

Université de Montréal

Étude de la voie de signalisation du facteur de croissance épidermique HB-EGF et de son récepteur dans la cellule  $\beta$ -pancréatique

*Par*  
*Hasna Maachi*

Département de pharmacologie et de physiologie, Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

En pharmacologie, option pharmacologie intégrative cardiovasculaire

Décembre 2019

© Nom de Hasna Maachi, 2019

Université de Montréal

Département de pharmacologie et de physiologie, Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

**Étude de la voie de signalisation du facteur de croissance épidermique HB-EGF et de son récepteur dans la cellule  $\beta$ -pancréatique**

*Présenté par*

**Hasna Maachi**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr Jean-Philippe Gratton**

Président-rapporteur

**Dr Vincent Poitout**

Directeur de recherche

**Dr Gareth Lim**

Membre du jury

**Dr George I Fantus**

Examineur externe

## Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est caractérisé par une résistance à l'action de l'insuline et une dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques. Il apparaît lorsque la cellule  $\beta$  devient incapable d'augmenter sa masse fonctionnelle afin de compenser la résistance périphérique à l'action de l'insuline. L'identification de molécules capables de stimuler la réplication des cellules  $\beta$  et ainsi de préserver leur masse fonctionnelle aurait donc un intérêt thérapeutique majeur. Nous avons établi un modèle d'excès de nutriments *in vivo* chez le rat, dans lequel nous avons observé qu'une augmentation de la prolifération des cellules  $\beta$  associée à une augmentation de l'expression du facteur de croissance « heparin-binding EGF-like growth factor » (HB-EGF). L'objectif de cette thèse était de valider l'effet mitogène du HB-EGF sur les cellules  $\beta$  de rats et humaines, puis d'identifier le mécanisme d'activation de la voie HB-EGF-EGFR.

Dans une première étude, nous avons démontré *ex vivo* que le facteur croissance HB-EGF stimule la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques d'îlots isolés de rats et humains via l'activation de son récepteur EGFR. Nous avons également observé que la stimulation de la prolifération des cellules  $\beta$  de rats par le glucose nécessite l'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR par un mécanisme qui implique à la fois une augmentation de l'expression du gène codant pour HB-EGF via le facteur de transcription ChREBP, et l'activation du récepteur EGFR via une protéine de la famille des protéines Src tyrosine kinase.

Les cellules  $\beta$  des îlots humains étant réfractaires à la prolifération, il est essentiel de confirmer les résultats obtenus chez les rongeurs dans des tissus humains. Nous avons observé un effet mitogène d'HB-EGF sur les cellules  $\beta$  humaines. En revanche, nous n'avons pas pu détecter de manière reproductible un effet stimulant du glucose sur la prolifération des cellules  $\beta$  humaines. Notre deuxième étude a donc consisté à identifier la technique la plus appropriée pour mesurer la prolifération des cellules  $\beta$  humaines. Nous avons comparé systématiquement la mesure de la prolifération en réponse à divers stimuli par cytométrie en flux ou par immunohistochimie sur des îlots intacts ou dispersés. Nous avons testé trois facteurs mitogènes soit le glucose, l'HB-EGF et l'harmine. Nous avons observé que l'HB-EGF et l'harmine stimulent la

prolifération des cellules  $\beta$  et non  $\beta$  indépendamment de la méthode utilisée. En revanche, l'action mitogène du glucose semble être dépendante de la méthode.

En conclusion, nous avons d'abord démontré que l'effet mitogène du glucose nécessite l'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR. Ensuite, nous avons observé que la mesure de la prolifération des cellules  $\beta$  humaines par cytométrie en flux offre plusieurs avantages par rapport à l'immunohistochimie.

**Mots-clés** : prolifération, cellules  $\beta$ , signalisation, glucose, HB-EGF, EGFR, rat, humain, mTOR, harmine.

## Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. T2D occurs when  $\beta$  cells become unable to increase their functional mass in order to compensate for insulin resistance. The identification of molecules capable of stimulating  $\beta$ -cell replication to preserve their functional mass would therefore be of major therapeutic interest. We previously established a model of nutrient excess in which we observed an increase in  $\beta$ -cell proliferation associated with enhanced expression of the growth factor "heparin-binding EGF-like growth factor" (HB-EGF). The objective of the work presented in this thesis was to test the hypothesis that HB-EGF stimulates both rodent and human  $\beta$ -cell proliferation and to identify the underlying mechanisms.

In a first study, we demonstrated *ex vivo* that HB-EGF stimulates pancreatic  $\beta$ -cell proliferation of isolated rat and human islets by activating EGFR. We also demonstrated that glucose, an important mitogen of the  $\beta$  cells, requires the activation of this HB-EGF-EGFR signaling pathway, *ex vivo* and *in vivo* in an infused rat model, to stimulate  $\beta$ -cell replication. Mechanistically, we demonstrate that glucose promotes HB-EGF gene expression via the ChREBP transcription factor and EGFR activation via a protein from the Src kinase family.

Since adult human  $\beta$  cells tend to be refractory to proliferation, it is essential to confirm the findings obtained in rodents in human tissues. In isolated human islets, we confirmed the mitogenic action of HB-EGF but we were unable to detect a consistent stimulation of human  $\beta$ -cell proliferation in response to glucose. Our second study therefore consisted in identifying the most appropriate technique to measure human  $\beta$ -cell proliferation. We systematically compared proliferation levels measured by flow cytometry or immunohistochemistry in intact and dispersed human islets. We tested three mitogenic factors: glucose, HB-EGF and harmine. We observed that HB-EGF and harmine stimulate non- $\beta$  cells and  $\beta$ -cell proliferation regardless of the method used. In contrast, the mitogenic action of glucose is variable depending on the method used.

In conclusion, we first demonstrated that the mitogenic effect of glucose in  $\beta$  cells requires the activation of the HB-EGF-EGFR signaling pathway. Then we demonstrated that assessment of

human  $\beta$  cell proliferation by flow cytometry offers several advantages over the use of immunohistochemical methods.

**Keywords:**  $\beta$  cell, proliferation, signaling pathway, glucose, HB-EGF, EGFR, human, rat, mTOR, harmine

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Résumé.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Table des matières.....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>Liste des figures .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>Liste des sigles et abréviations .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>Remerciements .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>Chapitre I – Le pancréas endocrine.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>I.1 Physiologie et fonction du pancréas .....</b>                                  | <b>18</b> |
| I.1.2 La cellule $\beta$ .....  | 22        |
| I.1.2.1 Composition et synthèse d’insuline .....                                      | 22        |
| I.1.2.2 Exocytose et sécrétion d’insuline.....  | 23        |
| I.1.2.3 Adaptation fonctionnelle de la cellule $\beta$ (sécrétion) .....              | 25        |
| I.1.2.4 Adaptation anatomique de la cellule $\beta$ (masse).....                      | 27        |
| I.1.2.5 Hétérogénéité fonctionnelle de la cellule $\beta$ .....                       | 29        |
| <b>Chapitre II – Le diabète .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>II.1 Épidémiologie du diabète .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>II.2 Le diabète de type 1 .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>II.3 Le diabète de type 2 .....</b>  | <b>32</b> |
| I.3.1 L’ <i>étiologie</i> du diabète de type 2 .....                                  | 35        |
| I.3.1.1 Les facteurs génétiques.....  | 35        |
| I.3.1.2 Les facteurs environnementaux.....  | 36        |
| <b>Chapitre III – Dysfonction et plasticité de la cellule <math>\beta</math>.....</b> | <b>37</b> |
| <b>III. 1 Dysfonction de la cellule <math>\beta</math> dans le DT2 .....</b>          | <b>37</b> |
| III.1.1 Glucolipototoxicité .....   | 37        |
| III.1.2 Inflammation .....  | 39        |

|   |           |
|---|-----------|
| III.1.3 Le stress oxydant .....   | 40        |
| III.1.4 Stress du réticulum endoplasmique .....   | 41        |
| <b>III.2 Plasticité de la cellule <math>\beta</math> dans le DT2.....</b>   | <b>42</b> |
| III.2.1 Dédifférenciation .....   | 44        |
| III.2.2 Sénescence .....  | 45        |
| III.2.3 Transdifférenciation .....  | 46        |
| <b>Chapitre IV – Prolifération des cellules <math>\beta</math> .....</b>  | <b>49</b> |
| <b>IV.1 Le glucose.....</b>   | <b>52</b> |
| IV.1.1 La glucokinase et le métabolisme du glucose.....   | 52        |
| IV.1.2 ChREBP .....   | 52        |
| IV.1.3 mTOR .....   | 53        |
| <b>IV.2 Les facteurs hormonaux et les incrélines.....</b>   | <b>53</b> |
| IV.2.1 L'insuline et l'IGF .....  | 53        |
| IV.2.2 Le GLP1 .....  | 54        |
| <b>IV.3 Molécules stimulant la prolifération des cellules <math>\beta</math> humaines .....</b>   | <b>55</b> |
| IV.3.1 Le WS1 .....   | 55        |
| IV.3.2 Les inhibiteurs de la kinase DYRK1A .....  | 55        |
| IV.3.3 Les inhibiteurs du récepteur au TGF $\beta$ .....  | 57        |
| IV.3.4 L'hépatokine SerpineB1 .....   | 57        |
| <b>IV.4 Les facteurs de croissance épidermiques (EGF) .....</b>   | <b>58</b> |
| IV.4.1 Récepteurs à l'EGF et ses ligands.....   | 58        |
| IV.4.2 Structure et fonction du HB-EGF .....  | 60        |
| IV.4.3 Rôle du HB-EGF dans la cellule $\beta$ .....   | 62        |
| <b>IV.5 Les Marqueurs de la prolifération cellulaire.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>Chapitre V – Mise en contexte de la thèse .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>RÉSULTATS.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>Article 1 – La prolifération des cellules <math>\beta</math> pancréatiques de rats en réponse au glucose requiert<br/>l'activation de la voie HB-EGF-EGFR.....</b> | <b>67</b> |
| Mise en contexte .....  | 67        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>Article 2 – Importante prolifération des cellules non <math>\beta</math> en réponse à plusieurs facteurs stimulant la prolifération des cellules <math>\beta</math> humaines .....</b> | <b>111</b> |
| Mise en contexte .....  | 111        |
| <b><i>DISCUSSION</i> .....</b>  | <b>137</b> |
| <b>1. La prolifération des cellules <math>\beta</math> pancréatiques de rats en réponse au glucose requiert l'activation de la voie HB-EGF-EGFR .....</b>                                 | <b>138</b> |
| 1.1 Rappel des principaux résultats .....   | 138        |
| 1.2 HB-EGF et la prolifération des cellules $\beta$ .....   | 138        |
| 1.3 L'effet mitogène du glucose requiert l'activation de la voie HB-EGF-EGFR .....  | 140        |
| <b>2. Importante prolifération des cellules non <math>\beta</math> en réponse à plusieurs facteurs stimulant la prolifération des cellules <math>\beta</math> humaines .....</b>          | <b>143</b> |
| 2.1 Rappel des principaux résultats .....   | 143        |
| 2.2 Prolifération en réponse à l'HB-EGF .....   | 143        |
| 2.3 Prolifération en réponse à l'harmine .....  | 144        |
| 2.4 Prolifération en réponse au glucose .....   | 145        |
| <b><i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i> .....</b>  | <b>147</b> |
| <b><i>Références bibliographiques</i> .....</b>   | <b>149</b> |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1: Anatomie du Pancréas. ....   | 18 |
| Figure 2 : Représentation d'un îlot pancréatique de souris et d'humains. ....                                | 20 |
| Figure 3 : Mécanismes régulateurs de la masse des cellules $\beta$ en conditions physiologiques.....         | 26 |
| Figure 4 : Prolifération des cellules $\beta$ en fonction de l'âge. ....                                     | 28 |
| Figure 5 : îlots pancréatiques provenant du donneur humain H0021. ....                                       | 30 |
| Figure 6 : Schématisation de la progression du Diabète de type 2. ....                                       | 33 |
| Figure 7 : Mécanismes contribuant à de la glucolipotoxicité des cellules $\beta$ pancréatiques.....          | 38 |
| Figure 8 : L'identité de la cellule $\beta$ est dictée par le métabolisme. ....                              | 43 |
| Figure 9 : Schématisation de stimuli induisant la transdifférenciation du soma en cellules $\beta$ . ....    | 48 |
| Figure 10 : Le glucose stimule la prolifération en activant différentes voies dans la cellule $\beta$ . .... | 51 |
| Figure 11 : Mécanismes stimulant la prolifération des cellules $\beta$ pancréatiques humaines.....           | 56 |
| Figure 12 : Illustration du clivage de HB-EGF. ....  | 59 |
| Figure 13 : Schématisation de la fonction de HB-EGF dans différents organes. ....                            | 61 |

