d'étudier l'AMPK dans les souris  $\beta$ PKD1KO relève de deux caractéristiques intéressantes de cette protéine. D'une part, la phosphorylation d'AMPK par PKD1 a été observée dans les cellules musculaires squelettiques et cette phosphorylation inhibe de manière importante son activité kinase (268). L'activité d'AMPK dans la cellule bêta pancréatique est aussi fortement influencée par le statut énergétique et elle est diminuée de manière significative dans les îlots de souris après 8 semaines de diète riche en lipides (269). Comme les insulinémies des souris  $\beta$ PKD1KO sont différentes des souris MIP-CreERT de manière plus importante lorsque les souris sont nourries que lorsqu'elles sont à jeun, il est possible que les cibles de PKD1 soient influencées par le statut énergétique

de la cellule bêta pancréatique. Il serait donc intéressant pour des travaux futurs de déterminer si PKD1 influence l'activité de protéines qui ne sont pas actuellement associées au récepteur GPR40 lors d'une diète riche en lipides.

## **Conclusions**

Cette étude a permis d'élucider pour la première fois le rôle de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique chez la souris durant une diète riche en lipides. Plus précisément, cette étude a permis d'identifier que PKD1 est nécessaire pour obtenir l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline induite par le glucose à la suite d'une diète riche en lipides. Cette étude a aussi déterminé que l'absence de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique accélère le développement de l'intolérance au glucose, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie en réponse à une diète riche en lipides.



## **Discussion et Perspectives**

Durant les années de recherches qui ont mené aux articles présentés dans cette thèse, plusieurs agonistes pour le récepteur GPR40 ont été testés en études cliniques. Plusieurs compagnies sont en effet parvenues à produire un agoniste synthétique pour le récepteur GPR40 dans le but de traiter le diabète de type 2. Bien que les résultats de ces essais cliniques aient démontré le potentiel thérapeutique du récepteur du GPR40, ils ont aussi mis à l'évidence la difficulté que représente le transfert des connaissances obtenues avec des rongeurs vers une utilisation chronique chez l'humain.

Malgré le fort potentiel comme cible thérapeutique du récepteur GPR40, les études publiées portant sur l'utilisation d'agonistes pour GPR40 chez les humains sont présentement très rares. La compagnie japonaise *Japan Tobacco* a effectué une étude clinique de phase 2 avec un agoniste pour GPR40, soit le composé JTT-851, mais aucun résultat n'a été publié (270, 271). De même, la compagnie Piramal a commencé une étude clinique de phase 1 avec son agoniste pour GPR40, le composé P11187 (272, 273). Cependant, aucun résultat de cette étude n'a été partagé depuis la 74<sup>e</sup> session scientifique de l'association américaine du diabète (ADA) en 2014, date à laquelle remonte la dernière modification du statut de cette étude.

Afin de mieux évaluer la portée des résultats de cette thèse pour la communauté scientifique, il est essentiel d'établir en premier lieu les limites des agonistes synthétiques pour le récepteur GPR40 dont les résultats sont actuellement publiés. En effet, bien que la majorité des études démontrent le potentiel thérapeutique du récepteur GPR40, ces études témoignent aussi à quel point il est difficile de générer un agoniste pour le récepteur GPR40 qui ne provoque pas d'effets secondaires.

# **GPR40 : toujours une cible thérapeutique?**

## **Les agonistes pour GPR40 en étude clinique**

### **Le composé TAK-875 de TAKEDA**

En 2010, la compagnie TAKEDA a commencé à synthétiser le composé TAK-875, une molécule administrée oralement qui peut interagir avec le récepteur GPR40 chez le rat et potentialiser la sécrétion d'insuline induite par l'administration orale de glucose (274). Ces résultats ont été reproduits avec des rats provenant d'une lignée plus propice au développement du diabète de type 2 à l'intérieur de la colonie de rats Zucker dont l'obésité est causée par une mutation du récepteur à la leptine (ZDF) (275). En effet, l'administration de TAK-875 chez ces rats réduisait leur intolérance au glucose en potentialisant leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose administré oralement (276). De plus, 6 heures suivant son administration orale, TAK-875 parvenait à réduire l'hyperglycémie à jeun de ces rats diabétiques de manière significative (276). Ces résultats étaient très encourageants puisque les rats utilisés dans cette étude présentent un phénotype de diabète de type 2 comparable aux humains (275) et les glycémies et les insulinémies mesurées à la suite de l'administration de TAK-875 chez ces rats étaient comparables aux valeurs obtenues suivant l'administration d'une sulfonylurée (276).

Renommé Fasiglifam dans le but de sa commercialisation, TAK-875 a ensuite été donné aux humains souffrant du diabète de type 2. Certaines doses quotidiennes de TAK-875 ont permis de diminuer d'environ 1% l'HbA1c chez ces patients (277). Ces résultats ont prouvé que malgré l'expression diminuée du récepteur GPR40 dans les îlots d'humains souffrant du diabète de type 2, le récepteur GPR40 demeure suffisamment présent à la membrane cellulaire pour être une cible potentielle pour le traitement du diabète de type 2 (182). De plus, TAK-875 provoquait dix fois moins d'épisodes hypoglycémiques que l'utilisation d'une sulfonylurée au cours de cette étude (277). Malheureusement, des effets secondaires sérieux ont été

observés durant l'étude clinique de phase 3 de TAK-875 (278). Bien que l'utilisation du composé TAK-875 sur une plus grande population ait confirmé les résultats obtenus durant l'étude de phase 2 concernant le contrôle glycémique chez les patients, l'étude de phase 3 a révélé des effets toxiques sur le foie. En effet, les valeurs de la fonction hépatique des patients n'étaient pas considérées « différentes significativement » durant cette étude, mais elles étaient considérées suffisamment « cliniquement anormales » pour que l'essai de phase 3 soit arrêté (278). Un communiqué de presse de la compagnie sur le sujet a rapidement été diffusé en 2013 et toutes les recherches cliniques avec le composé TAK-875 ont été interrompues (279).

Il faut noter cependant que les effets secondaires observés chez 5 à 7% des patients exposés à TAK-875 étaient très variés. Ces derniers incluent le cancer utérin, l'ischémie du myocarde, le cancer gastrique, le cancer du côlon, l'infarctus cérébral de même que la mort causée par un infarctus du myocarde aigu (278). Le récepteur GPR40 n'étant pas exprimé dans tous les organes impliqués (96), il est raisonnable de proposer que les effets secondaires résultent d'effets non spécifiques de la molécule TAK-875 et non pas de l'activation accrue du récepteur GPR40. De plus, l'élimination du composé TAK-875 se fait principalement par le foie et il semble influencer le transport des acides biliaires et de la bilirubine (280). Il est donc possible que les effets toxiques du composé TAK-875 ne résultent pas directement de l'activation chronique du récepteur GPR40.

### **Le composé LY2881835 et LY2922470 de Eli Lilly**

Présenté lors de la 72<sup>e</sup> session scientifique de l'ADA en 2012 (281), le composé LY2881835 semblait lui aussi très prometteur durant les études précliniques. Ce composé pouvait potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose chez les îlots humains ex vivo, de même que celle induite par une injection intrapéritonéale de glucose chez la souris (282). Le composé LY2881835 pouvait aussi potentialiser la sécrétion d'insuline induite par une administration orale de glucose chez le rat Zucker obèse (282). Cette augmentation de la sécrétion d'insuline provoquait une diminution de la

glycémie plus efficace que la drogue contrôle de l'étude, le rosiglitazone (282). Fait intéressant, le composé LY2881835 induisait une augmentation de la concentration sanguine de GLP-1 chez la souris (282). Pour des raisons pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, la compagnie a choisi d'étudier un composé similaire au LY2881835 chez l'humain. En effet, la demi-vie plus longue du composé LY2922470 permettait de limiter la prise du composé à une ou deux doses orales par jour (282). L'administration de LY2922470 pendant un mois a permis de réduire la glycémie de manière significative chez les patients souffrant du diabète de type 2 (282). Tout comme pour TAK-875, aucun épisode hypoglycémique n'a été observé chez ces patients (282). Malgré les résultats encourageants du composé LY2922470, aucune autre proposition d'étude clinique n'a été soumise pour ce composé. Bien que la compagnie n'ait pas partagé avec la communauté scientifique l'apparition d'effets secondaires, certaines de leurs critiques stipulent que des effets secondaires ont été observés chez des individus et expliquent ainsi l'arrêt d'études cliniques avec cet agoniste (283). Puisque des effets indésirables ont été observés chez l'humain avec les composés TAK-875 et LY2922470, il n'est pas surprenant que peu d'agonistes pour GPR40 aient été étudiés chez l'humain depuis la publication de ces études.

## **Les agonistes pour GPR40 en études précliniques**

### **Le composé CNX-011-67 de Connexios Life Sciences**

Présenté lors de la 71<sup>e</sup> session scientifique de l'ADA en 2011 (284), le composé CNX-011-67 est un agoniste de GPR40 qui semble actuellement être toujours en étude préclinique (285). Tout comme le composé TAK-875, le composé CNX-011-67 peut potentialiser la sécrétion d'insuline chez les rats ZDF et réduire la glycémie de manière significative à la suite d'une administration de glucose par voie orale (286). Le composé CNX-011-67 permet aussi de ramener à des valeurs physiologiques normales la sécrétion d'insuline et la tolérance au glucose de souris traitées avec la STZ, un agent toxique pour les cellules bêta pancréatiques qui réduit la sécrétion d'insuline

(287). L'augmentation de l'insulinémie chez ces souris traitées avec la STZ est très impressionnante considérant que la masse de cellules bêta pancréatiques est réduite chez ces souris (287). Le composé CNX-011-67 présente aussi un fort potentiel pour le traitement du diabète de type 2 puisqu'il potentialise la sécrétion d'insuline d'îlots provenant de patients souffrant du diabète de type 2 et ce seulement en réponse à des concentrations élevées de glucose (287). En plus, une étude a démontré que le composé CNX-011-67 réduit la sécrétion de glucagon d'îlots de rats cultivés dans des conditions glucolipotoxiques (288). La concentration de glucagon circulant étant élevée chez les personnes souffrant du diabète de type 2 (131), le composé CNX-011-67 est un composé prometteur pour le traitement du diabète de type 2. Néanmoins, à l'heure actuelle aucune étude clinique avec ce composé n'a été enregistrée.

### **Les agonistes d'AMGEN**

En 2011, la compagnie AMGEN a elle aussi publié un papier décrivant leurs recherches pour un agoniste synthétique de GPR40 (289). Dans cette étude, les chercheurs ont démontré que l'administration du composé AMG-837 réduit la glycémie suivant l'administration orale de glucose chez les souris si elles ne sont pas déficientes pour GPR40 (289). Cette diminution de la glycémie résulte vraisemblablement de l'augmentation de la sécrétion d'insuline, puisque le composé AMG-837 potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ex vivo si les îlots de souris expriment GPR40 (290). L'administration orale du composé AMG-837 augmente aussi la sécrétion d'insuline en réponse à une administration intrapéritonéale de glucose chez les rats obèses Zucker et améliore significativement leur tolérance au glucose (290). Bien que le composé AMG-837 soit parvenu à compléter la phase 1 de son étude clinique (291), la compagnie AMGEN a poursuivi leurs recherches avec d'autres composés synthétiques plus intéressants que le composé AMG-837.