## Liste des sigles et abréviations

|          |   |
|----------|---|
| $\alpha$ | Alpha   |
| $\beta$  | Bêta  |
| $\delta$ | Delta   |
| ADN      | Acide désoxyribonucléique                       |
| ADP      | Adénosine diphosphate                           |
| AGE      | Les produits de glycation avancée               |
| AKT/PKB  | Protéine kinase B                               |
| AMPK     | AMP-activated protein kinase                    |
| ARN      | Acide ribonucléique                             |
| ATF6     | Activating transcription factor 6               |
| ATP      | Adénosine triphosphate                          |
| cAMP     | Cyclic adenosine monophosphate                  |
| CHOP     | C/EBP homologous protein                        |
| CPT1     | Carnitine palmitoyltransferase I                |
| ChREBP   | Carbohydrate-responsive element binding protein |
| CREB     | cAMP-response-element-binding protein           |
| DIDMOAD  | Diabetes insipidus, optic atrophy, and deafness |
| DiRECT   | Diabetes Remission Clinical Trial               |
| DT2      | Diabète de type 2                               |
| EGF      | Epidermal growth factor                         |

|                |  |
|----------------|--|
| EGFR           | Epidermal growth factor receptor                                     |
| FID            | Fédération internationale du diabète                                 |
| FOXO1          | Forkhead box O1  |
| GLP-1          | Glucagon-like peptide 1  |
| GLUT2          | Glucose transporter 2  |
| GWAS           | Genome-wide association studies                                      |
| HB-EGF         | Heparin-binding EGF-like growth factor                               |
| IGF-1          | Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline                     |
| IL             | Interleukines  |
| IRE1           | Inositol-requiring enzyme 1  |
| IRS1/2         | Insulin receptor substrate 1/2                                       |
| MafA           | Mammalian homologue of avian MafA/L-Maf                              |
| MIN 6          | Mouse insulinoma 6 (lignée de cellules bêta pancréatiques de souris) |
| mTOR           | Mammalian target of rapamycin  |
| NAD            | Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)                              |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells       |
| NKX6.1         | Homeobox protein Nkx6-1  |
| OMS            | Organisation mondiale de la santé                                    |
| PDX-1          | Pancreatic duodenum homeobox-1                                       |
| PERK           | PKR-like ER kinase   |
| PP             | Polypeptide pancréatique   |
| PI3K           | kinase de phosphoinositides 3  |

|         |   |
|---------|---|
| PKA     | Protein kinase A                            |
| RE      | Réticulum endoplasmique                     |
| RNA-seq | RNA sequencing                              |
| ROS     | Reactive oxygen species                     |
| SNP     | Polymorphismes mononucléotidiques           |
| Src     | Proto-oncogene tyrosine-protein kinase      |
| TXNIP   | Protéine d'interaction avec la thiorédoxine |
| UPR     | Unfolded protein response                   |
| XBP1    | X box-binding protein 1                     |

*À ma maman*

## Remerciements

De toute la thèse, cette page a été la plus difficile à écrire. Mes mots ne suffiront pas à rendre hommage aux nombreuses personnes qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon parcours.

Je me considère particulièrement privilégiée d'avoir effectué mon doctorat à l'Université de Montréal au sein du CRCHUM et du CRDM. Ces institutions m'ont permis de fleurir dans un environnement formateur et enrichissant par le biais de communications scientifiques, congrès ou de simples échanges entre collègues. J'aimerais donc remercier ces institutions et par la même occasion remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir bien voulu consacrer du temps à la correction et l'évaluation de cette thèse.

Ensuite, j'aimerais remercier la personne qui m'a permis de réaliser cette thèse, mon directeur de recherche le Dr Vincent Poitout. Vincent a été une source d'inspiration ; travailler sous sa direction fut particulièrement constructif et formateur. Il m'a permis de m'améliorer sur de nombreux aspects personnels et professionnels. Je le remercie d'avoir été disponible et de m'avoir poussée à toujours donner le meilleur de moi-même. J'aimerais remercier par la même occasion l'ensemble des membres du laboratoire pour leurs encouragements indéfectibles.

J'aimerais également remercier le Dr Marc Prentki et ma chère Alix Zutter pour nos nombreuses discussions enrichissantes et pour avoir été d'un soutien remarquable. Respectivement, ils sont à la fois le cerveau et le cœur du CRDM. Ils font de cette institution une famille où les étudiants et chercheurs sont encouragés à interagir et se soutenir mutuellement.

Enfin, pour n'en nommer que quelques-uns, j'aimerais remercier de nombreuses personnes pour leurs encouragements et pour m'avoir soutenue dans ma démarche d'une façon ou d'une autre en l'occurrence, mon maître de kung-fu Richard Noel, David Ipperciel, Annie Levert, Mat et les étudiants du MDRC anciens et présents. J'aimerais également remercier les donateurs d'îlots humains ainsi que leurs familles pour leur contribution scientifique et m'avoir permis de réaliser mon étude sur les îlots humains.

Je souhaite aussi remercier mes deux tendres et meilleures amies la future Dr Celia Sid-Otmane et la Dr Estelle R Cheyou pour m'avoir encouragée, partagé mes joies et mes pleurs et avoir été la lumière qui a éclairé mon chemin ces dernières années. Celia est la sœur que je n'ai pas eue, notre relation remonte à près de 18 ans et continuera toute notre vie. Si l'âme sœur devait exister, elle serait probablement la mienne. Estelle, remonte à un peu moins longtemps, environ 6 ans, pourtant nous avons vécu des moments si intenses que nous nous sommes rapprochées comme si nous nous étions toujours connues. Je ne pense pas que je serais là où je suis aujourd'hui sans ces deux femmes remarquables à mes côtés.

Enfin, les derniers mais non les moindres, je tiens à remercier chaleureusement les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue et encouragée à aller de l'avant. Je commencerai par remercier mes parents pour m'avoir inculqué de nombreuses valeurs dont la persévérance et la ténacité qui m'ont permis de surmonter les nombreux échecs rencontrés lors de mon doctorat tout en restant motivée. Je remercierai également mon petit frère Hmidou qui a été à la fois un frère et une sœur, un ami, un confident et même un complice par moment!

Merci à tous 😊 !!!!!

Hasna Maachi

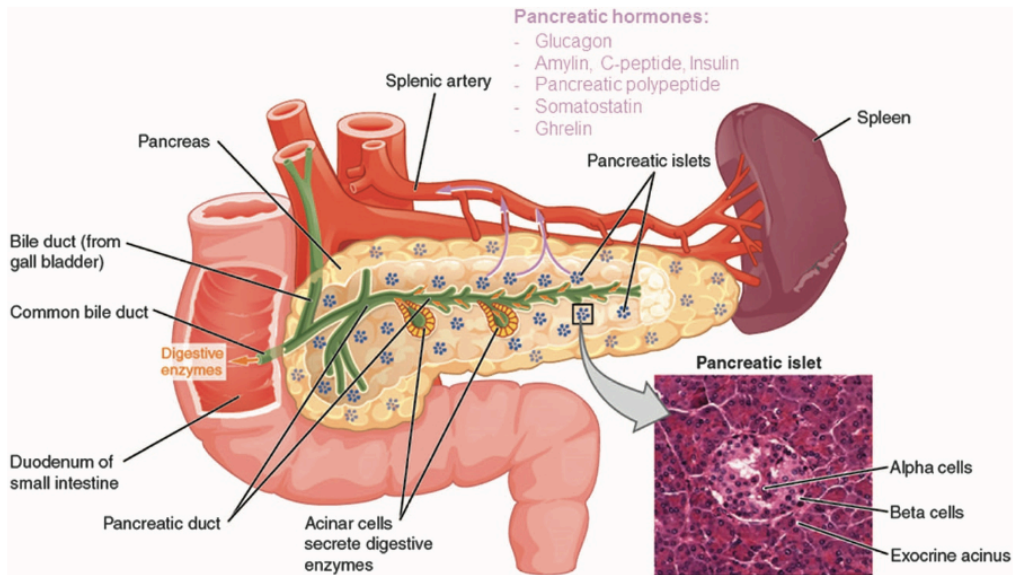


## **INTRODUCTION**

# Chapitre I – Le pancréas endocrine

## I.1 Physiologie et fonction du pancréas

Le pancréas est un organe clé qui fait à la fois partie du système digestif et endocrinien. Situé derrière l'estomac, il pèse 60 à 80 g et mesure 12 à 15 cm de long et 1 cm d'épaisseur. La partie exocrine du pancréas représente 98 % de la masse parenchymateuse (Figure 1). Elle consiste principalement en enzymes digestives permettant de dégrader les aliments, afin de faciliter leur absorption par l'organisme. Alors que la partie endocrine est constituée des îlots de Langerhans, ce sont des regroupements de cellules endocrines qui ont pour principale fonction le maintien de l'homéostasie glycémique (1).



Reproduit avec la permission de Röder et al. 2016

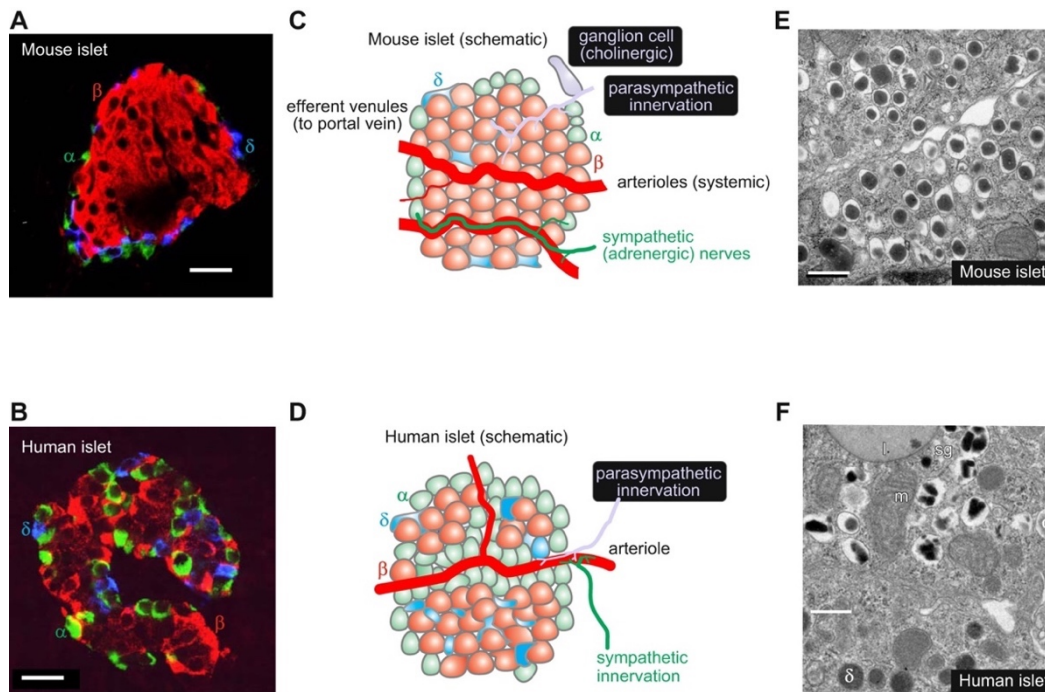
Figure 1: Anatomie du Pancréas.

Le pancréas peut se diviser en trois parties, la tête attachée au duodénum, le corps puis la queue attachée à la rate. Composé principalement de tissu exocrine avec environ 2% d'îlots de Langerhans repartis dans le parenchyme

### I.1.1 Les îlots de Langerhans

Les îlots pancréatiques de Langerhans sont des micro-organes endocriniens intégrés dans le parenchyme exocrine du pancréas. Chez l'humain, ils se répartissent sur l'ensemble du pancréas avec une distribution plus importante au niveau de la queue plutôt que la tête du pancréas (2, 3). Chez la souris, certaines études rapportent une distribution similaire à celle de l'humain (4), alors que d'autres rapportent une distribution plus homogène tout au long du pancréas (5, 6). Il semble y avoir une différence fonctionnelle entre les îlots de la tête et ceux de la queue du pancréas due possiblement à leur distinctes origines embryologiques ainsi qu'à la taille et composition des îlots dans ces régions. La tête du pancréas est formée à partir de bourgeons pancréatiques ventraux et dorsaux alors que la queue est formé à partir de bourgeons ventraux (7). Des études réalisées chez le rongeur montrent que les îlots provenant de bourgeons dorsaux ont une meilleur capacité à synthétiser et sécréter de l'insuline que ceux provenant de bourgeons ventraux (8). De plus, chez les patients avec une pancréatectomie partielle de 50%, l'ablation de la queue du pancréas induit une augmentation de la glycémie à jeun et une diminution de la tolérance au glucose (9, 10); alors que l'ablation de la tête du pancréas induit une amélioration de la tolérance au glucose à court terme (9).

Un pancréas adulte humain compte près de 1 million d'îlots (11) alors qu'une souris de 8 semaines compte 1100 îlots (12). Ce sont de petits amas cellulaires de formes ovoïdes, de 150-300  $\mu\text{m}$  de diamètre chez l'homme et 60  $\mu\text{m}$  chez la souris. Ils sont entourés d'artérioles et de nombreux capillaires qui drainent la sécrétion hormonale. Bien qu'ils représentent seulement 1-2 % de la masse du pancréas, ils reçoivent 10 % de l'apport sanguin pancréatique. Le sang irriguant le pancréas provient de l'artère splénique et se déverse dans la veine porte hépatique pour que les îlots soient exposés à la concentration de glucose systémique (13, 14).



Reproduit avec la permission de Rorsman et Ashcroft. 2018

Figure 2 : Représentation d'un îlot pancréatique de souris et d'humains.

A-B : Immunofluorescence d'un îlot de souris (A) et humain (B) (insuline, rouge ; glucagon, vert ; somatostatine, bleu) barre d'échelle à 20  $\mu\text{m}$ . C-D : Schématisation d'un îlot de souris (C) et humain, mettant en évidence la différence de distribution de cellules endocrines, d'innervation et de vascularisation dans l'îlot. E-F : visualisation par microscopie électronique de la cellule  $\beta$ . Barre d'échelle à 500 nm. m, mitochondrie ; l, corps lipofuscine ; sg, granules de sécrétion.

Les îlots pancréatiques sont innervés par différents nerfs cholinergiques, adrénérgiques et peptidergiques (15-17). Chez la souris, les nerfs sont directement en contact avec les cellules endocrines de l'îlot, alors que chez l'humain l'innervation semble être moins importante. La régulation du système autonome doit donc se faire de façon indirecte via des changements de flux sanguin.

Un îlot de Langerhans est composé d'un ensemble de cellules endocrines qui jouent un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie glycémique (Figure 2). Environ 50 % (chez l'homme) et 75 % (chez la souris) des cellules qui composent l'îlot sont des cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline. Près de 35-45 % (chez l'homme) et 15-20 % (chez la souris) sont des cellules  $\alpha$  sécrétrices de glucagon, puis 10-15 % (chez l'homme) et 5 % (chez la souris) sont des cellules  $\delta$  sécrétrices de somatostatine, dont la principale fonction est de réguler la sécrétion des autres cellules de l'îlot (18). L'îlot est aussi composé d'un petit nombre de cellules qui sécrètent du polypeptide pancréatique (PP) ainsi que de la ghréline. L'insuline et le glucagon sont des hormones anaboliques et cataboliques respectivement. L'insuline est la principale hormone hypoglycémisante de l'organisme, dont la fonction majeure est de stocker de l'énergie à partir des glucides, des protéines et des acides gras. Inversement, le glucagon a la fonction opposée de stimuler la mise en circulation du glucose à partir des acides gras, des acides aminés ou à partir du glycogène ; soit la principale réserve de glucose dans l'organisme (13).

Les îlots de souris ont une structure particulière où l'ensemble des cellules  $\beta$  se concentrent au centre de l'îlot, entouré des cellules  $\alpha$  en périphérie. Les îlots humains ont une architecture assez complexe où les cellules endocrines se répartissent aléatoirement pour former une mosaïque. Dans les deux espèces, les cellules  $\delta$  ont des ramifications qui sont en contact avec les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  (19) (Figure 2).

## I.1.2 La cellule $\beta$

### I.1.2.1 Composition et synthèse d'insuline

Dans toutes les espèces, les cellules  $\beta$  sont les composantes principales des îlots de Langerhans, avec pour fonction principale de sécréter de l'insuline. Elles se caractérisent par un diamètre moyen de 13-18  $\mu\text{m}$  (20) et contiennent  $\sim 10\,000$  granules de sécrétion (21). Environ, 5-10 % de l'insuline contenue dans la cellule  $\beta$  est stockée dans des granules sous forme cristalline d'un complexe  $\text{Zn}_2$  insuline<sub>6</sub> (Figure 2) et chaque granule contient  $\sim 100$  mM d'insuline (22). L'insuline est un polypeptide de 6 kDa, composé de deux chaînes, une chaîne A de 21 acides aminés avec un pont disulfure interne, et une chaîne B de 30 acides aminés qui lie la chaîne A via deux ponts disulfures (23). L'insuline est synthétisée dans la cellule  $\beta$  du pancréas sous forme d'un précurseur biologiquement inactif de 11,5 kDa, la préproinsuline. En entrant dans le réticulum endoplasmique, la préproinsuline perd un peptide signal de 23 acides aminés, ce qui lui permet de se replier à l'aide de ponts disulfures, formant ainsi la proinsuline. Celle-ci est alors transportée dans le Golgi pour y être empaquetée dans des granules de sécrétion. Elle est ensuite clivée par des convertases générant de l'insuline et le peptide C, un peptide de connexion qui reliait la chaîne A à la chaîne B. Lors de l'exocytose, la cellule  $\beta$  libère des granules qui sont composées 90-97 % d'une quantité équimolaire d'insuline et de peptide C, le reste étant principalement de la proinsuline (14).

Il est important de noter que l'insuline est sécrétée par la cellule  $\beta$  sous forme d'un hexamère qui se solubilise rapidement en monomères après l'exocytose. Cette dissolution du complexe est principalement induite par un changement de pH ainsi qu'une combinaison de répulsion électrostatique associée à une diminution de concentration d'insuline entre les vésicules de stockage et le milieu interstitiel du pancréas (24, 25). Les monomères d'insuline rejoignent la circulation via la veine porte où ils sont dirigés vers le foie qui joue un rôle clé dans la régulation de la concentration d'insuline circulante (26). Suite à une perfusion constante de glucose chez des sujets humains, les mesures simultanées de l'insulinémie à partir de la veine porte et de la veine périphérique ont montré que plus de 50% voire même 80% de l'insuline est éliminée par le foie lors de ce premier passage (26, 27). Un autre 25% est éliminé par le foie lors

du second passage de l'insuline. La concentration d'insuline circulante représente donc environ un tiers de la concentration d'insuline provenant initialement de la veine porte (28).

En raison de la courte demi-vie de l'insuline environ 5 min en circulation due à son extraction hépatique au premier passage avant l'atteinte de la circulation périphérique, il est préférable de doser le peptide C plutôt que l'insuline pour estimer la sécrétion d'insuline endogène. Les effets physiologiques de l'insuline sont très étendus. Bien qu'on lui reconnaisse principalement l'effet hypoglycémiant, qui consiste à stimuler la glycogénèse et inhiber la gluconéogenèse, l'insuline agit également sur le métabolisme lipidique en inhibant la lipolyse au niveau du tissu adipeux, et en stimulant la lipogénèse au niveau du foie et du tissu adipeux.

### I.1.2.2 Exocytose et sécrétion d'insuline

Lors de l'exocytose, la cellule  $\beta$  peut sécréter moins de 1 % de son contenu en granules par heure. Physiologiquement, il existe peu de nutriments qui peuvent stimuler directement la sécrétion d'insuline. On peut les classer principalement en deux catégories. Les initiateurs, qui sont capables de stimuler par eux même la sécrétion d'insuline et les amplificateurs, qui requièrent l'action d'un initiateur pour être effectifs (29, 30). Dans la classe des initiateurs, on retrouve le glucose, un des plus importants stimuli physiologiques, mais aussi la leucine, un acide aminé qui stimule le métabolisme endogène de certains nutriments et certains médicaments tels que les sulfamides. Alors que dans la classe des amplificateurs, on retrouve de nombreux acides gras, des acides aminés, ainsi que certaines hormones et neurotransmetteurs (13).

À l'instar des cellules musculaires ou nerveuses, les cellules  $\beta$  sont électriquement excitables. Cependant, la particularité de ces cellules est que ce sont des changements du métabolisme intracellulaire qui contrôlent le potentiel membranaire. En présence de concentrations non stimulantes de glucose (3mM), la cellule  $\beta$  sécrète peu d'insuline, soit environ (1U/h) (14). Toutefois, rapidement après un repas, le glucose entre dans la cellule  $\beta$  par diffusion facilitée via les transporteurs GLUT2 chez le rongeur et GLUT1 chez l'humain (13). Il est phosphorylé par la glucokinase puis dégradé pour générer du pyruvate, de la NADH et de l'ATP (31). Le pyruvate entre dans la mitochondrie pour y être métabolisé dans le cycle de l'acide

citrique et la chaîne de transport des électrons, afin de générer de l'adénosine triphosphate (ATP) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (32). L'augmentation du ratio ATP/ADP entraîne une fermeture des canaux potassiques ( $K_{ATP}$ ) à la membrane cytoplasmique, ce qui engendre une dépolarisation membranaire et une ouverture des canaux calciques voltages dépendants. L'influx de calcium dans la cellule déclenche une sécrétion d'insuline robuste et rapide pendant environ 10 min. Lors de cette première phase de sécrétion, c'est principalement le pool de granules d'insuline déjà formées et stockées à la membrane cellulaire qui fusionne avec la membrane cytoplasmique pour libérer l'insuline. Il s'ensuit une seconde phase de sécrétion, qui est moins robuste et beaucoup plus lente puisqu'elle requiert le recrutement des granules de stockage du compartiment intracellulaire vers la membrane cytoplasmique (33). Cette seconde phase nécessite un remodelage des filaments d'actine qui permet la migration des vésicules de sécrétion sur des microtubules à l'aide de la myosine (34). Une récente étude a démontré que la cellule  $\beta$  privilégie la sécrétion des granules nouvellement formés (35).

Lors des repas, la sécrétion d'insuline est augmentée de 5 à 10 fois, ce qui représente environ 40 U/jour (14). Il est important de noter qu'*in vivo*, le premier signal initiateur de la sécrétion d'insuline n'est pas induit par une augmentation significative des concentrations de glucose plasmatique, mais plutôt par les neurotransmetteurs libérés en réponse à un stimulus comme la vue ou l'odeur de la nourriture ou les incrétines, c'est-à-dire les hormones libérées par l'intestin suite à une ingestion de nourriture (13). Ceci s'explique par le fait que les concentrations de glucose au repos, 4-5 mM chez les individus sains, sont suffisantes pour permettre aux neurotransmetteurs et aux incrétines de stimuler la sécrétion d'insuline. Ils préviennent ainsi une augmentation trop importante du glucose plasmatique après le repas. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle la sécrétion d'insuline est plus importante suite à un test oral de tolérance au glucose plutôt que veineux. C'est aussi la raison pour laquelle lorsque la concentration de glucose passe de 5 à 7.5 mM sur des îlots isolés elle induit environ 30% de la sécrétion d'insuline (36), alors que cette même augmentation est d'environ 500% *in vivo* (37).

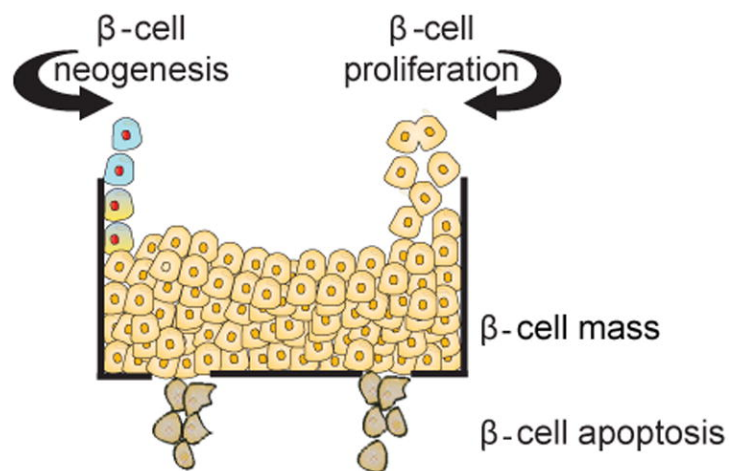


### I.1.2.3 Adaptation fonctionnelle de la cellule $\beta$ (sécrétion)

La cellule  $\beta$  se caractérise par une capacité remarquable à s'adapter aux besoins de l'organisme. Lorsque la sensibilité périphérique à l'insuline augmente, la cellule  $\beta$  sécrète moins d'insuline. Cependant, lorsque l'action biologique de l'insuline diminue, la cellule  $\beta$  sécrète davantage d'insuline. On rencontre ce phénomène d'adaptation dans des conditions physiologiques et pathologiques. Par exemple, lors d'une grossesse, la sécrétion d'insuline augmente de 2 à 4 fois en raison de la diminution de l'efficacité de l'insuline. Rapidement après l'accouchement, la situation revient à la normale (38). Le surplus de poids est un autre exemple de diminution de la sensibilité à l'insuline. En effet, un individu obèse non-diabétique sécrète 2 à 5 fois plus d'insuline en réponse au glucose qu'un individu avec un poids normal non-diabétique, et 5 à 10 fois plus d'insuline qu'un individu obèse diabétique de type 2 (39). Ce phénomène d'adaptation est aussi vrai lorsque la sensibilité à l'insuline est augmentée. Par exemple, un athlète de haut niveau sécrète 2 à 3 fois moins d'insuline qu'un individu non athlétique (40). Ceci s'explique par le fait que les athlètes nécessitent moins d'insuline en raison de leur forte utilisation du glucose par le muscle via un mécanisme insulino-indépendant. Le muscle contient des vésicules renfermant les transporteurs de glucose GLUT4 qui sont recrutées à la membrane cellulaire sous l'action de l'exercice pour capter le glucose circulant. Il est important de noter que ce pool de vésicules est distinct de celui qui est insulino-dépendant (41).