En effet, la compagnie a découvert qu'en modifiant la structure chimique de la molécule AMG-837, l'agoniste devient beaucoup plus efficace

(292). Le nouveau composé, appelé AMG-1638, potentialise de manière beaucoup plus significative que le composé AMG-837 la sécrétion d'insuline des souris dont le diabète est induit par une diète riche en lipides (292). Fait intéressant, tout comme pour le composé LY2881835, une portion de la potentialisation de la sécrétion d'insuline par le composé AMG-1638 est due à son activité sur les cellules entéroendocrines (293). En effet, en plus de potentialiser la sécrétion d'insuline en interagissant directement avec la cellule bêta pancréatique, le composé AMG-1638 augmente significativement la concentration sanguine de GLP-1 et GIP (293). AMG-1638 semble avoir beaucoup de potentiel pour le traitement du diabète de type 2 puisqu'il parvient à augmenter les concentrations d'insuline et de GLP-1 chez des souris souffrant d'un diabète sévère causé par une diète riche en lipides et des injections de STZ (293). Le composé AMG-1638 améliore ainsi la tolérance au glucose chez ces souris de manière plus importante qu'un inhibiteur de la DPP-4 qui sert de contrôle dans l'étude (293). Malgré les résultats très encourageants chez les rongeurs, au moment d'écrire cette thèse aucune étude clinique avec le composé AMG-1638 n'est publiée.

#### **Le composé DS-1558 de Daiichi Sankyo**

La compagnie japonaise Daiichi Sankyo a étudié le pouvoir hypoglycémiant de deux agonistes pour GPR40. Le premier composé étudié peut potentialiser la sécrétion d'insuline et réduire la glycémie en réponse à une administration de glucose par voie orale chez les rats ZDF de manière comparable à l'inhibiteur de la DPP-4 sitagliptine (294). Puisque la pharmacocinétique de ce premier agoniste n'est pas optimale, la compagnie a modifié plusieurs composantes de sa structure afin de prolonger sa demi-vie (295, 296). Le composé résultant de ces modifications, nommé DS-1558, peut potentialiser la sécrétion d'insuline chez les rats Sprague Dawley en réponse au glucose administré par voie intraveineuse (296). Le composé DS-1558 peut aussi potentialiser la sécrétion d'insuline et réduire la glycémie en réponse à une administration de glucose par voie orale chez les rats ZDF

(295). Pourtant, au moment d'écrire cette thèse, aucune demande d'étude sur les humains avec le composé DS-1558 n'a été proposée.

### **Le composé B et C de Merck**

Les composés B et C potentialisent la sécrétion d'insuline d'îlots isolés de souris seulement si elles expriment GPR40 (177). Le composé B permet aussi d'augmenter de manière significative la sécrétion d'insuline induite par le glucose durant la perfusion d'un pancréas de rat dont le diabète est induit par la STZ (177). Le composé C permet pour sa part de réduire la glycémie en réponse au glucose administré par voie intrapéritonéale chez la souris seulement si elle exprime le récepteur GPR40 (177). L'administration du composé B permet aussi de réduire la glycémie de souris nourries avec une diète riche en lipides durant un test de tolérance au glucose lorsque ce dernier est administré par voie intrapéritonéale (177). La sécrétion d'insuline en réponse au composé B et C n'est pas publiée cependant. Il est donc improbable que ces agonistes seront étudiés chez les humains dans un avenir rapproché.

### **Le composé SAR1 de Sanofi**

Présenté à la session scientifique de l'ADA la même année que le composé CNX-011-67, le composé SAR1 est défini comme étant un agoniste de GPR40 (297). Les résultats les plus récents démontrent que ce composé peut potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans des pancréas de rats perfusés (298). Cependant, cette potentialisation de la sécrétion d'insuline est moindre que la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse à l'ajout de GLP-1 ou de Lixisenatide (298). Il est donc peu probable que les recherches avec ce composé se poursuivent puisqu'il n'est pas aussi puissant que les autres traitements actuellement sur le marché.



## **Les agonistes pour GPR40 non conventionnels**

### **Le composé GW-9508 de GlaxoSmithKline (GSK)**

Tout comme AMGEN, la compagnie GSK a choisi d'étudier leur agoniste GW-9508 pour GPR40 sur des souris (299). Comme les agonistes d'AMGEN, GW-9508 potentialise la sécrétion d'insuline et il réduit la glycémie à la suite d'une administration de glucose par voie intrapéritonéale chez les souris sauvages (299). L'administration du composé GW-9508 permet aussi de réduire la glycémie à jeun des souris nourries avec une diète riche en lipides (299). De plus, le composé GW-9508 parvient à réduire la glycémie en réponse à une injection de glucose par voie intrapéritonéale chez des souris nourries avec une diète riche en lipides, et ce à des valeurs similaires aux souris nourries avec une diète normale (299).

L'effet hypoglycémiant du composé GW-9508 ne résulte pas uniquement de son effet sur la sécrétion d'insuline (299). Les chercheurs ont remarqué que le composé GW-9508 restaure la sensibilité à l'insuline du foie et des muscles squelettiques (299). Les chercheurs ont même remarqué chez les souris nourries avec une diète riche en lipides que le composé GW-9508 augmente le contenu en glycogène de leur foie et que cet effet dépend partiellement de la présence du récepteur GPR40 à la surface des hépatocytes (299). Ce résultat est plutôt surprenant puisqu'il implique que le composé GW-9508 interagit avec d'autres cibles que le récepteur GPR40. Pourtant, ce n'est pas le seul effet observé avec le composé GW-9508 qui diffère de ceux observés avec les autres agonistes pour GPR40. En effet, le composé GW-9508 peut aussi réduire la production de cytokines par les cellules épithéliales en réponse à des agents inflammatoires (300). Ces résultats particuliers pourraient être le résultat de l'activation de la voie Gi par cet agoniste (300). Comme le composé GW-9508 provoque des effets secondaires indépendamment de son interaction avec le récepteur GPR40, il n'est pas surprenant que la compagnie GSK n'ait pas entamé une étude clinique avec cet agoniste non spécifique.

## **Le composé AS2034178 d'Astellas Pharma**

La compagnie Astellas Pharma a obtenu elle aussi des effets positifs avec son agoniste pour GPR40 qui ne résulte pas d'une augmentation de la sécrétion d'insuline. Son composé AS2034178 peut potentialiser la sécrétion d'insuline et réduire la glycémie chez les souris sauvages et les rats Zucker obèses durant un test de tolérance de glucose administré par voie orale (301). L'administration chronique du composé AS2034178 réduit aussi le pourcentage d'HbA1c de souris dont l'obésité est causée par une mutation du gène de la leptine (ob/ob) (301). Étonnamment, cette diminution de la glycémie n'est pas causée par une augmentation de l'insulinémie chez ces souris. C'est plutôt une diminution de l'hyperinsulinémie et une augmentation du contenu en insuline des pancréas qui sont observées (301). La diminution du pourcentage d'HbA1c induite par le composé AS2034178 ne résulte pas non plus d'une diminution du poids de ces souris (301). En comparaison aux drogues hypoglycémiantes servant de contrôles pour l'étude, le composé AS2034178 induit des modifications chez les souris ob/ob qui sont très similaires à la pioglitazone (301). Le composé AS2034178 réduit de manière plus significative que la metformine le pourcentage d'HbA1c et l'hyperinsulinémie de ces souris ob/ob (301).

Contrairement aux agonistes GPR40 décrit précédemment, le composé AS2034178 diminue la glycémie à jeun des rats Zucker obèses tout en diminuant la sécrétion d'insuline à jeun (301). Le composé AS2034178 parvient à ce résultat impressionnant en augmentant l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques et en réduisant la production hépatique de glucose des rats Zucker obèses (301). Les chercheurs de cette étude ont conclu que l'effet hypoglycémiant du composé AS2034178 chez ces rongeurs résulte principalement d'une amélioration de la sensibilité des tissus périphériques au glucose et à l'insuline plutôt que d'un effet du composé AS2034178 sur la sécrétion d'insuline elle-même (301). Ces conclusions contredisent fortement les résultats obtenus avec les autres agonistes pour GPR40.

## **La lipophilie élevée des agonistes pour GPR40**

### **Le composé TUG-770 de l'Université du Danemark du Sud**

Des chercheurs de l'université du Danemark du Sud ont aussi synthétisé des agonistes pour le récepteur GPR40. En dose aiguë ou chronique, leur composé TUG-770 améliore la tolérance au glucose chez la souris de même que chez le rat (302). Cette diminution de la glycémie en réponse au glucose résulte d'une augmentation de la sécrétion d'insuline (302). Des analogues du composé TUG-770 réussissent aussi lors de tests de tolérance au glucose à réduire la glycémie des souris sauvages à des valeurs similaires à celles obtenues avec la sitagliptine (303). Néanmoins, les chercheurs ont profité de l'optimisation de leurs agonistes pour GPR40 pour partager avec la communauté scientifique leurs résultats avec des composés lipophiles qui expliquent probablement les effets toxiques observés avec certains agonistes pour GPR40.

### **Les conséquences d'une lipophilie élevée**

Puisque les agonistes endogènes du récepteur GPR40 sont des acides gras, les agonistes synthétiques pour ce récepteur sont généralement très lipophiles (282). Aussi connue comme étant le coefficient de partition ou le logP d'un composé, la lipophilie est une caractéristique souhaitée puisqu'elle indique que le composé peut facilement être absorbé à travers les membranes phospholipidiques. Une lipophilie élevée favorise aussi l'interaction du composé avec les protéines plasmatiques qui favorisent sa distribution vers les organes cibles. Un composé lipophile interagit aussi plus facilement avec sa protéine cible grâce à son aptitude à effectuer un effondrement hydrophobe, soit un repliement qui favorise la formation de liaisons hydrophobes avec les cavités hydrophobes d'une protéine cible (304).

Malheureusement, une lipophilie élevée peut aussi réduire l'efficacité d'un composé. En effet, plus l'interaction du composé avec les protéines plasmatiques est forte, plus la fraction du composé dans la circulation qui est

libre d'interagir avec la protéine cible est petite. De plus, la lipophilie élevée d'un composé favorise son interaction avec les sites de liaisons très lipophiles des enzymes cytochromes P450 (CYP) qui le métabolisent dans le foie. Ceci peut théoriquement accélérer son élimination et influencer la demi-vie du composé. Cependant, un composé très lipophile est habituellement plutôt susceptible d'être emmagasiné dans les tissus adipeux. Ainsi, les composés lipophiles sont plus à risque de s'accumuler dans le système et devenir toxiques. Enfin, la disposition plus favorable des composés très lipophiles à effectuer un effondrement hydrophobique les rend plus susceptibles d'interagir avec des protéines autres que leurs cibles. Une lipophilie élevée augmente donc énormément les risques d'interactions secondaires non désirables. Pour ces nombreuses raisons, les drogues orales qui se rendent en phase 2 d'études cliniques possèdent généralement des coefficients de partition faibles (304).

À l'heure actuelle, la lipophilie élevée des agonistes pour GPR40, tels que TAK-875 et les composés d'AMGEN, est tenue responsable de l'arrêt de leurs études cliniques (303). Avec de telles observations, il n'est pas surprenant qu'actuellement les chercheurs essaient de réduire la lipophilie de leurs agonistes pour GPR40 avant de poursuivre leurs études chez les humains (282, 302, 303, 305). De plus, les résultats suggèrent que certains agonistes synthétiques de GPR40 diminuent la glycémie de manière indépendante de la sécrétion d'insuline. Couplé aux nombreux effets observés avec les agonistes pour GPR40 sur des cellules qui ne sont pas des cellules bêta pancréatiques, les résultats précliniques des agonistes pour GPR40 suggèrent que de nombreuses interrogations demeurent concernant les mécanismes d'action de ce récepteur.

## **Poursuivre les recherches sur GPR40**

En plus d'identifier plusieurs composantes de la voie de signalisation du récepteur GPR40, cette thèse permet de mettre en évidence quelques caractéristiques de la voie de signalisation du récepteur GPR40 qui appuient son potentiel comme cible thérapeutique. En plus d'élucider les mécanismes responsables de la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras, cette thèse a confirmé le rôle essentiel que joue le récepteur GPR40 dans la fonction de la cellule bêta pancréatique.

### **GPR40 est actif lorsque la cellule est « au repos »**

Sans induire la sécrétion d'insuline, l'activation du récepteur GPR40 favorise le recrutement des granules à la membrane et facilite leur sécrétion (article 1). Les résultats de cette thèse démontrent que les cibles de la voie de signalisation du récepteur GPR40 sont activées même lorsque les concentrations de glucose sont non-stimulantes (article 2). Il est donc possible de concevoir que l'activation du récepteur GPR40 puisse mieux préparer la cellule bêta pancréatique à une sécrétion d'insuline subséquente si le récepteur est activé lorsque la glycémie n'est pas suffisamment élevée pour induire la sécrétion d'insuline. Dans le même ordre d'idée, il est possible de considérer qu'avec un agoniste pour le récepteur GPR40 les cellules bêta pancréatiques pourraient être « préparées » durant les périodes de la journée où la glycémie est plus faible pour répondre plus rapidement à la prochaine augmentation de la glycémie chez un patient diabétique de type 2. Par exemple, lorsque le composé TAK-875 est ajouté au milieu de préincubation d'îlots de rats, ces îlots sécrètent ensuite significativement plus d'insuline en réponse à une concentration élevée de glucose durant leur première phase de sécrétion (306). Cette potentialisation de la première phase de sécrétion d'insuline s'ajoute à la potentialisation de la seconde phase de sécrétion d'insuline que nous avons observée à la suite de l'activation du récepteur GPR40 (article1) (306). Ainsi, même lorsque la cellule bêta pancréatique semble être au repos, l'activation de la voie de signalisation du récepteur

GPR40 peut amorcer les mécanismes impliqués dans l'exocytose afin d'optimiser la compétence fonctionnelle de la cellule bêta pancréatique.

## **PKD1 est essentielle à la fonction normale de la cellule**

Précédemment, nous avons observé que l'absence du récepteur GPR40 chez la souris réduit l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline en réponse à une diète riche en lipides (178). Nous avons donc conclu que le récepteur GPR40 est essentiel pour la compensation de la cellule bêta pancréatique en réponse à une diète riche en lipides (178). Les résultats présentés dans cette thèse appuient ces conclusions puisque l'absence d'une seule composante de la voie de signalisation du récepteur GPR40, la PKD1, est suffisante pour réduire l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline induite par une diète riche en lipides (article 3). Cependant, nos résultats démontrent que le rôle du récepteur GPR40 ne se limite pas à la compensation de la cellule bêta pancréatique en réponse à la résistance à l'insuline (article 3). En effet, l'absence de PKD1 accélère aussi la dysfonction de la cellule bêta pancréatique. Cette dysfonction de la cellule bêta pancréatique semble même accélérer à son tour le développement des conséquences métaboliques associées à une diète riche en lipides comme l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie (article 3). Ainsi, GPR40 joue potentiellement un rôle essentiel dans la cellule bêta pancréatique afin que cette dernière maintienne une fonction appropriée en réponse à une diète riche en lipides. Son rôle ne se limite donc pas aux étapes distales du développement du diabète de type 2 et son activation pourrait contribuer à préserver la fonction de la cellule bêta pancréatique.

## **La voie de GPR40 : parallèle aux voies dysfonctionnelles**

Les résultats de cette thèse permettent aussi d'appuyer d'un point de vue mécanistique l'intérêt de poursuivre les recherches d'un agoniste pour le

récepteur GPR40. Il est bien établi que le remodelage des filaments d'actine et l'activation des PAKs sont essentiels pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose (60, 61, 237). Il est donc intéressant d'observer que la voie de signalisation du récepteur GPR40 emprunte ces mécanismes de recrutement de granules d'insuline pour potentialiser la sécrétion d'insuline (article 1 et 2). Il est également intéressant de constater que GPR40 emprunte une PAK différente pour activer les mêmes mécanismes activés par le glucose. En effet, alors que PAK1 et PAK7 sont nécessaires à la sécrétion d'insuline induite par le glucose (60, 61, 237), c'est plutôt PAK4 qui est essentielle pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras (article 2).

La réduction de l'expression de PAK1 et de PAK7 est associée à la diminution de la sécrétion d'insuline des îlots de patients diabétiques de type 2 (61, 237). Nos résultats démontrent que la sécrétion d'insuline défectueuse en réponse au glucose dans les cellules déficientes pour PAK7 peut être potentialisée par l'oléate (article 2). Nos résultats suggèrent donc qu'il est théoriquement possible de restaurer les mécanismes impliquant PAK1 et PAK7 en activant PAK4 en aval de GPR40 (article 2). Selon ces observations, le récepteur GPR40 potentialise la sécrétion d'insuline par une voie distincte de celles activées par le glucose, bien qu'ultimement ces voies convergent et empruntent les mêmes mécanismes impliqués dans le recrutement des granules d'insuline. Cette séparation des voies en amont suggère que l'activation de GPR40 pourrait restaurer la sécrétion d'insuline défectueuse en aval de la voie activée par le glucose chez un patient souffrant du diabète de type 2.

De plus, lors de notre étude avec les souris  $\beta$ PKD1KO (article 3), nous avons remarqué que la dysfonction de la cellule bêta pancréatique ne résulte pas nécessairement d'un épuisement de la cellule bêta pancréatique suivant sa compensation (134). Des cellules bêta pancréatiques dysfonctionnelles peuvent synthétiser et sécréter l'insuline puisque les souris  $\beta$ PKD1KO sont hyperinsulinémiques malgré leurs cellules bêta pancréatiques

dysfonctionnelles (article 3). De même, les îlots de Langerhans de patients souffrants du diabète de type 2 parviennent à sécréter l'insuline, seulement leur sécrétion d'insuline est réduite en réponse au glucose (61, 237, 260). Puisque les mécanismes responsables de l'exocytose des granules semblent fonctionnels, il est donc théoriquement possible pour la voie de signalisation en aval du récepteur GPR40 de potentialiser la sécrétion d'insuline afin de restaurer la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ainsi, il est théoriquement possible que les individus à risque de développer le diabète de type 2 puissent tirer profit d'un médicament qui potentialise leur sécrétion d'insuline lorsqu'ils présentent des indices d'une dysfonction de la cellule bêta pancréatique.

## **Réflexions sur les approches thérapeutiques actuelles**

### **La tolérance au glucose ne reflète pas la fonction de la cellule bêta chez la souris**

Actuellement, les médicaments les plus prescrits pour le diabète de type 2 traitent les conséquences de la maladie plutôt que la cause. Par exemple, le médicament le plus souvent prescrit au début de la maladie vise à réduire la production hépatique de glucose (150). Bien qu'un tel médicament traite l'hyperglycémie des patients, les résultats de cette thèse semblent plutôt suggérer que c'est la dysfonction de la cellule bêta pancréatique qui détermine la vitesse à laquelle le diabète de type 2 se développe (article 3). Lors de notre étude, nous avons observé que l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie apparaissent plus rapidement chez les souris qui souffrent d'une dysfonction de la cellule bêta pancréatique (article 3). Selon ces observations, il est fort probable que certains individus souffrent d'une dysfonction de la cellule bêta pancréatique bien avant le moment où nous parvenons à déceler les conséquences de cette dysfonction avec les tests de diagnostics actuellement utilisés.



En effet, la sévérité du diabète des individus est généralement estimée en mesurant leur HbA1c ou à la suite d'un test de tolérance au glucose administré oralement (3). Nous avons pu constater dans notre étude que le test de tolérance au glucose administré par voie orale permet seulement d'estimer la capacité de la souris à éliminer le glucose de sa circulation, non pas d'estimer adéquatement la fonction de la cellule bêta pancréatique (article 3). De plus, une portion de l'élimination du glucose de la circulation est indépendante de l'insuline (307).

Les spécialistes tiennent aussi pour acquis que les cellules bêta pancréatiques qui parviennent à compenser pour la résistance à l'insuline parviennent aussi à fluctuer leur sécrétion d'insuline adéquatement en fonction de la glycémie. Comme nous avons pu l'observer avec les souris  $\beta$ PKD1KO, l'hyperinsulinémie ne corrèle pas avec la capacité des îlots de Langerhans à ajuster leur sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie (article 3). Selon notre étude, l'hyperinsulinémie peut parfois être un mécanisme de compensation pour certaines cellules bêta pancréatiques dysfonctionnelles qui ne sécrètent pas correctement l'insuline en réponse aux glycémies élevées (article 3).

Ainsi, bien qu'un tel test soit plus invasif, il serait peut-être préférable lors des tests de diagnostics de mesurer la sécrétion d'insuline en réponse à une administration intraveineuse de glucose. Un tel test permettrait de bien évaluer la fonction des cellules bêta pancréatiques et de mieux anticiper l'apparition du diabète chez les individus à risque de développer la maladie.

### **Éviter les risques d'aggraver la résistance à l'insuline**

Les sulfonylurées sont actuellement les médicaments les plus prescrits pour stimuler la sécrétion d'insuline et ils induisent la sécrétion d'insuline indépendamment de la glycémie (149-151). En effet, les cellules bêta pancréatiques des personnes souffrant du diabète de type 2 sécrètent l'insuline en réponse aux sulfonylurées, mais elles ne sécrètent pas correctement l'insuline en réponse au glucose (149, 260). De même, les souris  $\beta$ PKD1KO sur une diète riche en lipides ne sécrètent pas correctement

l'insuline en réponse au glucose durant le clamp hyperglycémique, mais elles réussissent à la fin de celui-ci à répondre à un agent dépolarisant (*Figure 23*).

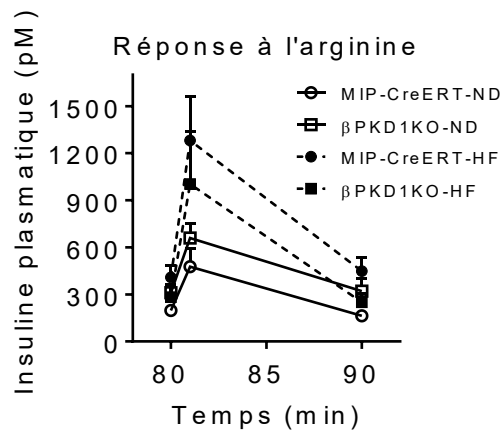


Figure 23 : Sécrétion d'insuline suivant un clamp hyperglycémique en réponse à 1 mmol d'arginine/kg (voir Figure 6 de l'article 3)

Puisque les profils de sécrétions d'insuline des souris  $\beta$ PKD1KO et de patients diabétiques de type 2 partagent des similitudes, il est possible que les conséquences métaboliques d'une sécrétion d'insuline induite indépendamment de la glycémie soient elles aussi très similaires. Nous avons remarqué que l'apparition prématurée de l'hyperinsulinémie pour compenser la dysfonction de la cellule bêta accélère l'apparition de l'intolérance au glucose chez les souris  $\beta$ PKD1KO nourries avec une diète riche en lipides (article 3). Il est raisonnable d'en déduire que l'induction de la sécrétion d'insuline par les sulfonyles peut parfois causer chez les patients diabétiques des conséquences similaires à cette apparition prématurée de l'hyperinsulinémie chez les souris  $\beta$ PKD1KO nourries une diète riche en lipides. Ainsi, l'induction de la sécrétion d'insuline par les sulfonyles a le potentiel d'aggraver la résistance à l'insuline ou l'intolérance au glucose. Comme il n'induit pas la sécrétion d'insuline en l'absence d'une concentration stimulante de glucose, le récepteur GPR40 semble donc être une cible intéressante et moins à risque d'aggraver les phénotypes associés avec le diabète de type 2.