La compensation de la cellule  $\beta$  face à la résistance à l'insuline est médiée par de nombreux facteurs qui stimulent à la fois la masse et la sécrétion de l'insuline. Parmi ces facteurs on compte les nutriments, principalement le glucose et les acides gras, l'incrétine GLP-1 (de l'anglais, glucagon-like peptide), l'insuline et d'autres facteurs de croissance ainsi qu'une augmentation de la signalisation parasympathique (42). De nombreux modèles de résistance à l'insuline rapportent une augmentation du métabolisme du glucose qui se traduit par une élévation de l'activité de la glucokinase (43, 44), de l'oxydation du glucose et des voies anaplerotiques-cataplerotiques augmentant ainsi les facteurs de couplage nécessaires à la sécrétion d'insuline (45). Les acides gras libres potentialisent la sécrétion d'insuline via l'activation du récepteur GPR40 qui augmente les concentrations de calcium intracellulaire et les lipides

dérivé du cycle des glycerolipides / acides gras libres (42). L'effet insulinothéropique du GLP-1 est médié par un récepteur couplé aux protéines G qui active l'adénylate cyclase et augmente l'AMP cyclique (AMPc). L'AMPc active la protéine kinase A qui stimule le métabolisme du glucose augmentant ainsi la sécrétion d'insuline. Le GLP-1 n'agit qu'en présence de concentrations de glucose qui sont égales ou supérieures à la normoglycémie (46). Le GLP-1 et les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose de façon synergique (47). Le système nerveux autonome joue également un rôle clé dans la compensation des cellules  $\beta$  pancréatiques. Les systèmes sympathique et parasympathique inhibe et stimule respectivement la sécrétion d'insuline (48).



*Reproduit avec la permission de Khadra et Schnell. 2015*

*Figure 3 : Mécanismes régulateurs de la masse des cellules  $\beta$  en conditions physiologiques.*

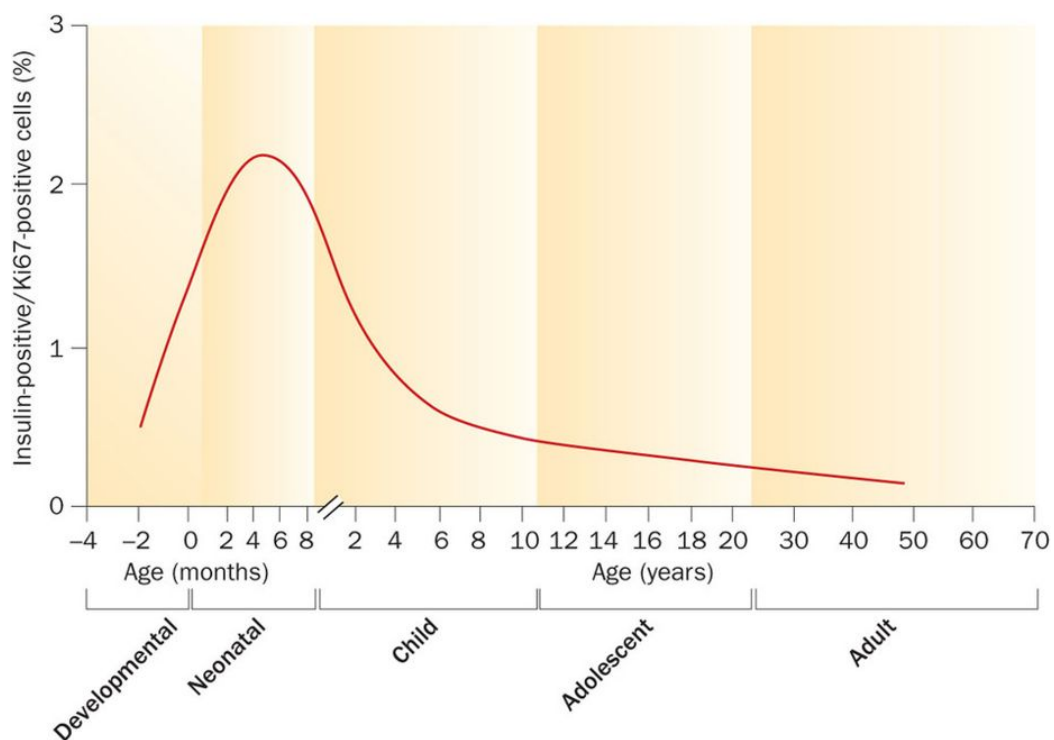
*Elle est définie par un équilibre entre les cellules  $\beta$  formées, par néogénèse ou prolifération, et les cellules  $\beta$  perdues par apoptose.*

#### I.1.2.4 Adaptation anatomique de la cellule $\beta$ (masse)

La masse des cellules  $\beta$  est un terme qui décrit à la fois le nombre et le volume de cellules  $\beta$ . Elle est déterminée par trois facteurs : la néogénèse, la réplication des cellules préexistantes, et la mort programmée des cellules  $\beta$  ou apoptose (Figure 3) (49, 50). En condition physiologique, l'apoptose des cellules  $\beta$  est faible. Cependant, elle peut être amplifiée en cas de perturbations métaboliques, comme une hyperglycémie ou une hyperlipidémie chronique (51). La néogénèse est un processus qui a lieu principalement au cours du développement embryonnaire ou lors de la croissance postnatale. Il consiste en la différenciation de cellules souches ou précurseurs provenant de l'îlot, des cellules ductales (du canal de Wirsung) ou de la moelle épinière, en cellules  $\beta$  (52). La prolifération des cellules  $\beta$ , quant à elle, est négligeable au stade embryonnaire et commence peu de temps après la naissance. Elle atteint un pic maximal lors de la première année de vie qui est d'environ 2 %, puis décroît par la suite jusqu'à atteindre un taux presque nul à l'âge adulte (Figure 4) (53, 54). Cependant, dans des conditions qui impliquent une diminution de la sensibilité à l'insuline telle que la grossesse ou l'obésité, la cellule  $\beta$  est en mesure de compenser en augmentant sa masse afin d'augmenter sa sécrétion d'insuline.

La compensation des cellules  $\beta$  a été décrite pour la première fois en 1933, lorsque Ogilvie a démontré que le nombre et la taille des îlots provenant de 19 donneurs obèses étaient anormalement élevés comparativement à ceux provenant de 19 donneurs avec un poids normal (55). Au cours des années qui ont suivi, de nombreux autres travaux ont rapporté ce même phénomène. De plus, indépendamment des variations interindividuelles, la masse des cellules  $\beta$  semblait augmenter d'environ 50-90 % chez les individus en surplus de poids ou obèses (56). En effet, en 2003, Butler et coll. (51) ont rapporté que le volume de cellules  $\beta$  était 50 % plus élevé chez les individus obèses non diabétiques comparativement à ceux de poids normal. Rahier et coll. (57) quant à eux, ont rapporté une augmentation de seulement 20 %. L'expansion de la masse des cellules  $\beta$  est un concept bien établi et l'origine des nouvelles cellules formées est variable. Certaines études rapportent que la réplication en est la principale source (58, 59), alors que d'autres suggèrent qu'elles proviennent de cellules souches progénitrices (60). Cependant, ceci est encore discutable chez l'humain. Dans leurs travaux, Butler et coll. (51) n'ont pas détecté un taux de prolifération significativement élevé chez les individus obèses, alors qu'ils ont observé

une augmentation significative de cellules ductales exprimant de l'insuline. Ceci suggère que l'augmentation de la masse des cellules  $\beta$  résulterait de la néogénèse plutôt que de la prolifération (51). De nombreuses autres études se sont par la suite alignées avec ces travaux en démontrant, encore une fois, que c'est la néogénèse et non la prolifération qui serait responsable de la compensation des cellules  $\beta$  (61, 62). Ceci nous amène à nous interroger sur la réalité de la prolifération des cellules  $\beta$  à l'âge adulte, un point qui sera davantage discuté au chapitre 4.



*Reproduit avec la permission de Wang et al. 2015*

*Figure 4 : Prolifération des cellules  $\beta$  en fonction de l'âge.*

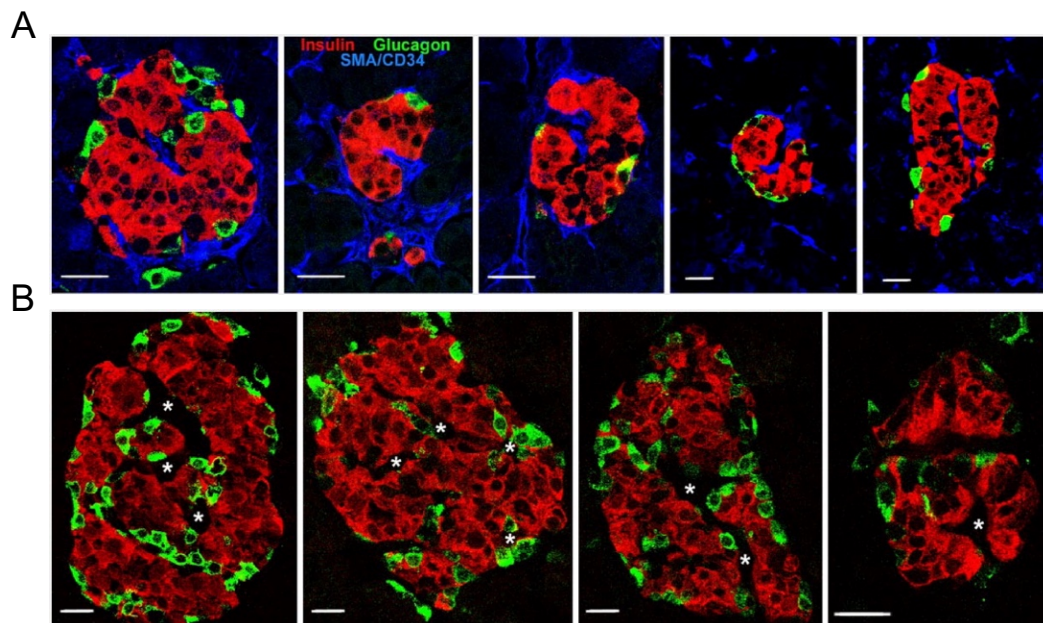
*La réplication des cellules  $\beta$  a été mesurée par un marquage immunologique dirigé contre le marqueur de prolifération Ki67 sur des sections provenant d'autopsies d'individus sains avec un (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>).*

### I.1.2.5 Hétérogénéité fonctionnelle de la cellule $\beta$

La notion d'hétérogénéité des cellules  $\beta$  est connue chez les rongeurs depuis 1980. En effet, on avait déjà démontré à l'époque une divergence dans la réponse des cellules  $\beta$  à un stimulus de glucose. Certaines cellules étaient plus sensibles que d'autres et sécrétaient davantage d'insuline (63-66). Chez l'humain, cette notion s'est peaufinée un peu plus récemment, avec l'émergence des techniques modernes telles que le séquençage d'ARN sur cellules uniques (de l'anglais, RNA seq), la cytométrie en flux, ou encore des études de suivi de lignées (de l'anglais, lineage tracing) (67, 68). Seule une faible portion de cellules  $\beta$  semble sécréter la majorité de l'insuline de l'îlot (69). Hodson et coll. (70) ont montré l'existence des cellules  $\beta$  « Hubs », capables de répondre rapidement à un stimulus de glucose, et de guider l'activité des autres cellules  $\beta$  sans pour autant les contrôler. Ces cellules ont également été identifiées chez le poisson-zèbre et les souris, où elles semblent coordonner le flux de calcium intracellulaire et donc la sécrétion d'insuline (71). Elles se caractérisent par une activité mitochondriale élevée qui les assujettit à un stress lipotoxique et proinflammatoire (70). Les cellules « Hubs » sont similaires aux cellules  $\beta$  immatures, elles expriment faiblement certains facteurs de transcription qui caractérisent la cellule  $\beta$  mature tels que PDX-1 et NKX6.1.