# **L'implication des résultats de cette thèse pour les recherches futures**

## **GPR40 et PAK4 : leur absence accélère-t-elle la dysfonction?**

En plus de réduire la sécrétion d'insuline en réponse au glucose à la fin d'une diète riche en lipides, l'absence de PKD1 dans la cellule bêta pancréatique semble accélérer la dysfonction de la cellule bêta pancréatique chez la souris (article 3). Comme l'absence de GPR40 réduit elle aussi la sécrétion d'insuline en réponse au glucose à la fin d'une diète riche en lipides, nous tenons pour acquis que l'absence du récepteur GPR40 accélère elle aussi la dysfonction des cellules bêta pancréatiques (178). L'absence du récepteur GPR40 ne semble pourtant pas aggraver la dysfonction des cellules bêta pancréatiques lorsqu'elles sont cultivées en conditions glucolipotoxiques pendant 72 heures (89). Il faut noter que l'absence de PKD1 semble accélérer plutôt qu'aggraver certains phénotypes associés à une diète riche en lipides (article 3). Il est donc possible qu'une mesure de l'insuline sécrétée par les cellules bêta pancréatiques après 24 ou 48 heures d'exposition aux conditions glucolipotoxiques ait pu démontrer l'apparition prématurée de la dysfonction des cellules bêta pancréatiques dans les îlots GPR40KO. En effet, si l'absence du récepteur GPR40 accélère la dysfonction de la cellule bêta pancréatique, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose devrait diminuer plus rapidement chez les îlots GPR40KO.

Comme la molécule effectrice PKD1 est nécessaire afin d'éviter la dysfonction prématurée des cellules bêta pancréatiques durant une diète riche en lipides, il est probable que PAK4 soit elle aussi importante pour éviter la dysfonction prématurée des cellules bêta pancréatiques. Non seulement elle est phosphorylée en aval du récepteur GPR40 comme PKD1 (article 1 et 2), mais sa surexpression réduit l'apoptose et favorise la survie des cellules cultivées en condition de stress (236, 240). Il serait donc intéressant de

mesurer la sécrétion d'insuline en réponse au glucose de cellules déficientes pour PAK4 cultivées pendant 24, 48 et 72 heures dans des conditions glucolipotoxiques afin de déterminer si PAK4 joue un rôle dans le maintien de la fonction de la cellule bêta pancréatique.

## **PAK4 : un rôle dans la prolifération induite par les lipides?**

L'infusion de lipides avec le glucose augmente de manière significative la masse de cellules bêta pancréatiques en induisant leur prolifération (308). Cette augmentation de la prolifération est similaire à celle observée durant la période de compensation des cellules bêta pancréatiques au cours du développement du diabète de type 2 (134). Pourtant, cette prolifération ne semble pas dépendre entièrement du développement de la résistance à l'insuline chez les rongeurs (308). Cette prolifération des cellules bêta pancréatiques indépendante de la résistance à l'insuline n'est pas sans rappeler l'hyperinsulinémie « compensatoire » que nous avons observée chez les souris  $\beta$ PKD1KO durant une diète riche en lipides alors qu'elles ne sont pas résistantes à l'insuline (article 3). Il est donc théoriquement possible que la prolifération des cellules bêta pancréatiques soit un mécanisme de compensation pour la dysfonction des cellules bêta pancréatiques tout comme « l'hypersecretion d'insuline » observée chez les souris  $\beta$ PKD1KO durant une diète riche en lipides. Une telle analogie ouvre la porte à l'étude du rôle de GPR40 dans la prolifération des cellules bêta pancréatiques en réponse aux nutriments. Comme PAK4 joue un rôle important dans la prolifération des cellules pancréatiques cancéreuses (239, 240), l'étude du rôle de PAK4 dans la prolifération des cellules bêta pancréatiques en réponse aux acides gras serait aussi très pertinente.

Il est fort probable que GPR40 et ses molécules effectrices soient impliqués à plusieurs niveaux dans le maintien de la fonction et de la masse des cellules bêta pancréatiques dans des conditions riches en glucose et en

lipides puisque leurs absences causent une importante dérégulation de l'insulinémie durant une diète riche en lipides.

## **Activer PAK4 : les risques d'un cancer?**

Une étape critique durant le développement du diabète de type 2 est incontestablement la perte des cellules bêta pancréatiques qui résulte de leur exposition chronique à des conditions glucolipotoxiques (142, 143). La mort cellulaire est souvent associée à l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène, d'intermédiaires lipidiques toxiques pour la cellule et l'apparition de cellules immunitaires inflammatoires dans l'îlot de Langerhans (142, 309). Bien que les agonistes du récepteur GPR40 visent surtout à potentialiser la sécrétion d'insuline, il serait intéressant d'évaluer leur potentiel pour ralentir la mort des cellules bêta pancréatiques. Nous avons démontré que PAK4 est phosphorylée en réponse aux acides gras dans une lignée cellulaire dérivée de cellules bêta pancréatiques (article 2). Dans certaines lignées cellulaires, la surexpression de PAK4 protège les cellules de l'apoptose lorsqu'elles sont exposées aux rayons ultraviolets ou privées de sérum à long terme (236). Il serait donc intéressant d'étudier si l'activation de PAK4 peut protéger, dans une certaine mesure, les cellules bêta pancréatiques de l'apoptose provoquée par une exposition chronique à des conditions glucolipotoxiques.

Dans un même ordre d'idée, il est nécessaire d'étudier les conséquences de l'activation chronique de PAK4 en aval du récepteur GPR40 dans le contexte d'un traitement qui active ce récepteur. Comme l'activation de PAK4 est associée aux adénocarcinomes d'origine pancréatique (239, 240), il est essentiel d'étudier le rôle de PAK4 dans la survie et la prolifération des cellules bêta pancréatiques. Il serait irresponsable d'administrer un agoniste pour GPR40 sans évaluer préalablement les risques de développer un cancer pancréatique lors de l'activation constante de PAK4 en aval du récepteur GPR40.

## **Conclusion**

Dans leur ensemble, les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont permis de mieux définir les mécanismes impliqués dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline en aval du récepteur GPR40. D'une part, les travaux appuient d'un point de vue mécanistique le potentiel du récepteur GPR40 comme cible thérapeutique. Il est possible de restaurer une sécrétion d'insuline défectueuse en réponse au glucose par une voie activée par les acides gras, puisque les acides gras parviennent à potentialiser une telle sécrétion d'insuline. Le récepteur GPR40 potentialise aussi la sécrétion d'insuline en empruntant des voies similaires à celles activées par le glucose lorsque ce dernier induit la sécrétion d'insuline. En effet, l'activation du récepteur GPR40 favorise le remodelage des filaments d'actine et la phosphorylation d'une kinase activée par P21 qui sont essentiels à la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras. D'autre part, les travaux de cette thèse confirment le rôle essentiel que joue le récepteur GPR40 dans l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline durant une diète riche en lipides. En effet, l'absence d'une seule molécule effectrice de la voie de signalisation du récepteur GPR40 est suffisante pour accélérer la dysfonction de la cellule bêta pancréatique. Les travaux de cette thèse ont non seulement permis d'identifier PKD1 comme étant une molécule effectrice dans la voie de signalisation du récepteur GPR40, mais aussi de démontrer ex vivo et in vivo son rôle important pour la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.

En plus de mieux définir la voie de signalisation du récepteur GPR40, les travaux de cette thèse ont permis d'explorer une nouvelle hypothèse pour le développement du diabète de type 2. En effet, l'apparition prématurée de l'hyperinsulinémie chez les souris  $\beta$ PKD1KO nourries une diète riche en lipides suggère que l'hypersinsulinémie ne résulte pas toujours d'une compensation de la cellule bêta pancréatique face à la résistance à l'insuline. L'hyperinsulinémie peut parfois être une conséquence de l'incapacité de la cellule bêta pancréatique à ajuster sa sécrétion d'insuline en fonction de la

glycémie. Ainsi, cette thèse conforte la possibilité que la dysfonction de la cellule bêta pancréatique ne résulte pas toujours de l'épuisement de la cellule bêta pancréatique. Il est donc possible que la dysfonction de la cellule bêta pancréatique précède parfois la compensation et l'épuisement des cellules bêta pancréatiques. Cette thèse propose donc que le récepteur GPR40 et les composantes de sa voie de signalisation soient non seulement nécessaires à la potentialisation de la sécrétion d'insuline, mais aussi au bon fonctionnement de la cellule bêta pancréatique en réponse à un stress métabolique.

Malgré les échecs des agonistes du récepteur GPR40 en essais cliniques, les enregistrements récents d'études cliniques avec de nouveaux agonistes illustrent l'intérêt toujours présent dans la communauté scientifique pour ce récepteur. Les échecs démontrent néanmoins qu'une optimisation de ces agonistes est nécessaire afin d'en diminuer la lipophilie. De même, les recherches cliniques futures bénéficieraient d'une meilleure compréhension du rôle que joue le récepteur GPR40 dans la compensation et la dysfonction des cellules bêta pancréatiques en conditions glucolipotoxiques. Bien que plusieurs questions demeurent quant aux effets secondaires potentiels découlant d'une activation chronique du récepteur GPR40 par ses agonistes synthétiques, il n'en demeure pas moins que cette thèse appuie le potentiel important du récepteur GPR40 comme cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2.



# Bibliographie

1. Nora Bohnert JC, Patrice Dion. Projections démographiques pour le Canada (2013 à 2063), les provinces et les territoires (2013 à 2038). Dans: Canada S, rédacteur. 2009 à 2036e éd. Ottawa: Ministre de l'Industrie; 2015. p. 249.
2. Diabète Fid. Atlas du diabète de la FID. septième édition. éd. 2015.
3. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert C, Cheng AY. Canadian Diabetes Association 2013 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. Introduction. *Can J Diabetes*. 2013;37 Suppl 1:S1-3.
4. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines. 3e éd. Canada: Pearson Education Inc; 2005 2005.
5. Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, et al. Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(4):1338-42.
6. Pipeleers D, in't Veld PJ, Maes E, Van De Winkel M. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79(23):7322-5.
7. Bonner-Weir S. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta-cell within islets of Langerhans. *Diabetes*. 1988;37(5):616-21.
8. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(7):2334-9.
9. Vieira E, Salehi A, Gylfe E. Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia*. 2007;50(2):370-9.
10. Greenbaum CJ, Havel PJ, Taborsky GJ, Jr., Klaff LJ. Intra-islet insulin permits glucose to directly suppress pancreatic A cell function. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(3):767-73.
11. Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, et al. Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(29):27197-202.
12. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2003;284(4):E671-8.
13. Ludvigsen E, Olsson R, Stridsberg M, Janson ET, Sandler S. Expression and distribution of somatostatin receptor subtypes in the pancreatic islets of mice and rats. *The journal of histochemistry and*

cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 2004;52(3):391-400.

14. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory peptides*. 2002;107(1-3):63-9.

15. van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine reviews*. 2004;25(3):426-57.

16. Youos JG. The role of alpha-, delta- and F cells in insulin secretion and action. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;93 Suppl 1:S25-6.

17. Khandekar N, Berning BA, Sainsbury A, Lin S. The role of pancreatic polypeptide in the regulation of energy homeostasis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;418 Pt 1:33-41.

18. Aragon F, Karaca M, Novials A, Maldonado R, Maechler P, Rubi B. Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1850(2):343-51.

19. Lonovics J, Devitt P, Watson LC, Rayford PL, Thompson JC. Pancreatic polypeptide. A review. *Archives of surgery*. 1981;116(10):1256-64.

20. Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, Patterson M, et al. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(8):3989-92.

21. Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, et al. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nature genetics*. 1997;17(3):327-30.

22. Meglasson MD, Matschinsky FM. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes/metabolism reviews*. 1986;2(3-4):163-214.

23. Patterson JN, Cousteils K, Lou JW, Manning Fox JE, MacDonald PE, Joseph JW. Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(19):13335-46.

24. Matschinsky FM. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*. 1996;45(2):223-41.

25. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2008;19(8):285-91.

26. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*. 1984;312(5993):446-8.

27. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature*. 1984;311(5983):271-3.

28. Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K, Rorsman P. Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;55 Suppl:54-65.
29. Malsam J, Kreye S, Sollner TH. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(18):2814-32.
30. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*. 2013;9(1):25-53.
31. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature genetics*. 1997;15(1):106-10.
32. Semache M, Ghislain J, Zarrouki B, Tremblay C, Poitout V. Pancreatic and duodenal homeobox-1 nuclear localization is regulated by glucose in dispersed rat islets but not in insulin-secreting cell lines. *Islets*. 2014;6(4):e982376.
33. MacFarlane WM, Read ML, Gilligan M, Bujalska I, Docherty K. Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *The Biochemical journal*. 1994;303 ( Pt 2):625-31.
34. Gao Y, Miyazaki J, Hart GW. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2003;415(2):155-63.
35. Kishi A, Nakamura T, Nishio Y, Maegawa H, Kashiwagi A. Sumoylation of Pdx1 is associated with its nuclear localization and insulin gene activation. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2003;284(4):E830-40.
36. Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H. MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49903-10.
37. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(37):32413-8.
38. Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ, Steiner DF. Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(25):13590-4.
39. Kulkarni SD, Muralidharan B, Panda AC, Bakthavachalu B, Vindu A, Seshadri V. Glucose-stimulated translation regulation of insulin by the 5' UTR-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(16):14146-56.

40. Chan SJ, Keim P, Steiner DF. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(6):1964-8.
41. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, Carroll RJ, Keim PS, Heinrichson RL, et al. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978;75(3):1260-4.
42. Huang XF, Arvan P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(35):20417-23.
43. Dunn MF. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2005;18(4):295-303.
44. Barg S, Huang P, Eliasson L, Nelson DJ, Obermuller S, Rorsman P, et al. Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl(-) uptake and acidification. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 11):2145-54.
45. Tompkins LS, Nullmeyer KD, Murphy SM, Weber CS, Lynch RM. Regulation of secretory granule pH in insulin-secreting cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002;283(2):C429-37.
46. Davidson HW, Rhodes CJ, Hutton JC. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature*. 1988;333(6168):93-6.
47. Bailyes EM, Hutton JC. Kinetic analysis of the type-1 proinsulin endopeptidase by a monoclonal antibody-based immunoadsorbent assay. *The Biochemical journal*. 1992;286 ( Pt 1):223-9.
48. Bailyes EM, Shennan KI, Seal AJ, Smeekens SP, Steiner DF, Hutton JC, et al. A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *The Biochemical journal*. 1992;285 ( Pt 2):391-4.
49. Bennett DL, Bailyes EM, Nielsen E, Guest PC, Rutherford NG, Arden SD, et al. Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):15229-36.
50. Orci L, Halban P, Perrelet A, Amherdt M, Ravazzola M, Anderson RG. pH-independent and -dependent cleavage of proinsulin in the same secretory vesicle. *The Journal of cell biology*. 1994;126(5):1149-56.
51. Aspinwall CA, Brooks SA, Kennedy RT, Lakey JR. Effects of intravesicular H<sup>+</sup> and extracellular H<sup>+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on insulin secretion in pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(50):31308-14.
52. Wahren J, Larsson C. C-peptide: new findings and therapeutic possibilities. *Diabetes research and clinical practice*. 2015;107(3):309-19.
53. Pouli AE, Emmanouilidou E, Zhao C, Wasmeier C, Hutton JC, Rutter GA. Secretory-granule dynamics visualized in vivo with a phogrin-green

- fluorescent protein chimaera. *The Biochemical journal*. 1998;333 ( Pt 1):193-9.
54. Heaslip AT, Nelson SR, Lombardo AT, Beck Previs S, Armstrong J, Warshaw DM. Cytoskeletal dependence of insulin granule movement dynamics in INS-1 beta-cells in response to glucose. *PloS one*. 2014;9(10):e109082.
55. Varadi A, Tsuboi T, Johnson-Cadwell LI, Allan VJ, Rutter GA. Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;311(2):272-82.
56. Schliwa M, Woehlke G. Molecular motors. *Nature*. 2003;422(6933):759-65.
57. Cui J, Wang Z, Cheng Q, Lin R, Zhang XM, Leung PS, et al. Targeted inactivation of kinesin-1 in pancreatic beta-cells in vivo leads to insulin secretory deficiency. *Diabetes*. 2011;60(1):320-30.
58. Li G, Rungger-Brandle E, Just I, Jonas JC, Aktories K, Wollheim CB. Effect of disruption of actin filaments by *Clostridium botulinum* C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Molecular biology of the cell*. 1994;5(11):1199-213.
59. Howell SL, Tyhurst M. Actomyosin interactions with insulin-storage granules in vitro. *The Biochemical journal*. 1982;206(1):157-60.
60. Wang Z, Oh E, Thurmond DC. Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(13):9536-46.
61. Wang Z, Oh E, Clapp DW, Chernoff J, Thurmond DC. Inhibition or ablation of p21-activated kinase (PAK1) disrupts glucose homeostatic mechanisms in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(48):41359-67.
62. Kalwat MA, Yoder SM, Wang Z, Thurmond DC. A p21-activated kinase (PAK1) signaling cascade coordinately regulates F-actin remodeling and insulin granule exocytosis in pancreatic beta cells. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(6):808-16.
63. Fan F, Ji C, Wu Y, Ferguson SM, Tamarina N, Philipson LH, et al. Dynamin 2 regulates biphasic insulin secretion and plasma glucose homeostasis. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(11):4026-41.
64. Thurmond DC, Gonelle-Gispert C, Furukawa M, Halban PA, Pessin JE. Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex. *Molecular endocrinology*. 2003;17(4):732-42.
65. Munson M, Novick P. The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(7):577-81.
66. Jacobsson G, Bean AJ, Scheller RH, Juntti-Berggren L, Deeney JT, Berggren PO, et al. Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(26):12487-91.

67. Regazzi R, Wollheim CB, Lang J, Theler JM, Rossetto O, Montecucco C, et al. VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic beta-cells and are essential for Ca(2+)-but not for GTP gamma S-induced insulin secretion. *The EMBO journal*. 1995;14(12):2723-30.

68. Sadoul K, Lang J, Montecucco C, Weller U, Regazzi R, Catsicas S, et al. SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *The Journal of cell biology*. 1995;128(6):1019-28.

69. Gonelle-Gispert C, Halban PA, Niemann H, Palmer M, Catsicas S, Sadoul K. SNAP-25a and -25b isoforms are both expressed in insulin-secreting cells and can function in insulin secretion. *The Biochemical journal*. 1999;339 ( Pt 1):159-65.

70. Land J, Zhang H, Vaidyanathan VV, Sadoul K, Niemann H, Wollheim CB. Transient expression of botulinum neurotoxin C1 light chain differentially inhibits calcium and glucose induced insulin secretion in clonal beta-cells. *FEBS letters*. 1997;419(1):13-7.

71. Spurlin BA, Thurmond DC. Syntaxin 4 facilitates biphasic glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Molecular endocrinology*. 2006;20(1):183-93.

72. Nevins AK, Thurmond DC. A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(3):1944-52.

73. Tomas A, Meda P, Regazzi R, Pessin JE, Halban PA. Munc 18-1 and granophilin collaborate during insulin granule exocytosis. *Traffic*. 2008;9(5):813-32.

74. Oh E, Kalwat MA, Kim MJ, Verhage M, Thurmond DC. Munc18-1 regulates first-phase insulin release by promoting granule docking to multiple syntaxin isoforms. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(31):25821-33.

75. Allaman-Pillet N, Rduit R, Oberson A, Abdelli S, Ruiz J, Beckmann JS, et al. Circadian regulation of islet genes involved in insulin production and secretion. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;226(1-2):59-66.

76. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *The American journal of physiology*. 1996;271(2 Pt 1):E246-52.

77. Porte D, Jr. A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. *The Journal of clinical investigation*. 1967;46(1):86-94.

78. Johnson DE, Yamazaki H, Ward KM, Schmidt AW, Lebel WS, Treadway JL, et al. Inhibitory effects of antipsychotics on carbachol-enhanced insulin secretion from perfused rat islets: role of muscarinic antagonism in antipsychotic-induced diabetes and hyperglycemia. *Diabetes*. 2005;54(5):1552-8.

79. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state

- determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4753-8.
80. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory peptides*. 2003;114(2-3):189-96.
81. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(18):8641-5.
82. Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1973;37(5):826-8.
83. Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froguel P, et al. Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes*. 1995;44(10):1202-8.
84. Moens K, Heimberg H, Flamez D, Huypens P, Quartier E, Ling Z, et al. Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes*. 1996;45(2):257-61.
85. Lu M, Wheeler MB, Leng XH, Boyd AE, 3rd. The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide I(7-37). *Endocrinology*. 1993;132(1):94-100.
86. Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(4):1118-22.
87. Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, et al. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia*. 2008;51(5):827-35.
88. Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *The Journal of clinical investigation*. 1966;45(9):1487-502.
89. Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, et al. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes*. 2007;56(4):1087-94.
90. Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA. Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry*. 1995;34(37):11928-37.
91. Noushmehr H, D'Amico E, Farilla L, Hui H, Wawrowsky KA, Mlynarski W, et al. Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes*. 2005;54(2):472-81.
92. Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *The Biochemical journal*. 1996;320 ( Pt 2):345-57.

93. McGarry JD, Mannaerts GP, Foster DW. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 1977;60(1):265-70.
94. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S16-23.
95. Zhao S, Mugabo Y, Iglesias J, Xie L, Delghingaro-Augusto V, Lussier R, et al. alpha/beta-Hydrolase domain-6-accessible monoacylglycerol controls glucose-stimulated insulin secretion. *Cell metabolism*. 2014;19(6):993-1007.
96. Briscoe CP, Tadayon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11303-11.
97. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. 2003;422(6928):173-6.
98. Alquier T, Peyot ML, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, et al. Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes*. 2009;58(11):2607-15.
99. Kristinsson H, Bergsten P, Sargsyan E. Free fatty acid receptor 1 (FFAR1/GPR40) signaling affects insulin secretion by enhancing mitochondrial respiration during palmitate exposure. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(12):3248-57.
100. El-Azzouny M, Evans CR, Treutelaar MK, Kennedy RT, Burant CF. Increased glucose metabolism and glycerolipid formation by fatty acids and GPR40 receptor signaling underlies the fatty acid potentiation of insulin secretion. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(19):13575-88.
101. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nature medicine*. 2005;11(1):90-4.
102. Soga T, Ohishi T, Matsui T, Saito T, Matsumoto M, Takasaki J, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;326(4):744-51.
103. Moran BM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR, McKillop AM. Evaluation of the insulin-releasing and glucose-lowering effects of GPR120 activation in pancreatic beta-cells. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2014;16(11):1128-39.
104. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11312-9.
105. McNelis JC, Lee YS, Mayoral R, van der Kant R, Johnson AM, Wollam J, et al. GPR43 Potentiates beta-Cell Function in Obesity. *Diabetes*. 2015;64(9):3203-17.