L'hétérogénéité est aussi au niveau de la structure et composition des îlots. En effet, l'organisation structurale des îlots humains semble être variable. Une étude récente de Bonner-Weir et coll. (72) a montré que l'architecture des petits îlots humains est semblable à celle des îlots de souris, c'est-à-dire, un noyau central composé principalement de cellules  $\beta$  entouré des autres cellules endocrines (Figure 5 A). Alors que celle des îlots de plus grandes tailles représente une mosaïque de cellules endocrines où les cellules  $\beta$  constituent plusieurs petits amas cellulaires enrobés d'autres types de cellules endocrines (Figure 5 B). Il est aussi important de noter qu'il existe une disparité quant à la composition des îlots humains provenant d'un même donneur. Les îlots riches en cellules PP se retrouvent à la tête du pancréas, tandis que ceux riches en cellules  $\alpha$  se localisent plutôt au niveau de la queue du pancréas (73-75). Les îlots riches en cellules  $\beta$  semblent augmenter en partant de la tête vers la queue du pancréas (76). L'ensemble de ces facteurs ainsi que de nombreux autres tels que l'innervation, la circulation et les interactions

cellule-cellule, affectent la sécrétion d'insuline et ajoutent de la complexité à l'étude des îlots humains.



*Adapté avec la permission de Bonner-Weir et al. 2015*

*Figure 5 : îlots pancréatiques provenant du donneur humain H0021.*

*Immunofluorescence à l'aide anticorps spécifiques. A : petit îlot (cellules  $\beta$ , rouge ;  $\alpha$ , vert ; vaisseaux, bleu). B : grand îlot (cellules  $\beta$ , rouge,  $\alpha$  et  $\delta$ , vert, vaisseaux, astérisque blanc*

## Chapitre II – Le diabète

### II.1 Épidémiologie du diabète

Au XXI<sup>e</sup> siècle, le diabète est une maladie pandémique qui devient un réel enjeu pour l'ensemble des systèmes de santé dans le monde. Aujourd'hui, environ 12 % des dépenses de santé mondiale sont consacrées au diabète, soit 673 milliards de dollars US. Bien qu'il ne soit pas classé comme une maladie dangereuse, le diabète est le 3<sup>e</sup> facteur de risque de mortalité prématurée après l'hypertension artérielle et le tabagisme, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (77).

En 2015, la fédération internationale du diabète (FID) estimait que près de 415 millions d'adultes entre 20 et 70 ans étaient atteints de cette maladie, soit une personne sur 11. De plus, environ un adulte diabétique sur 2 (46,5 %) n'est pas diagnostiqué. Si la tendance se maintient, d'ici 2040, on estime que cette maladie affectera près de 642 millions d'individus. Selon les estimations rapportées par la FID, 90 % des personnes diabétiques ont un diabète de type 2 (78-80), 7 % à 12 % ont un diabète de type 1, et 1 % à 3 % sont atteints par un autre type de diabète. Ils rapportent également qu'une naissance sur 7 est affectée par le diabète gestationnel, qui est en soi un facteur de risque de développer le diabète de type 2 plus tard. Bien que le diabète de type 1 soit moins fréquent que celui de type 2, sa prévalence augmente tout de même de 3 % dans le monde chaque année (77). Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle dont la prévalence s'explique principalement par une combinaison d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux.

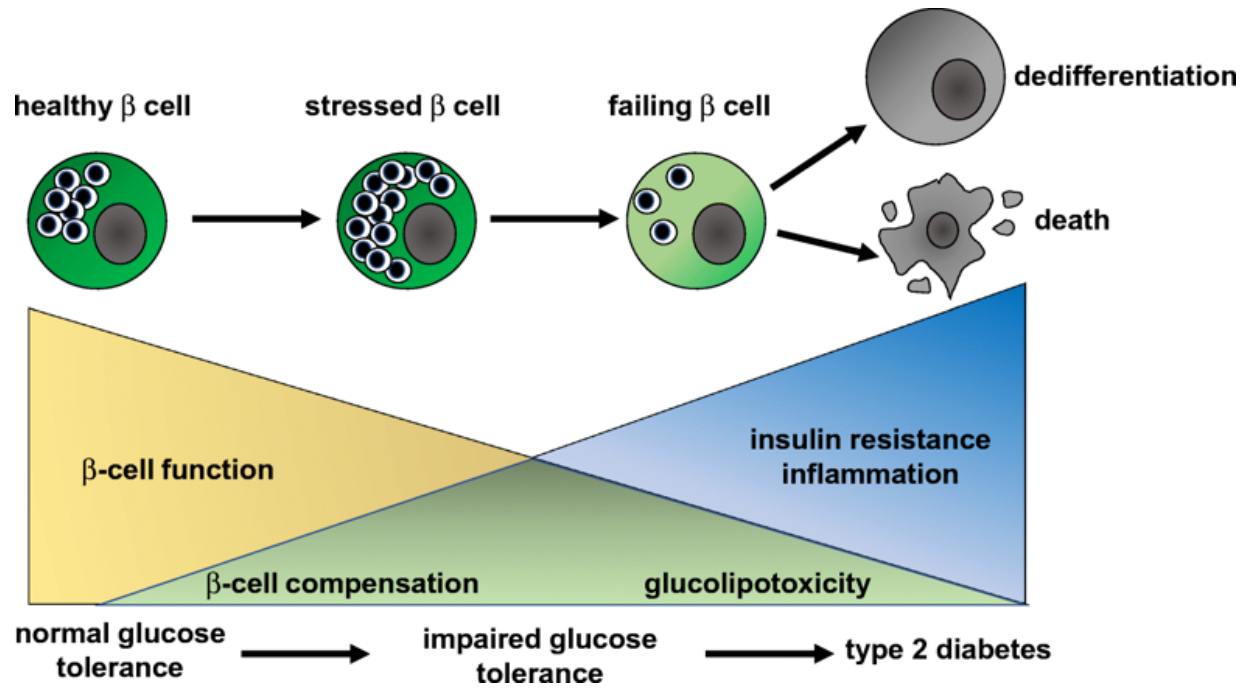
## II.2 Le diabète de type 1

Le diabète type 1, aussi connu sous le nom de diabète juvénile, se caractérise par une déficience en insuline causée principalement par une destruction auto-immune des cellules  $\beta$ . Ce type de diabète se manifeste généralement durant l'enfance, l'adolescence ou chez les jeunes adultes (81). C'est un diabète insulino-dépendant, c'est-à-dire que le contrôle de la glycémie se fait principalement par administration d'insuline exogène, soit en s'injectant quotidiennement ou à l'aide d'une pompe à insuline. Afin de maintenir un contrôle sur la glycémie, les traitements conventionnels nécessitent une administration basale d'insuline qui permet de contrôler la glycémie à jeun, mais aussi une administration prandiale lors des repas. À ce jour, on ignore ce qui déclenche l'attaque des cellules  $\beta$  par le système immunitaire. Nous savons seulement que ce processus évolue généralement sur de nombreuses années, et que c'est probablement une combinaison des facteurs génétiques et environnementaux qui contribue au développement de cette maladie (82).

## II.3 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) se caractérise par une hyperglycémie qui survient lorsque la cellule  $\beta$  n'est plus en mesure de sécréter suffisamment d'insuline (83). Notre compréhension actuelle de cette maladie est qu'au fil des années, il y a un défaut progressif de sécrétion d'insuline et une diminution de la sensibilité à l'action de celle-ci dans le foie, le muscle et le tissu adipeux (84). L'hyperglycémie qui caractérise le diabète est précédée d'une phase nommée pré-diabète, où la cellule  $\beta$  compense l'insensibilité à l'action de l'insuline en augmentant sa masse afin d'augmenter sa synthèse puis sa sécrétion (85). Cependant, dans un contexte chronique d'excès de nutriments, d'inflammation, et de résistance à l'action de l'insuline, il se produit un mécanisme de glucolipotoxicité. Celui-ci induit un dysfonctionnement ainsi qu'une perte de masse des cellules  $\beta$  entraînant une hyperglycémie (Figure 6).





Reproduit avec la permission de Christensen et Gannon. 2019

Figure 6 : Schématisation de la progression du Diabète de type 2.

Initialement la cellule  $\beta$  compense la résistance à l'insuline en augmentant sa masse, puis sa sécrétion d'insuline pour maintenir une glycémie normale. Une exposition prolongée à la résistance à l'insuline et à l'inflammation cause un stress sur la cellule  $\beta$  qui entre en décompensation, ce qui occasionne un défaut de tolérance au glucose (prédiabète). Une exposition prolongée à de l'hyperglycémie et de l'hyperlipidémie engendre une glucolipotoxicité qui endommage la cellule  $\beta$ . La masse de ces cellules diminue alors en raison de l'apoptose ou de la perte d'identité (dédifférenciation). Il en résulte un diabète de type 2.

Une étude longitudinale réalisée auprès des Pimas, un peuple nord-amérindien, a démontré que la dysfonction des cellules  $\beta$  est la principale cause d'hyperglycémie (86). Chez les patients diabétiques de type 2, on observe un déclin progressif dans la fonction de la cellule  $\beta$  qui s'explique par la perte de ces cellules (87). Pendant de nombreuses années, la mort cellulaire programmée, ou apoptose, a été considérée comme la cause principale de la perte de masse des cellules  $\beta$  (87). Aujourd'hui, ce paradigme a été remis en question par des chercheurs qui ont démontré que c'est davantage une perte d'identité de la cellule  $\beta$  soit par dédifférenciation ou par sénescence plutôt qu'une perte de masse par apoptose. En effet, avec la progression de la pathogenèse du DT2, la cellule  $\beta$  mature perd ce qui la caractérise, à savoir l'expression du gène de l'insuline ainsi que de certains facteurs de transcriptions qui lui sont propres tels que PDX-1, NKX6.1 ou encore MafA (88-91).

Le diabète de type 2 est une maladie silencieuse dont l'évolution au fil du temps varie d'un individu à l'autre. Bien que la résistance à l'insuline et l'épuisement fonctionnel des cellules  $\beta$  soient à l'origine de la progression de cette maladie, il est toutefois important de souligner qu'il semble y avoir une discordance entre les individus quant à leur réponse sécrétoire face à la diminution de l'efficacité de l'insuline. Certains compensent avec une réponse robuste en sécrétant suffisamment d'insuline pour maintenir une glycémie normale (61), alors que d'autres seront moins en mesure de compenser et nécessiteront rapidement un traitement pour normaliser leur glycémie. La compréhension de la physiopathologie de la cellule  $\beta$  ainsi que des mécanismes moléculaires régissant la compensation de ces cellules, serait donc un atout majeur dans les futurs traitements du DT2.

## I.3.1 L'étiologie du diabète de type 2

### I.3.1.1 Les facteurs génétiques

Le DT2 est une maladie complexe qui résulte d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Chez les jumeaux monozygotes, le taux de concordance du DT2 est de 70%, alors que chez les jumeaux dizygotes il est seulement de 20-30 % (92, 93). De plus, le risque de développer un DT2 est de 40% si un des deux parents en est atteint, et de 70% si les deux le sont (94). Ce risque est beaucoup plus élevé lorsque c'est la mère qui est atteinte de cette maladie (95). L'ensemble de ces évidences démontrent que DT2 a une composante génétique. Dans les années 2000, des études d'associations pangénomiques (GWAS ; de l'anglais, genome-wide association studies) ont identifié des polymorphismes mononucléotides (SNP) associés au DT2. Les premiers SNP identifiés étaient dans les gènes codants pour *PPARG* (96), et *TCFL* (97). *TCFL* code pour le facteur de transcription *TCFL2*, qui est un important régulateur de la masse et la fonction des cellules  $\beta$  (98). La délétion de *Tcfl2* dans un modèle murin entraîne une réduction de 30 % de la masse des cellules  $\beta$  ainsi qu'un défaut de sécrétion en réponse au glucose (98). De nombreux SNP ont été identifiés dans plusieurs gènes tels que *SLC30A8*, *FTO*, *CDKAL1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *HHEX*, *IGF2BP2*, *GCKR* et de nombreux autres (99-101). À ce jour, les études GWAS ont rapporté plus de 150 polymorphismes qui correspondent à environ 120 différents loci qui sont associés au DT2. L'ensemble des polymorphismes identifiés expliquent environ 15 % de la transmission héréditaire, il reste donc environ 85 % qui pourraient s'expliquer par l'hétérogénéité du DT2 et l'épigénétique (Figure 7) (102).

### I.3.1.2 Les facteurs épigénétiques

L'épigénétique inclut toutes modifications héréditaires d'un gène qui n'affectent pas la séquence de nucléotides de l'ADN. Parmi les modifications épigénétiques, on compte la méthylation de l'ADN, les ARN non codants et les modifications post-traductionnelles des histones qui altèrent le repliement de la chromatine, et donc l'expression des gènes (102).