106. Veprik A, Laufer D, Weiss S, Rubins N, Walker MD. GPR41 modulates insulin secretion and gene expression in pancreatic beta-cells and modifies metabolic homeostasis in fed and fasting states. *FASEB J.* 2016.
107. De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. Dans: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, et al., rédacteurs. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2000.
108. Striffler JS, Curry DL. Effect of fasting on insulin removal by liver of perfused liver-pancreas. *The American journal of physiology.* 1979;237(4):E349-55.
109. Lamers WH, Hanson RW, Meisner HM. cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1982;79(17):5137-41.
110. Granner D, Andreone T, Sasaki K, Beale E. Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature.* 1983;305(5934):549-51.
111. Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC. Insulin regulates liver glycogen synthase and glycogen phosphorylase activity reciprocally in rhesus monkeys. *The American journal of physiology.* 1997;272(1 Pt 1):E133-8.
112. Dickens M, Svitek CA, Culbert AA, O'Brien RM, Tavare JM. Central role for phosphatidylinositide 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(32):20144-9.
113. Chernick SS, Chaikoff IL. Insulin and hepatic utilization of glucose for lipogenesis. *The Journal of biological chemistry.* 1950;186(2):535-42.
114. Felts JM, Chaikoff IL, Osborn MJ. Insulin and the fate of lactate in the diabetic liver. *The Journal of biological chemistry.* 1951;191(2):683-92.
115. Orci L, Thorens B, Ravazzola M, Lodish HF. Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science.* 1989;245(4915):295-7.
116. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular cell.* 1998;2(5):559-69.
117. Foran PG, Fletcher LM, Oatey PB, Mohammed N, Dolly JO, Tavare JM. Protein kinase B stimulates the translocation of GLUT4 but not GLUT1 or transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes by a pathway involving SNAP-23, synaptobrevin-2, and/or cellubrevin. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(40):28087-95.
118. Brozinick JT, Jr., Birnbaum MJ. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(24):14679-82.
119. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1

- adipocytes and L6 myotubes. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(15):10071-8.
120. Ploug T, Galbo H, Richter EA. Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *The American journal of physiology*. 1984;247(6 Pt 1):E726-31.
121. Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, et al. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Developmental cell*. 2002;3(1):25-38.
122. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *The Journal of cell biology*. 2015;208(5):501-12.
123. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of lipid research*. 2005;46(7):1369-79.
124. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*. 2002;8(11):1288-95.
125. McGowan MK, Andrews KM, Kelly J, Grossman SP. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behavioral neuroscience*. 1990;104(2):373-85.
126. Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr., Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain research*. 1999;848(1-2):114-23.
127. Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(7):1457-77.
128. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999;96(3):329-39.
129. Poretzky L, rédacteur. *Principles of Diabetes Mellitus*. 2e éd: Springer; 2010.
130. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(3):193-205.
131. Lund A, Bagger JI, Christensen M, Knop FK, Vilsboll T. Glucagon and type 2 diabetes: the return of the alpha cell. *Current diabetes reports*. 2014;14(12):555.
132. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2094-101.
133. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56(4):901-11.
134. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1802-12.

135. Zarrouki B, Benterki I, Fontes G, Peyot ML, Seda O, Prentki M, et al. Epidermal growth factor receptor signaling promotes pancreatic beta-cell proliferation in response to nutrient excess in rats through mTOR and FOXM1. *Diabetes*. 2014;63(3):982-93.
136. Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*. 1994;43(5):703-11.
137. Parker SM, Moore PC, Johnson LM, Poitout V. Palmitate potentiation of glucose-induced insulin release: a study using 2-bromopalmitate. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003;52(10):1367-71.
138. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontes G. Glucolipototoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801(3):289-98.
139. Olofsson CS, Collins S, Bengtsson M, Eliasson L, Salehi A, Shimomura K, et al. Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane. *Diabetes*. 2007;56(7):1888-97.
140. Kelpel CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V. Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(32):30015-21.
141. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(49):32487-90.
142. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology*. 2002;143(9):3449-53.
143. Holman RR. Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states. *Diabetes research and clinical practice*. 1998;40 Suppl:S21-5.
144. Viollet B, Foretz M. Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. *Annales d'endocrinologie*. 2013;74(2):123-9.
145. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*. 2011;54(12):3101-10.
146. Meyer F, Ipaktchi M, Clouser H. Specific inhibition of gluconeogenesis by biguanides. *Nature*. 1967;213(5072):203-4.
147. Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell metabolism*. 2014;20(4):573-91.
148. Thule PM, Umpierrez G. Sulfonylureas: a new look at old therapy. *Current diabetes reports*. 2014;14(4):473.

149. Hirst JA, Farmer AJ, Dyar A, Lung TW, Stevens RJ. Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2013;56(5):973-84.
150. Desai NR, Shrank WH, Fischer MA, Avorn J, Liberman JN, Schneeweiss S, et al. Patterns of medication initiation in newly diagnosed diabetes mellitus: quality and cost implications. *The American journal of medicine*. 2012;125(3):302 e1-7.
151. Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *The Journal of physiology*. 1997;504 ( Pt 1):35-45.
152. Jennings AM, Wilson RM, Ward JD. Symptomatic hypoglycemia in NIDDM patients treated with oral hypoglycemic agents. *Diabetes care*. 1989;12(3):203-8.
153. Guardado-Mendoza R, Prioleta A, Jimenez-Ceja LM, Sosale A, Folli F. The role of nateglinide and repaglinide, derivatives of meglitinide, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Archives of medical science : AMS*. 2013;9(5):936-43.
154. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(11):7402-5.
155. Goke R, Fehmman HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(26):19650-5.
156. Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, et al. Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes*. 1999;48(5):1026-34.
157. Fakhoury WK, Lereun C, Wright D. A meta-analysis of placebo-controlled clinical trials assessing the efficacy and safety of incretin-based medications in patients with type 2 diabetes. *Pharmacology*. 2010;86(1):44-57.
158. Wysham C, Grimm M, Chen S. Once weekly exenatide: efficacy, tolerability and place in therapy. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013;15(10):871-81.
159. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*. 1999;140(11):5356-63.
160. Li Y, Xu W, Liao Z, Yao B, Chen X, Huang Z, et al. Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients is

associated with improvement of beta-cell function. *Diabetes care*. 2004;27(11):2597-602.

161. Gerstein HC, Yale JF, Harris SB, Issa M, Stewart JA, Dempsey E. A randomized trial of adding insulin glargine vs. avoidance of insulin in people with Type 2 diabetes on either no oral glucose-lowering agents or submaximal doses of metformin and/or sulphonylureas. The Canadian INSIGHT (Implementing New Strategies with Insulin Glargine for Hyperglycaemia Treatment) Study. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006;23(7):736-42.

162. Ahren B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(5):369-85.

163. Amisten S, Salehi A, Rorsman P, Jones PM, Persaud SJ. An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans. *Pharmacol Ther*. 2013;139(3):359-91.

164. Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, et al. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):279-88.

165. Hirozane Y, Motoyaji T, Maru T, Okada K, Tarui N. Generating thermostabilized agonist-bound GPR40/FFAR1 using virus-like particles and a label-free binding assay. *Mol Membr Biol*. 2014;31(5):168-75.

166. Kebede M, Ferdaoussi M, Mancini A, Alquier T, Kulkarni RN, Walker MD, et al. Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(7):2376-81.

167. Edfalk S, Steneberg P, Edlund H. Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes*. 2008;57(9):2280-7.

168. Parker HE, Habib AM, Rogers GJ, Gribble FM, Reimann F. Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia*. 2009;52(2):289-98.

169. Xiong Y, Swaminath G, Cao Q, Yang L, Guo Q, Salomonis H, et al. Activation of FFA1 mediates GLP-1 secretion in mice. Evidence for allosterism at FFA1. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013;369(1-2):119-29.

170. Flodgren E, Olde B, Meidute-Abaraviciene S, Winzell MS, Ahren B, Salehi A. GPR40 is expressed in glucagon producing cells and affects glucagon secretion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;354(1):240-5.

171. Wang L, Zhao Y, Gui B, Fu R, Ma F, Yu J, et al. Acute stimulation of glucagon secretion by linoleic acid results from GPR40 activation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in pancreatic islet {alpha}-cells. *The Journal of endocrinology*. 2011;210(2):173-9.

172. Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;301(2):406-10.

173. Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, et al. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia*. 2006;49(5):962-8.
174. Fujiwara K, Maekawa F, Yada T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca<sup>2+</sup> signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca<sup>2+</sup> channel and link to insulin release. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2005;289(4):E670-7.
175. Vettor R, Granzotto M, De Stefani D, Trevellin E, Rossato M, Farina MG, et al. Loss-of-function mutation of the GPR40 gene associates with abnormal stimulated insulin secretion by acting on intracellular calcium mobilization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(9):3541-50.
176. Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell metabolism*. 2005;1(4):245-58.
177. Tan CP, Feng Y, Zhou YP, Eiermann GJ, Petrov A, Zhou C, et al. Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes*. 2008;57(8):2211-9.
178. Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V. The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes*. 2008;57(9):2432-7.
179. Lan H, Hoos LM, Liu L, Tetzloff G, Hu W, Abbondanzo SJ, et al. Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes*. 2008;57(11):2999-3006.
180. Matsuda-Nagasumi K, Takami-Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Tanaka H, Ogi K, et al. Lack of GPR40/FFAR1 does not induce diabetes even under insulin resistance condition. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2013;15(6):538-45.
181. Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, et al. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes*. 2009;58(5):1067-76.
182. Del Guerra S, Bugliani M, D'Aleo V, Del Prato S, Boggi U, Mosca F, et al. G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) expression and its regulation in human pancreatic islets: the role of type 2 diabetes and fatty acids. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2010;20(1):22-5.
183. Guo S, Zhang J, Zhang S, Li J. A Single Amino Acid Mutation (R104P) in the E/DRY Motif of GPR40 Impairs Receptor Function. *PLoS one*. 2015;10(10):e0141303.
184. Hamid YH, Vissing H, Holst B, Urhammer SA, Pyke C, Hansen SK, et al. Studies of relationships between variation of the human G protein-coupled receptor 40 Gene and Type 2 diabetes and insulin release. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22(1):74-80.

185. Kalis M, Leveen P, Lyssenko V, Almgren P, Groop L, Cilio CM. Variants in the FFAR1 gene are associated with beta cell function. *PloS one*. 2007;2(11):e1090.
186. Streb H, Bayerdorffer E, Haase W, Irvine RF, Schulz I. Effect of inositol-1,4,5-trisphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas. *The Journal of membrane biology*. 1984;81(3):241-53.
187. Blondel O, Takeda J, Janssen H, Seino S, Bell GI. Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(15):11356-63.
188. Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;335(1):97-104.
189. Srivastava A, Yano J, Hirozane Y, Kefala G, Gruswitz F, Snell G, et al. High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*. 2014;513(7516):124-7.
190. Mancini AD, Bertrand G, Vivot K, Carpentier E, Tremblay C, Ghislain J, et al. beta-Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(34):21131-40.
191. Hauge M, Vestmar MA, Husted AS, Ekberg JP, Wright MJ, Di Salvo J, et al. GPR40 (FFAR1) - Combined Gs and Gq signaling in vitro is associated with robust incretin secretagogue action ex vivo and in vivo. *Mol Metab*. 2015;4(1):3-14.
192. Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, et al. Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology*. 2006;147(2):674-82.
193. Seljeset S, Siehler S. Receptor-specific regulation of ERK1/2 activation by members of the "free fatty acid receptor" family. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012;32(4):196-201.
194. Zamarbide M, Etayo-Labiano I, Ricobaraza A, Martinez-Pinilla E, Aymerich MS, Luis Lanciego J, et al. GPR40 activation leads to CREB and ERK phosphorylation in primary cultures of neurons from the mouse CNS and in human neuroblastoma cells. *Hippocampus*. 2014;24(7):733-9.
195. Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Rhodes C, Diaferia G, Montgomery AM. Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: effect on insulin content, secretion, and gene transcription. *Diabetes*. 2006;55(10):2723-9.
196. Diaferia GR, Cirulli V, Biunno I. SEL1L regulates adhesion, proliferation and secretion of insulin by affecting integrin signaling. *PloS one*. 2013;8(11):e79458.
197. Watson ML, Macrae K, Marley AE, Hundal HS. Chronic effects of palmitate overload on nutrient-induced insulin secretion and autocrine signalling in pancreatic MIN6 beta cells. *PloS one*. 2011;6(10):e25975.
198. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase

- in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(46):27489-94.
199. Chen J, Deng F, Li J, Wang QJ. Selective binding of phorbol esters and diacylglycerol by individual C1 domains of the PKD family. *The Biochemical journal*. 2008;411(2):333-42.
200. Oancea E, Bezzerides VJ, Greka A, Clapham DE. Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. *Developmental cell*. 2003;4(4):561-74.
201. Rozengurt E, Sinnott-Smith J, Van Lint J, Valverde AM. Protein kinase D (PKD): a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mutation research*. 1995;333(1-2):153-60.
202. Iglesias T, Rozengurt E. Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(1):410-6.
203. Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. PKC $\mu$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(8):6140-8.
204. Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase C $\mu$ . *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(37):26543-9.
205. Zugaza JL, Sinnott-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E. Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *The EMBO journal*. 1996;15(22):6220-30.
206. Tan M, Xu X, Ohba M, Ogawa W, Cui MZ. Thrombin rapidly induces protein kinase D phosphorylation, and protein kinase C delta mediates the activation. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(5):2824-8.
207. Van Lint J, Ni Y, Valius M, Merlevede W, Vandenhede JR. Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase C $\gamma$  and protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(12):7038-43.
208. Iglesias T, Waldron RT, Rozengurt E. Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(42):27662-7.
209. Baron CL, Malhotra V. Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science*. 2002;295(5553):325-8.
210. Hausser A, Link G, Bamberg L, Burzlaff A, Lutz S, Pfizenmaier K, et al. Structural requirements for localization and activation of protein kinase C $\mu$  (PKC $\mu$ ) at the Golgi compartment. *The Journal of cell biology*. 2002;156(1):65-74.
211. Gehart H, Goginashvili A, Beck R, Morvan J, Erbs E, Formentini I, et al. The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Developmental cell*. 2012;23(4):756-68.
212. Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, Villeneuve J, Jovic M, Porzner M, et al. Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P



- and their involvement in cargo export. *The EMBO journal*. 2013;32(12):1717-29.
213. Hausser A, Storz P, Martens S, Link G, Toker A, Pfizenmaier K. Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nature cell biology*. 2005;7(9):880-6.
214. Bishe B, Syed G, Siddiqui A. Phosphoinositides in the hepatitis C virus life cycle. *Viruses*. 2012;4(10):2340-58.
215. Eiseler T, Schmid MA, Topbas F, Pfizenmaier K, Hausser A. PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulates cell migration. *FEBS letters*. 2007;581(22):4279-87.
216. Eiseler T, Hausser A, De Kimpe L, Van Lint J, Pfizenmaier K. Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(24):18672-83.
217. Eiseler T, Doppler H, Yan IK, Kitatani K, Mizuno K, Storz P. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nature cell biology*. 2009;11(5):545-56.
218. Peterburs P, Heering J, Link G, Pfizenmaier K, Olayioye MA, Hausser A. Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like. *Cancer research*. 2009;69(14):5634-8.
219. Spratley SJ, Bastea LI, Doppler H, Mizuno K, Storz P. Protein kinase D regulates cofilin activity through p21-activated kinase 4. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(39):34254-61.
220. Fernandez AM, Hernandez-Garzon E, Perez-Domper P, Perez-Alvarez A, Mederos S, Matsui T, et al. Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. *Diabetes*. 2017;66(1):64-74.
221. Dirkx E, Schwenk RW, Coumans WA, Hoebbers N, Angin Y, Viollet B, et al. Protein kinase D1 is essential for contraction-induced glucose uptake but is not involved in fatty acid uptake into cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(8):5871-81.
222. Luiken JJ, Vertommen D, Coort SL, Habets DD, El Hasnaoui M, Pelsers MM, et al. Identification of protein kinase D as a novel contraction-activated kinase linked to GLUT4-mediated glucose uptake, independent of AMPK. *Cellular signalling*. 2008;20(3):543-56.
223. Steinbusch LK, Dirkx E, Hoebbers NT, Roelants V, Foretz M, Viollet B, et al. Overexpression of AMP-activated protein kinase or protein kinase D prevents lipid-induced insulin resistance in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;55:165-73.
224. Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, et al. Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell*. 2009;136(2):235-48.
225. Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P, Jones D, Wess J, Hamdan FF, et al. M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(49):21181-6.

226. Iglesias J, Barg S, Vallois D, Lahiri S, Roger C, Yessoufou A, et al. PPARbeta/delta affects pancreatic beta cell mass and insulin secretion in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(11):4105-17.

227. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*. 1994;367(6458):40-6.

228. Chiang YT, Jin T. p21-Activated protein kinases and their emerging roles in glucose homeostasis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(7):E707-22.

229. Eswaran J, Soundararajan M, Kumar R, Knapp S. UnPAKING the class differences among p21-activated kinases. *Trends in biochemical sciences*. 2008;33(8):394-403.

230. Buchwald G, Hostinova E, Rudolph MG, Kraemer A, Sickmann A, Meyer HE, et al. Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(15):5179-89.

231. Weisz Hubsman M, Volinsky N, Manser E, Yablonski D, Aronheim A. Autophosphorylation-dependent degradation of Pak1, triggered by the Rho-family GTPase, Chp. *The Biochemical journal*. 2007;404(3):487-97.

232. King CC, Gardiner EM, Zenke FT, Bohl BP, Newton AC, Hemmings BA, et al. p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(52):41201-9.

233. Baskaran Y, Ng YW, Selamat W, Ling FT, Manser E. Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42. *EMBO reports*. 2012;13(7):653-9.

234. Ching YP, Leong VY, Wong CM, Kung HF. Identification of an autoinhibitory domain of p21-activated protein kinase 5. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(36):33621-4.

235. Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, et al. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *The EMBO journal*. 1998;17(22):6527-40.

236. Gnesutta N, Qu J, Minden A. The serine/threonine kinase PAK4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):14414-9.

237. Fadista J, Vikman P, Laakso EO, Mollet IG, Esguerra JL, Taneera J, et al. Global genomic and transcriptomic analysis of human pancreatic islets reveals novel genes influencing glucose metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(38):13924-9.

238. Piccand J, Meunier A, Merle C, Jia Z, Barnier JV, Gradwohl G. Pak3 promotes cell cycle exit and differentiation of beta-cells in the embryonic pancreas and is necessary to maintain glucose homeostasis in adult mice. *Diabetes*. 2014;63(1):203-15.

239. Chen S, Auletta T, Dovirak O, Hutter C, Kuntz K, El-ftesi S, et al. Copy number alterations in pancreatic cancer identify recurrent PAK4 amplification. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(11):1793-802.
240. Tyagi N, Bhardwaj A, Singh AP, McClellan S, Carter JE, Singh S. p-21 activated kinase 4 promotes proliferation and survival of pancreatic cancer cells through AKT- and ERK-dependent activation of NF-kappaB pathway. *Oncotarget*. 2014;5(18):8778-89.
241. Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, et al. Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):550-8.
242. Tyagi N, Marimuthu S, Bhardwaj A, Deshmukh SK, Srivastava SK, Singh AP, et al. p-21 activated kinase 4 (PAK4) maintains stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells through activation of STAT3 signaling. *Cancer letters*. 2016;370(2):260-7.
243. Kimmelman AC, Hezel AF, Aguirre AJ, Zheng H, Paik JH, Ying H, et al. Genomic alterations link Rho family of GTPases to the highly invasive phenotype of pancreas cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(49):19372-7.
244. Murray BW, Guo C, Piraino J, Westwick JK, Zhang C, Lamerdin J, et al. Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(20):9446-51.
245. Zhang J, Wang J, Guo Q, Wang Y, Zhou Y, Peng H, et al. LCH-7749944, a novel and potent p21-activated kinase 4 inhibitor, suppresses proliferation and invasion in human gastric cancer cells. *Cancer letters*. 2012;317(1):24-32.
246. Pandey D, Goyal P, Dwivedi S, Siess W. Unraveling a novel Rac1-mediated signaling pathway that regulates cofilin dephosphorylation and secretion in thrombin-stimulated platelets. *Blood*. 2009;114(2):415-24.
247. Callow MG, Zozulya S, Gishizky ML, Jallal B, Smeal T. PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 9):1861-72.
248. Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(34):32115-21.
249. Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nature cell biology*. 2002;4(4):294-301.
250. Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 1998;393(6687):805-9.
251. Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*. 1998;393(6687):809-12.

252. Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, et al. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *The EMBO journal*. 2005;24(3):473-86.
253. Bastea LI, Doppler H, Pearce SE, Durand N, Spratley SJ, Storz P. Protein kinase D-mediated phosphorylation at Ser99 regulates localization of p21-activated kinase 4. *The Biochemical journal*. 2013;455(2):251-60.
254. Straub SG, Shanmugam G, Sharp GW. Stimulation of insulin release by glucose is associated with an increase in the number of docked granules in the beta-cells of rat pancreatic islets. *Diabetes*. 2004;53(12):3179-83.
255. Henquin JC, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Jonas JC. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 1:S60-7.
256. Ritter K, Buning C, Halland N, Poverlein C, Schwink L. G Protein-Coupled Receptor 119 (GPR119) Agonists for the Treatment of Diabetes: Recent Progress and Prevailing Challenges. *J Med Chem*. 2016;59(8):3579-92.
257. Drucker DJ. Never Waste a Good Crisis: Confronting Reproducibility in Translational Research. *Cell metabolism*. 2016;24(3):348-60.
258. Pathak R, Delorme-Walker VD, Howell MC, Anselmo AN, White MA, Bokoch GM, et al. The microtubule-associated Rho activating factor GEF-H1 interacts with exocyst complex to regulate vesicle traffic. *Developmental cell*. 2012;23(2):397-411.
259. Xie L, Zhu D, Kang Y, Liang T, He Y, Gaisano HY. Exocyst sec5 regulates exocytosis of newcomer insulin granules underlying biphasic insulin secretion. *PloS one*. 2013;8(7):e67561.
260. Ferdaoussi M, Dai X, Jensen MV, Wang R, Peterson BS, Huang C, et al. Isocitrate-to-SEN1 signaling amplifies insulin secretion and rescues dysfunctional beta cells. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(10):3847-60.
261. Corkey BE. Diabetes: have we got it all wrong? Insulin hypersecretion and food additives: cause of obesity and diabetes? *Diabetes care*. 2012;35(12):2432-7.
262. Templeman NM, Skovso S, Page MM, Lim GE, Johnson JD. A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *The Journal of endocrinology*. 2017;232(3):R173-R83.
263. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Qi X, Hill JA, Richardson JA, et al. Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(8):3059-63.
264. Wicksteed B, Brissova M, Yan W, Opland DM, Plank JL, Reinert RB, et al. Conditional gene targeting in mouse pancreatic  $\beta$ -Cells: analysis of ectopic Cre transgene expression in the brain. *Diabetes*. 2010;59(12):3090-8.