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupe méthyle dans la région 5' des cytosines de l'ADN. Une faible méthylation se traduit par une forte expression alors qu'à l'inverse une méthylation élevée inactive le gène. La littérature rapporte de nombreuses évidences de modifications épigénétiques impliquées dans la pathogenèse du DT2. Par exemple, une hyperméthylation a été rapportée dans la région du promoteur du gène codant pour *PPARGC1A*. Un important régulateur de la sécrétion d'insuline, dont l'expression est altérée dans les îlots provenant de donneurs DT2 (103). Une hyperméthylation dans la région du promoteur du gène codant pour *PDX-1*, un facteur de transcription qui maintient l'identité de la cellule  $\beta$  (104) et dont l'expression est aussi altérée dans les îlots provenant de donneurs DT2 (105), a également été décrite. Enfin, il se pourrait que la diminution de l'expression du gène de l'insuline soit associée à l'augmentation de méthylation de son promoteur (106). Les ARN non codants sont un autre exemple de modifications épigénétiques associées au DT2. D'ailleurs Kaestner et coll (107, 108) ont identifié un groupe de miRNAs dont l'expression est diminuée dans des îlots provenant de DT2 en raison d'un excès de méthylation de leur ADN.

#### I.3.1.2 Les facteurs environnementaux

L'obésité résultant d'une combinaison de sédentarité à une diète obésogène est un important facteur de risque du DT2. L'étude DiRECT (109) a démontré qu'une intervention dans le mode de vie consistant en une perte de poids, une alimentation plus saine et un maintien d'activité physique, auprès des patients diabétiques nouvellement diagnostiqués permet une rémission du DT2. L'âge, l'hypertension, le tabagisme (110), les atteintes inflammatoires du pancréas causées par l'alcool, les maladies de surcharge ou la mauvaise nutrition constituent aussi des facteurs de risque pour le DT2 (83, 111). En conclusion, le maintien d'une bonne hygiène de vie favorise la prévention du DT2.

## Chapitre III – Dysfonction et plasticité de la cellule $\beta$

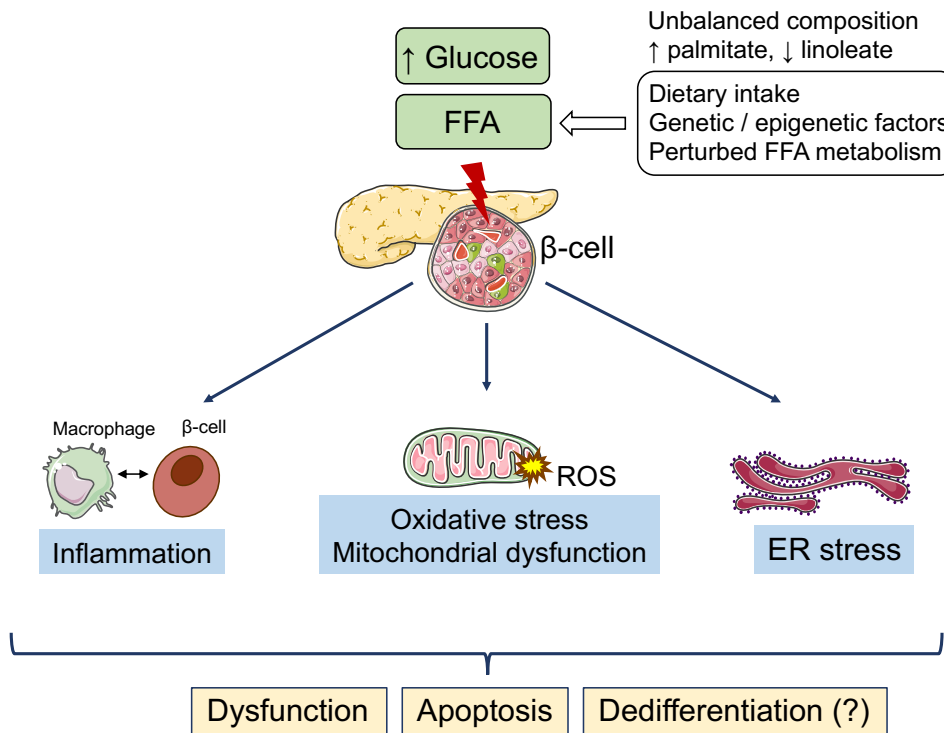
### III. 1 Dysfonction de la cellule $\beta$ dans le DT2

Depuis 1975, l'obésité a triplé dans le monde entier augmentant ainsi la prévalence du diabète de type 2. L'obésité est associée à une hausse des acides gras libres circulant qui résultent d'une expansion de la masse du tissu adipeux et d'une diminution de la clairance des acides gras. L'augmentation des acides gras libres circulant contribue à une résistance à l'insuline ainsi qu'à une dysfonction de la cellule  $\beta$  (112). L'acide gras le plus délétère pour l'organisme est le palmitate. Associé au DT2, de nombreux travaux réalisés *ex vivo* sur des îlots provenant de rongeurs ou de donneurs humains montrent l'effet toxique du palmitate dans la cellule  $\beta$  (113). Combiné à de l'hyperglycémie, l'effet des acides gras libres est encore plus nocif et connu sous le nom de glucolipotoxicité. Ce concept regroupe l'activation de nombreux mécanismes qui sont impliqués dans la dysfonction de la cellule  $\beta$  telle que l'inflammation le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique (RE) (114).

#### III.1.1 Glucolipotoxicité

La glucolipotoxicité résulte d'une exposition chronique à un excès de sucre et d'acides gras libres. La combinaison de ces deux facteurs nuit au bon fonctionnement de la cellule  $\beta$  en altérant la signalisation intracellulaire. L'augmentation des concentrations d'acides gras libres intracellulaires inhibe l'oxydation du glucose au niveau de la pyruvate déshydrogénase, ce qui force l'utilisation du glucose par des voies intermédiaires telles que la voie de synthèse du glycogène, la voie des hexosamines et polyols ainsi que la voie de glycation des produits (AGE) (115, 116). De la même manière, l'augmentation du glucose perturbe la signalisation des acides gras. Prentki et Corkey (117) ont été les premiers à proposer que le glucose contrôle le métabolisme des acides gras dans la cellule  $\beta$ . En présence d'une faible quantité de glucose, les acides gras sont transportés dans la mitochondrie via la carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) pour y être dégradés par le biais de la  $\beta$ -oxydation. Par contre, lorsque le glucose est élevé dans la cellule, il mène à la formation de signaux cataplérotiques qui inhibent l'activité de CPT1 et

bloquent ainsi la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la cellule  $\beta$ . Ceci entraîne une accumulation de diacylglycérols, des esters de cholestérol et des céramides (118, 119). L'activation de l'ensemble de ces voies mène à un défaut de synthèse et de sécrétion de l'insuline en réponse au glucose ainsi qu'à l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques ; ce qui contribue à la pathogenèse du DT2 (Figure 7).



Adapté avec la permission de Lytrivi et al. 2020

Figure 7 : Mécanismes contribuant à de la glucolipotoxicité des cellules  $\beta$  pancréatiques.

L'excès de nutriments (glucose + acides gras libres), chez les individus avec une prédisposition génétique, induit de l'inflammation, un stress oxydant et un stress du RE qui cause une dysfonction et perte des cellules  $\beta$  pancréatiques.

### III.1.2 Inflammation

Plusieurs observations suggèrent une contribution de l'inflammation associée à l'obésité au DT2. Dans un contexte d'excès de nutriments, des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires sont libérées par le système immunitaire, le tissu adipeux ainsi que les cellules endothéliales. Ceci contribue à l'inflammation à bas bruit de nombreux autres organes tels que le foie et les îlots de Langerhans (120).

De nombreux travaux ont montré que les acides gras stimulent les voies pro-inflammatoires qui ont un effet délétère sur les îlots (121). Cependant, il est important de distinguer les acides gras insaturés tels que l'oléate, des acides gras saturés comme le palmitate. L'oléate est généralement associé à un effet protecteur. Dans les cellules  $\beta$ , il prévient l'apoptose. Alors qu'en périphérie, il augmente la sensibilité à l'insuline et régule les concentrations de glucose plasmatiques (122). Le palmitate, un des acides gras saturés le plus présent dans la circulation, semble être la principale cause de dysfonctionnement des cellules  $\beta$  (123). Associé au stress oxydant et au stress du réticulum endoplasmique, il semble également être responsable de l'activation des chimiokines (CXCL1, CCL3) et cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL8) (124, 125).

Une accumulation de macrophages et une augmentation de l'expression de l'interleukine *IL1  $\beta$*  ont été rapportées dans les îlots provenant de donneurs DT2. L'infiltration de macrophages stimule inévitablement la production de cytokines pro-inflammatoires ; ceci induit la libération de chimiokines par les cellules  $\beta$ , qui recrutent les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes au pancréas (126, 127). La délétion systémique des macrophages, par injection de liposomes de clodronate, dans un modèle proinflammatoire sous une diète obésogène a diminué l'expression d' *IL1  $\beta$*  et amélioré la sécrétion d'insuline *ex vivo* comparativement au groupe contrôle (128). L'hyperglycémie stimule l'expression et la sécrétion de *IL1  $\beta$*  et du récepteur de mort cellulaire Fas ainsi que l'activation de NF- $\kappa$ B (de l'anglais, nuclear factor-kappa  $\beta$ ) qui induit l'apoptose des cellules  $\beta$  d'îlots humains cultivés *ex vivo*. (129). Réduire l'expression d'*IL1  $\beta$*  améliore la fonction des cellules  $\beta$  et l'homéostasie du glucose dans un modèle de rongeur de DT2 (130). Néanmoins, il est important de souligner que les études cliniques visant à tester l'efficacité des antagonistes du récepteur de l'*IL1  $\beta$*  ont été décevantes (131, 132).

### III.1.3 Le stress oxydant

Les ROS sont des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène qui jouent un rôle physiologique et pathologique important. Générés par phosphorylation oxydative dans les mitochondries, ils sont rapidement neutralisés par les enzymes antioxydantes des cellules afin de maintenir un équilibre redox. Les cellules  $\beta$  requièrent une faible quantité de ROS pour stimuler la sécrétion d'insuline. Traiter ces cellules avec un antioxydant abolit cette sécrétion (133). Cependant, une concentration trop élevée de ROS les endommage (134). Les cellules  $\beta$  sont plus vulnérables au stress oxydant en raison de leur forte consommation d'oxygène et faible contenu en enzymes antioxydantes (135).

De nombreuses études ont démontré qu'un excès de nutriments, glucose et acides gras libres, stimule la production de ROS par différents mécanismes (136). Par exemple, l'excès de glucose génère des ROS via ses métabolites, qui sont dirigés vers des voies métaboliques alternatives telles que celles des glucosamines, des hexosamines ou la formation des dihydroxyacétones et diacylglycérols (118). L'hyperglycémie peut également stimuler l'expression de la Protéine d'interaction avec la thiorédoxine (TXNIP) qui induit l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques. TXNIP est un facteur du stress oxydant synthétisé en réponse à de la glucolipotoxicité (137). Des niveaux circulants élevés de TXNIP ont été observés chez les personnes en phase de prédiabète. Ces niveaux sont d'autant plus élevés chez les patients atteints d'un DT2 (138). La délétion de TXNIP dans un modèle murin favorise la sécrétion d'insuline et prévient la dysfonction des cellules  $\beta$  (137). De plus, l'incidence du DT2 est diminuée chez des patients traités au vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques et de l'expression de TXNIP (137).

Dans le cas des acides gras à longues chaînes, c'est plutôt la  $\beta$ -oxydation qui est responsable de la production de ROS. En effet, la  $\beta$ -oxydation du palmitate, dans le peroxydosome, génère du  $H_2O_2$  qui contribue au stress oxydant (139). De plus, un excès de glucose et de palmitate active la NADPH oxydase, qui stimule la production de l'ion superoxyde (140). Chez les patients diabétiques, l'équilibre redox est rompu menant à un excès de ROS et un stress oxydant ; ceci cause de nombreux dommages cellulaires contribuant aux dysfonctions des cellules  $\beta$



pancréatiques, à la résistance à l'insuline et au développement des complications diabétiques (134, 141-143). La surexpression du glutathion peroxydase, une enzyme de détoxification, spécifiquement dans la cellule  $\beta$  d'un modèle murin db/db diabétique obèse, protège ces souris de la perte et dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (144).

### **III.1.4 Stress du réticulum endoplasmique**

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite des cellules eucaryotes jouant un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. On lui reconnaît de nombreuses fonctions telles que la synthèse de lipides (triglycérides, cholestérol, phospholipides) et de protéines. Le RE est aussi un site de stockage du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaire. De plus, c'est dans la lumière du RE que les modifications post-traductionnelles, oligomérisation, ajout de ponts disulfures, N-glycosylation, sont apportées aux protéines (145). Toute condition altérant la fonction du RE en perturbant l'homéostasie cellulaire cause un stress du RE (146). Une hyperglycémie chronique génère, par exemple, un stress du RE dans les cellules  $\beta$  en raison d'une demande accrue en synthèse et sécrétion d'insuline.

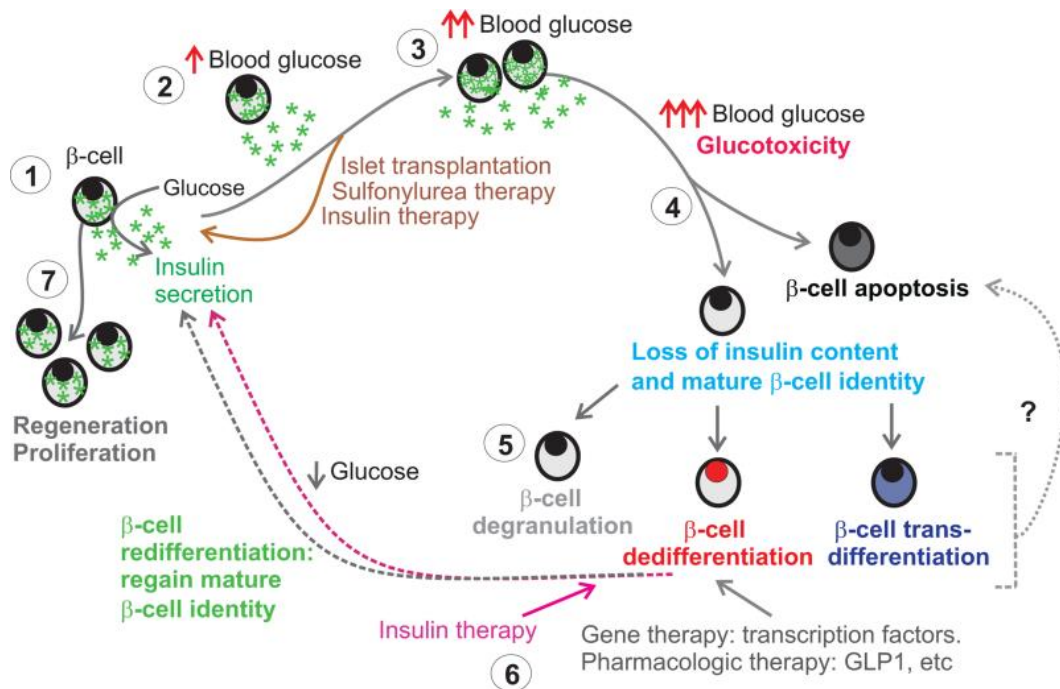
La réponse physiologique, pour compenser le stress du RE, est l'activation de la voie UPR (de l'anglais, unfolded protein response) dont les principaux médiateurs sont PERK (de l'anglais, PKR-like ER kinase), IRE1 (de l'anglais, inositol-requiring enzyme 1), ATF6 (de l'anglais, activating transcription factor 6), et XBP1 (de l'anglais, X box-binding protein 1). Ces facteurs jouent un rôle majeur dans la régulation de la synthèse protéique. Leur principale fonction est de veiller au bon repliement des protéines. Ils vont donc inhiber ou retarder la synthèse protéique pour laisser le temps aux protéines nouvellement formées de se replier correctement. En cas de mauvais repliements, ils s'assurent de la dégradation de celles-ci (147) (148, 149). Une activation prolongée de la voie UPR peut mener à l'activation du facteur proapoptotique CHOP (de l'anglais, C/EBP homologous protein), qui stimule l'apoptose cellulaire. Le stress du RE et l'activation de la réponse UPR jouent un rôle majeur dans l'apoptose des cellules  $\beta$ . Des mutations des gènes du RE sont responsables des diabètes monogéniques. Le syndrome de Wolfram, reconnu sous l'acronyme DIDMOAD (de l'anglais, diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness) en est un exemple. Considéré comme un diabète de type 1, il résulte principalement

d'une perte des cellules  $\beta$ , due à une mutation du gène *Wfs1* codant pour la wolframine. La wolframine est une protéine transmembranaire du RE qui régule le calcium intracellulaire et prévient le stress du RE (150). Un autre exemple serait le syndrome Wolcott-Rallison ; également considéré comme un diabète juvénile, il est causé par la perte de fonction de la kinase PERK, qui conduit à l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques (151). Des souris invalidées globalement pour le gène *Perk* (*PERK*<sup>-/-</sup>) développent le diabète dans leurs premières semaines de vie en raison d'une destruction de leurs cellules  $\beta$  (152). La souris Akita est un autre modèle de diabète causé par le stress du RE. Caractérisées par une mutation du gène de l'insuline conduisant à une accumulation de la pro-insuline mutée dans le RE, ce qui déclenche la réponse UPR et induit la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques (153). Chez les patients DT2, les dépôts amyloïdes dans leurs cellules  $\beta$  induisent un stress du RE (154). Par ailleurs, les marqueurs du stress du RE sont augmentés dans des îlots provenant de donneurs DT2 (155). Un des mécanismes proposés pour la metformine, un des médicaments les plus utilisés pour traiter le DT2, est la réduction du stress oxydant et du stress du RE (156).

### III.2 Plasticité de la cellule $\beta$ dans le DT2

Traditionnellement, une cellule  $\beta$  se définit comme une cellule productrice et sécrétrice d'insuline en réponse à différents stimuli métaboliques tels que le glucose. Elle s'identifie donc par un marquage immunologique dirigé envers l'insuline et la masse des cellules  $\beta$  se calcul en conséquence. La perte du marquage insuline est associée à une perte de cellules  $\beta$  par apoptose. Or ceci n'est plus tout à fait vrai puisque nous savons aujourd'hui, que dans la pathogenèse du DT2, la cellule  $\beta$  peut soit perdre son contenu en insuline par un mécanisme de degranulation ou perdre son identité par un mécanisme de dédifférenciation, de sénescence ou de transdifférenciation (Figure 8) (51, 88, 157-160). Chacun de ces termes décrit un état précis et a été mis en évidence dans des îlots provenant de donneurs DT2 (159, 161). La Dédifférenciation est un phénomène par lequel une cellule  $\beta$  mature est convertie en une cellule  $\beta$  immature progénitrice ; elle ne doit pas être confondue avec la reprogrammation cellulaire qui consiste à transformer une cellule mature en une cellule souche pluripotente capable de se différencier à son tour en cellule mature (162). La sénescence est d'avantage un perte d'identité de la cellule  $\beta$

en raison du vieillissement (163), alors que la transdifférenciation est un phénomène par lequel la cellule  $\beta$  mature est convertie en un autre type de cellule mature (164). Chacun de ces mécanismes est discuté plus en détail dans la section suivante.



Reproduit avec la permission de Remedi et Emfinger. 2016

Figure 8 : L'identité de la cellule  $\beta$  est dictée par le métabolisme.

(1) Au repos, la cellule  $\beta$  secrète de l'insuline en réponse à une augmentation de glucose. (2) La cellule  $\beta$  est dans une phase de compensation où elle stimule sa prolifération afin d'augmenter sa masse puis sa sécrétion d'insuline. À ce stade une intervention avec un traitement (flèche brune) permettrait de prévenir la dysfonction de la cellule  $\beta$ . (3) L'hyperglycémie chronique en combinaison avec l'excès d'acides gras induit un glucolipotoxicité qui entraîne une dysfonction de la cellule  $\beta$ . La cellule  $\beta$  peut alors soit se diriger vers l'apoptose (4) ou perd son identité en perdant l'expression du gène de l'insuline ainsi que les facteurs de transcription qui la caractérise (5). En perdant son identité la cellule  $\beta$  a le choix de se dédifférencier en cellule  $\beta$  progénitrice immature, ou de se transdifférencier en une autre cellule endocrine mature. (6) Avec une thérapie génique

*ou pharmacologique (flèche grise) ou de l'insuline exogène (flèche rose), la glucolipototoxicité diminue et il devient possible de restaurer éventuellement la fonction de la cellule  $\beta$  via certains mécanismes comme la transdifférenciation d'autres cellules en cellules  $\beta$  ou même la prolifération. Certaines conditions physiologiques rapportent une augmentation de la masse de cellules  $\beta$  associée à la prolifération de ces cellules.*

### **III.2.1 Dédifférenciation**

La dédifférenciation est un phénomène qui se produit en réponse à une exposition prolongée à l'hyperglycémie (165). Les mécanismes exacts qui sous-tendent cette perte d'identité commencent seulement à être élucidés. Weir et coll. (165) ont défini la dédifférenciation comme étant la perte de facteurs clés nécessaires au bon fonctionnement de la cellule  $\beta$ , comme la perte de certains facteurs de transcription impliqués dans la sécrétion de l'insuline. Les cellules  $\beta$  provenant de donneurs DT2 ou du modèle murin obèse diabétique db/db affichent une perte de l'expression de certains facteurs de transcription tels que MafA et PDX-1 (166). De plus, le consensus actuel définit la dédifférenciation comme étant un phénomène par lequel la cellule  $\beta$  est convertie ou « régresse » au stade de cellule progénitrice immature identique à celle retrouvée au cours du premier stade du développement.

En se basant sur la méthode de suivi de lignées (de l'anglais, lineage tracing), de nombreuses études ont identifié les facteurs de transcription PDX-1, PAX6, NKX6.1, NKX2.2, FOXO1 et MafA comme étant nécessaires au maintien de l'identité de la cellule  $\beta$  mature (164, 167, 168). L'inactivation ou la délétion de certains de ces facteurs de transcription, dans des modèles murins, induit une dysfonction ou une perte d'identité de la cellule  $\beta$ . Par exemple, l'inactivation de MafA entraîne une perte de sécrétion d'insuline, en réponse au glucose, sans affecter la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques (166). La perte du facteur de transcription FOXO1 dans des cellules  $\beta$  de souris adultes conduit à l'expression de neurogénine 3 (Ngn3), OCT 4 et Nanog considérés comme des marqueurs de cellules progénitrices de l'îlot (88). La dédifférenciation consiste donc en la perte de facteurs de transcription caractéristiques de cellules  $\beta$  matures et l'acquisition de nouveaux facteurs de transcription caractéristiques des cellules progénitrices de l'îlot.

### III.2.2 Sénescence

La sénescence des cellules  $\beta$  est un processus physiologique qui survient avec le vieillissement et qui contribue probablement à la pathogénèse du diabète (160). La cellule  $\beta$  sénescence est réfractaire à la division cellulaire et résistante à l'apoptose (169). Elle se caractérise par une diminution de l'expression des gènes responsables du maintien de son identité tel que (*Insulin 1*, *MafA*, *Nkx6.1*, *Pdx1*), une dérégulation des gènes nommés « Disallowed gene » (*Ldha* et *Cat*) et une augmentation des marqueurs de sénescence tels que IGF1R, p16ink4a, p53BP1 et  $\beta$ -galactosidase (159, 160). Lorsque la sénescence persiste, la cellule acquiert alors un sécrétome composé de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance, de protéases et de facteurs de la matrice extracellulaire qui sont connus sous le nom de SASP (de l'anglais, senescence-associated secretory phenotype) (169-173).

Des études transcriptomiques de séquençage à ARN ont permis d'identifier une population de cellules  $\beta$  sénescence dans les îlots de Langerhans de souris âgées (159). Ces cellules se caractérisent par un défaut de sécrétion d'insuline avec une insulémie basale élevée et un défaut de réponse à un stimulus. Cette population a également été identifiée dans des modèles murins hyperglycémiques et hyperinsulinémiques indépendamment du vieillissement (159, 174). L'insulinorésistance induite par une diète obésogène ou pharmacologiquement à l'aide de l'inhibiteur du récepteur à l'insuline S961 promeut la sénescence des cellules  $\beta$  induisant ainsi une perte de leur fonction et identité (160). L'utilisation de modèles sénolytiques génétiques ou pharmacologiques a permis d'éliminer les cellules sénescence et de restaurer la fonction ainsi que l'identité de ces cellules. Les cellules sénescence ont également été décrites dans les souris NOD, un modèle murin de diabète autoimmun et les patients diabétiques de type 1 (174). Encore une fois, l'utilisation de médicaments sénolytiques a permis d'éliminer les cellules sénescence pour préserver la masse fonctionnelle des cellules  $\beta$  prévenant ainsi la progression du diabète de type 1.

Bien que la sénescence et la différenciation réfèrent tous les deux à un état de perte d'identité de la cellule  $\beta$ , ces deux processus sont mécaniquement distincts. La sénescence fait référence à une cellule  $\beta$  âgée avec un défaut de sécrétion d'insuline et l'acquisition d'un phénotype de

senescence. Elle contribue à la progression de la pathogénèse diabétique et l'élimination des cellules sénescents permet d'améliorer la fonction métabolique. À l'inverse, la redifférenciation consiste plutôt en l'acquisition d'un phénotype d'une jeune cellule avec l'expression de marqueurs de cellules progénitrices. Chez le rongeur, ces cellules sont en mesure de se redifférencier en cellules  $\beta$  avec la normalisation de la glycémie (175). La redifférenciation serait donc un moyen de préserver la masse fonctionnelle des cellules  $\beta$ .