265. Tamarina NA, Roe MW, Philipson L. Characterization of mice expressing Ins1 gene promoter driven CreERT recombinase for conditional gene deletion in pancreatic beta-cells. *Islets*. 2014;6(1):e27685.
266. Oropeza D, Jouvet N, Budry L, Campbell JE, Bouyakdan K, Lacombe J, et al. Phenotypic Characterization of MIP-CreERT1Lphi Mice With Transgene-Driven Islet Expression of Human Growth Hormone. *Diabetes*. 2015;64(11):3798-807.
267. Carboneau BA, Le TD, Dunn JC, Gannon M. Unexpected effects of the MIP-CreER transgene and tamoxifen on beta-cell growth in C57Bl6/J male mice. *Physiol Rep*. 2016;4(18).
268. Coughlan KA, Valentine RJ, Sudit BS, Allen K, Dagon Y, Kahn BB, et al. PKD1 Inhibits AMPKalpha2 through Phosphorylation of Serine 491 and Impairs Insulin Signaling in Skeletal Muscle Cells. *The Journal of biological chemistry*. 2016;291(11):5664-75.
269. Pepin E, Al-Mass A, Attane C, Zhang K, Lamontagne J, Lussier R, et al. Pancreatic beta-Cell Dysfunction in Diet-Induced Obese Mice: Roles of AMP-Kinase, Protein Kinase Cepsilon, Mitochondrial and Cholesterol Metabolism, and Alterations in Gene Expression. *PLoS one*. 2016;11(4):e0153017.
270. Center JPI. <http://www.clinicaltrials.jp/user/showCteDetailE.jsp?japicId=JapicCTI-121730>: 2013. [modifié le; cité le 2017]. Disponible:
271. Pharmacodia. <https://www.pharmacodia.com/yaodu/html/v1/chemicals/5e38d982aecea3f5fa249828e8f1548a.html>: 2016. [modifié le 2016; cité le 2017]. Disponible:
272. Health USNIo. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01874366>: 2013. [modifié le 2014; cité le 2017]. Disponible:
273. AdisInsight. <http://adisinsight.springer.com/drugs/800038347> [modifié le 2016; cité le 2017]. Disponible:
274. Negoro N, Sasaki S, Mikami S, Ito M, Suzuki M, Tsujihata Y, et al. Discovery of TAK-875: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. *ACS medicinal chemistry letters*. 2010;1(6):290-4.
275. Yokoi N, Hoshino M, Hidaka S, Yoshida E, Beppu M, Hoshikawa R, et al. A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *J Diabetes Res*. 2013;2013:103731.
276. Tsujihata Y, Ito R, Suzuki M, Harada A, Negoro N, Yasuma T, et al. TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40/free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(1):228-37.
277. Burant CF, Viswanathan P, Marcinek J, Cao C, Vakilynejad M, Xie B, et al. TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2012;379(9824):1403-11.
278. Kaku K, Enya K, Nakaya R, Ohira T, Matsuno R. Long-term safety and efficacy of fasiglifam (TAK-875), a G-protein-coupled receptor 40 agonist, as

- monotherapy and combination therapy in Japanese patients with type 2 diabetes: a 52-week open-label phase III study. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2016;18(9):925-9.
279. TAKEDA. [http://www.takeda.com/news/2013/20131227\\_6117.html](http://www.takeda.com/news/2013/20131227_6117.html).: 2013. [modifié le 2014; cité le 2014]. Disponible:
280. Li X, Zhong K, Guo Z, Zhong D, Chen X. Fasiglifam (TAK-875) Inhibits Hepatobiliary Transporters: A Possible Factor Contributing to Fasiglifam-Induced Liver Injury. *Drug Metab Dispos*. 2015;43(11):1751-9.
281. Miller AR.  
<http://webcasts.diabetes.org/html5Player/default.aspx?webcastXmlInfo=http://webcasts.diabetes.org/netadmin/Content/ADA2012/sync/LB-OR50/22207.xml&videoBaseUrl=https://s3.amazonaws.com/ada-stream01/ADA2012/LB-OR50/>: 2012. [modifié le 2012; cité le 2017]. Disponible:
282. Hamdouchi C, Kahl SD, Patel Lewis A, Cardona GR, Zink RW, Chen K, et al. The Discovery, Preclinical, and Early Clinical Development of Potent and Selective GPR40 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus (LY2881835, LY2922083, and LY2922470). *J Med Chem*. 2016;59(24):10891-916.
283. Defossa E, Wagner M. Recent developments in the discovery of FFA1 receptor agonists as novel oral treatment for type 2 diabetes mellitus. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(14):2991-3000.
284. Jagannath MR. <http://professional.diabetes.org/abstract/cnx-011-67-novel-orally-available-gpr40-agonist-enhances-glucose-stimulated-insulin> 2011. [modifié le 2011; cité le 2017]. Disponible:
285. Li Z, Qiu Q, Geng X, Yang J, Huang W, Qian H. Free fatty acid receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes: drugs in preclinical to phase II clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 2016;25(8):871-90.
286. Gowda N, Dandu A, Singh J, Biswas S, Raghav V, Lakshmi MN, et al. Treatment with CNX-011-67, a novel GPR40 agonist, delays onset and progression of diabetes and improves beta cell preservation and function in male ZDF rats. *BMC pharmacology & toxicology*. 2013;14:28.
287. Sunil V, Verma MK, Oommen AM, Sadasivuni M, Singh J, Vijayraghav DN, et al. CNX-011-67, a novel GPR40 agonist, enhances glucose responsiveness, insulin secretion and islet insulin content in n-STZ rats and in islets from type 2 diabetic patients. *BMC pharmacology & toxicology*. 2014;15:19.
288. Verma MK, Biswas S, Chandravanshi B, Neelima K, Oommen AM, Jagannath MR, et al. A novel GPR40 agonist, CNX-011-67, suppresses glucagon secretion in pancreatic islets under chronic glucolipotoxic conditions in vitro. *BMC Res Notes*. 2014;7:595.
289. Houze JB, Zhu L, Sun Y, Akerman M, Qiu W, Zhang AJ, et al. AMG 837: a potent, orally bioavailable GPR40 agonist. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22(2):1267-70.

290. Lin DC, Zhang J, Zhuang R, Li F, Nguyen K, Chen M, et al. AMG 837: a novel GPR40/FFA1 agonist that enhances insulin secretion and lowers glucose levels in rodents. *PloS one*. 2011;6(11):e27270.
291. Choi YJ, Shin D, Lee JY. G-protein coupled receptor 40 agonists as novel therapeutics for type 2 diabetes. *Arch Pharm Res*. 2014;37(4):435-9.
292. Brown SP, Dransfield PJ, Vimolratana M, Jiao X, Zhu L, Pattaropong V, et al. Discovery of AM-1638: A Potent and Orally Bioavailable GPR40/FFA1 Full Agonist. *ACS medicinal chemistry letters*. 2012;3(9):726-30.
293. Luo J, Swaminath G, Brown SP, Zhang J, Guo Q, Chen M, et al. A potent class of GPR40 full agonists engages the enteroinsular axis to promote glucose control in rodents. *PloS one*. 2012;7(10):e46300.
294. Takano R, Yoshida M, Inoue M, Honda T, Nakashima R, Matsumoto K, et al. Discovery of 3-aryl-3-ethoxypropanoic acids as orally active GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014;24(13):2949-53.
295. Takano R, Yoshida M, Inoue M, Honda T, Nakashima R, Matsumoto K, et al. Discovery of DS-1558: A Potent and Orally Bioavailable GPR40 Agonist. *ACS medicinal chemistry letters*. 2015;6(3):266-70.
296. Takano R, Yoshida M, Inoue M, Honda T, Nakashima R, Matsumoto K, et al. Optimization of 3-aryl-3-ethoxypropanoic acids and discovery of the potent GPR40 agonist DS-1558. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(17):5546-65.
297. Haschke G. <http://professional.diabetes.org/abstract/amplification-glucose-stimulated-insulin-secretion-activating-free-fatty-acid-receptor>: 2011. [modifié le 2011; cité le 2017]. Disponible:
298. Riz M, Pedersen MG, Toffolo GM, Haschke G, Schneider HC, Klabunde T, et al. Minimal modeling of insulin secretion in the perfused rat pancreas: a drug effect case study. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2014;306(6):E627-34.
299. Ou HY, Wu HT, Hung HC, Yang YC, Wu JS, Chang CJ. Multiple mechanisms of GW-9508, a selective G protein-coupled receptor 40 agonist, in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2013;304(6):E668-76.
300. Fujita T, Matsuoka T, Honda T, Kabashima K, Hirata T, Narumiya S. A GPR40 agonist GW9508 suppresses CCL5, CCL17, and CXCL10 induction in keratinocytes and attenuates cutaneous immune inflammation. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1660-7.
301. Tanaka H, Yoshida S, Oshima H, Minoura H, Negoro K, Yamazaki T, et al. Chronic treatment with novel GPR40 agonists improve whole-body glucose metabolism based on the glucose-dependent insulin secretion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;346(3):443-52.
302. Christiansen E, Hansen SV, Urban C, Hudson BD, Wargent ET, Grundmann M, et al. Discovery of TUG-770: A Highly Potent Free Fatty Acid Receptor 1 (FFA1/GPR40) Agonist for Treatment of Type 2 Diabetes. *ACS medicinal chemistry letters*. 2013;4(5):441-5.
303. Christiansen E, Due-Hansen ME, Urban C, Grundmann M, Schmidt J, Hansen SV, et al. Discovery of a potent and selective free fatty acid receptor

- 1 agonist with low lipophilicity and high oral bioavailability. *J Med Chem.* 2013;56(3):982-92.
304. Waring MJ. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2010;5(3):235-48.
305. Christiansen E, Due-Hansen ME, Urban C, Grundmann M, Schroder R, Hudson BD, et al. Free fatty acid receptor 1 (FFA1/GPR40) agonists: mesylpropoxy appendage lowers lipophilicity and improves ADME properties. *J Med Chem.* 2012;55(14):6624-8.
306. Yashiro H, Tsujihata Y, Takeuchi K, Hazama M, Johnson PR, Rorsman P. The effects of TAK-875, a selective G protein-coupled receptor 40/free fatty acid 1 agonist, on insulin and glucagon secretion in isolated rat and human islets. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(2):483-9.
307. Pacini G, Thomaseth K, Ahren B. Contribution to glucose tolerance of insulin-independent vs. insulin-dependent mechanisms in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2001;281(4):E693-703.
308. Moulle VS, Vivot K, Tremblay C, Zarrouki B, Ghislain J, Poitout V. Glucose and fatty acids synergistically and reversibly promote beta cell proliferation in rats. *Diabetologia.* 2017.
309. Marchetti P. Islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2016;59(4):668-72.