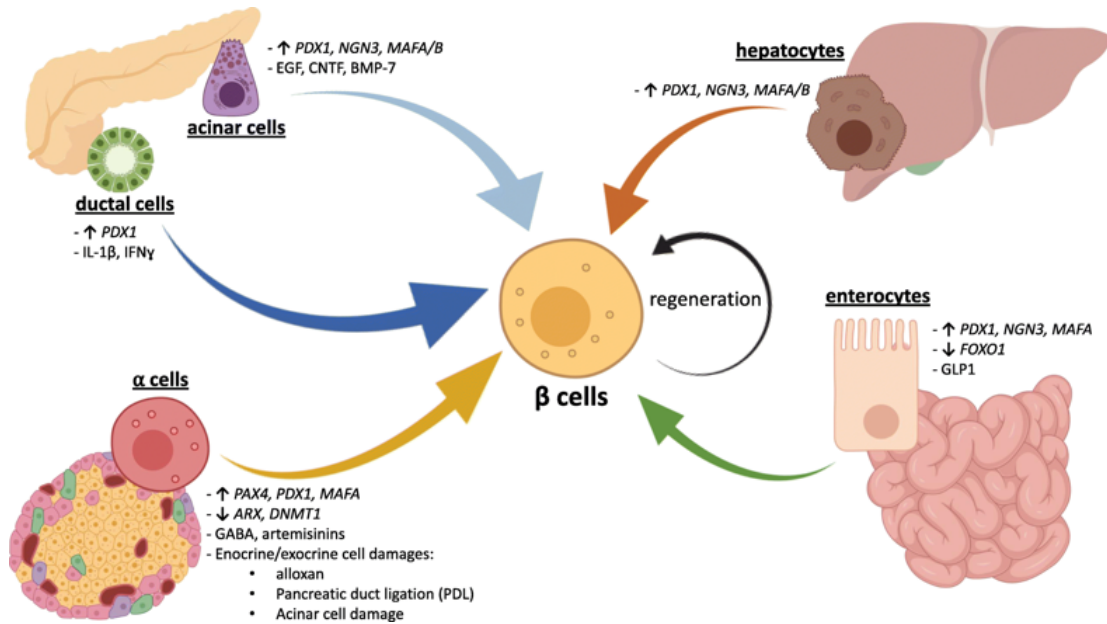
### III.2.3 Transdifférenciation

Le terme transdifférenciation consiste en la conversion d'un certain type cellulaire en un autre type. Il s'applique par exemple lorsque la cellule  $\beta$  mature est convertie en un autre type de cellules matures, et inversement. De nombreuses études ont rapporté ce phénomène. Par exemple, une petite fraction des cellules  $\beta$  est convertie en cellules  $\alpha$  sécrétrices de glucagon dans un modèle de souris hyperglycémiques en raison de l'inactivation spécifique de *FOXO1* dans leurs cellules  $\beta$  (88). Dans un autre modèle murin, la délétion de *PDX1* dans les cellules  $\beta$  de souris adultes induit également la transdifférenciation de cellules  $\beta$  en cellules  $\alpha$  en exprimant *ARX1*, un facteur de transcription spécifique à ces cellules (104). Enfin, la transdifférenciation des cellules  $\beta$  en  $\alpha$  a été détectée dans les îlots humains cultivés pendant 96 heures *ex vivo*, l'inactivation de *ARX1* dans ces îlots a empêché leur transdifférenciation (176). Donc la perte de certains facteurs de transcription nécessaires au maintien de l'identité de la cellule  $\beta$  induit leur transdifférenciation en cellules  $\alpha$ .

Le terme transdifférenciation est également employé lorsque d'autres cellules endocrines sont converties en cellules  $\beta$  (Figure 9). Ceci peut se produire dans des conditions extrêmes de pertes du contenu en cellules  $\beta$ . Par exemple, l'ablation de près de 95 % des cellules  $\beta$  dans un modèle murin ou de poisson-zèbre induit la conversion de cellules  $\alpha$  en cellules  $\beta$  (177, 178). Ceci suggère que les cellules  $\alpha$  sont en mesure de détecter la perte des cellules  $\beta$  et de réagir en conséquence. Le mécanisme précis qui sous-tend cette transdifférenciation des cellules  $\alpha$  en cellules  $\beta$  n'a pas encore été élucidé, cependant certains groupes ont émis l'hypothèse que l'insuline en serait responsable. Elle agirait comme un inhibiteur de la transdifférenciation et donc

l'inhibition serait levée en son absence (179). Les cellules acinaires pancréatiques sont également capables de se convertir en cellules  $\beta$  fonctionnelles en activant certains gènes de transcriptions importants pour l'identité des cellules  $\beta$  tels que *Ngn3*, *Pdx1* et *MafA* (180, 181). Ces nouvelles cellules  $\beta$  semblent être en mesure de restaurer une glycémie normale dans un modèle d'hyperglycémie induite par traitement à la streptozotocine. Une des critiques que l'on pourrait avoir à l'égard de la transdifférenciation est que l'on ignore encore si ce phénomène se produit naturellement dans les îlots de donneurs DT2 humains.

L'équipe du Dr Huissing a identifié ce qu'ils ont qualifié de « virgin  $\beta$  cells » en périphérie des îlots de rongeurs adultes. Ce sont des cellules immatures qui expriment de l'insuline sans jamais exprimer le neuropeptide urocortine 3 (UCN3) ou d'autres marqueurs des cellules  $\beta$  matures. En se basant sur les données de suivi de lignées (de l'anglais, lineage tracing), l'équipe du Dr Huissing a proposé que ces « Virgin  $\beta$  cells » étaient en réalité des cellules  $\alpha$  en transition pour devenir des cellules  $\beta$ . Ils ont rapporté les mêmes cellules dans les îlots provenant de donneurs humains démontrant ainsi la transdifférenciation chez l'humain (182). Cependant, il est important de noter que UCN3 est également perdu durant la dédifférenciation. Donc, l'identité de ces « virgin  $\beta$  cells » demeure incertaine (182). Est-ce que ce sont des cellules  $\alpha$  en transdifférenciation, ou plutôt des cellules  $\beta$  qui se dédifférencient? Davantage d'études sont nécessaires afin d'élucider l'identité des « virgin  $\beta$  cells ». La compréhension des mécanismes qui sous-tendent la transdifférenciation pourrait représenter un réel potentiel thérapeutique pour le traitement du DT2.



Reproduit avec la permission de Morgan et al. 2019

Figure 9 : Schématisation de stimuli induisant la transdifférenciation du soma en cellules  $\beta$ .

Certains stimuli ou manipulations géniques peuvent induire la conversion de cellules somatiques en cellules exprimant de l'insuline « cellules  $\beta$  ». Les cellules  $\beta$  peuvent être régénérées à partir des hépatocytes (flèche orange), des entérocytes (flèche verte), des cellules alpha (flèche jaune), des cellules canalaire (flèche bleue), des cellules acinar (flèche bleu ciel), ou par auto-réplication (flèche noire). Les flèches qui sont vers le bas indiquent une régulation à la baisse des gènes indiqués, alors qu'à l'inverse les flèches vers le haut indiquent une régulation à la hausse des gènes indiqués.



## Chapitre IV – Prolifération des cellules $\beta$

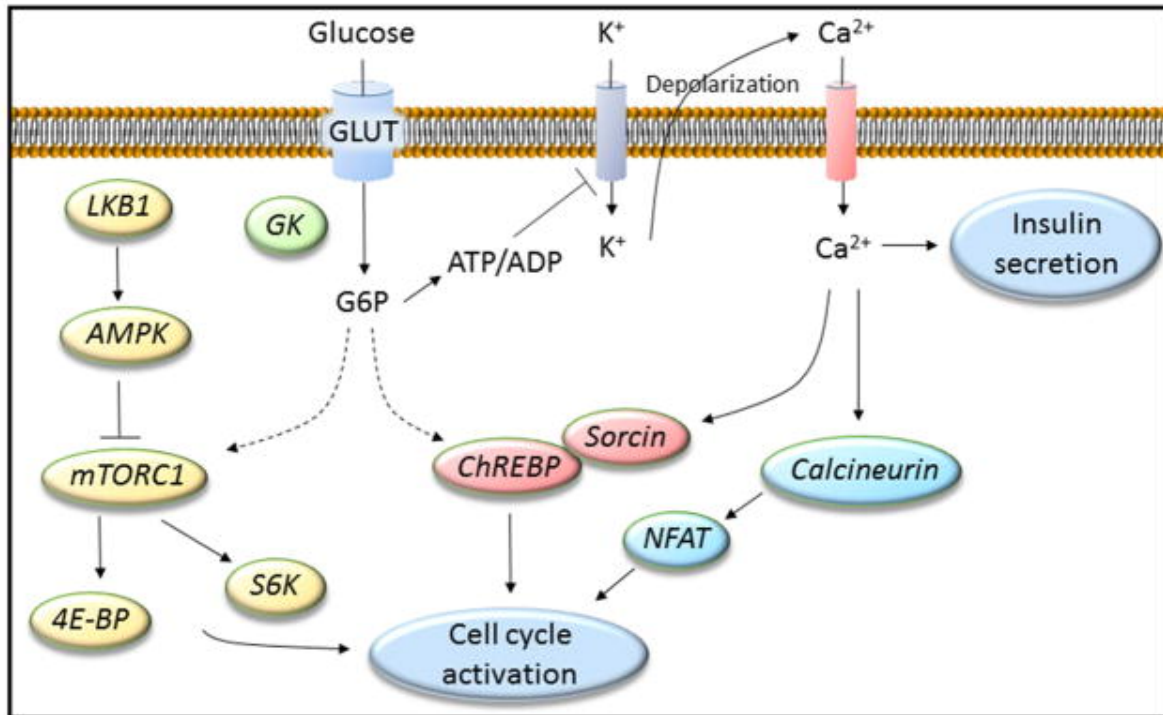
L'un des objectifs de la recherche sur le diabète vise à identifier de nouvelles approches thérapeutiques qui permettront de restaurer la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques. Physiologiquement, la masse de cellules  $\beta$  résulte principalement de la néogénèse et de la réplication des cellules  $\beta$  chez le nourrisson (183). Comme discuté au chapitre 1 (Figure 4), le taux de prolifération le plus élevé est atteint lors de la première année de vie, puis décroît avec le temps. Lorsque ce taux est à son apogée, il est seulement de 1 à 3 %, ce qui est relativement faible en comparaison au taux de 20 à 50 % retrouvé dans les cellules qui sont activement en prolifération telle que les cellules T, les cellules de la moelle osseuse, de la rate et du tube digestif (54). L'ensemble de ces informations suggèrent que les cellules  $\beta$  adultes sont particulièrement réfractaires à la prolifération dans des conditions physiologiques. Il est donc important de s'interroger sur la possibilité de stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  adultes.

À l'aide d'expériences réalisées chez les rongeurs, nous savons aujourd'hui que l'on peut stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  avec une exposition à un régime à forte teneur en gras (184) ou une infusion continue de glucose seul (185, 186) ou combiné aux acides gras (187). L'effet mitogène du glucose a été rapporté initialement par Swenne et coll. (188-190) qui ont montré qu'une exposition d'îlots isolés de rats fœtaux, néonataux ou adultes à une concentration stimulante de glucose augmente de 2,5 fois la prolifération des cellules  $\beta$ . Ils ont également observé que le taux de prolifération diminue avec l'âge. Chez le rongeur, les incrétines telles que le GLP-1 ou son analogue l'exendin-4 ainsi que de nombreux facteurs de croissance tels que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), l'insuline et son facteur de croissance l'IGF ainsi que les facteurs de croissance épidermiques (EGF), etc. ont été identifiés comme ayant un important effet mitogène sur la cellule  $\beta$  (191-193). Cependant, plusieurs de ces facteurs ne sont pas en mesure de stimuler la prolifération de cellules  $\beta$  des îlots provenant de donneurs humains ; ceci nous amène encore une fois à nous interroger sur la capacité proliférative des cellules  $\beta$  des donneurs adultes humains.

Hart et Powers (194) ont récemment publié une revue dans laquelle ils ont identifié les défis de travailler avec les îlots humains. En effet, contrairement aux études chez les rongeurs où

de nombreux facteurs sont contrôlés tels que la souche, l'âge, l'alimentation, l'environnement ainsi que les conditions d'isolements ; chez l'humain, il existe de nombreuses variables qu'il est difficile de contrôler. Par exemple, les différences génétiques et environnementales entre les donneurs d'îlots, la qualité des isolements ou la durée de l'hypoxie précédant l'isolement post mortem des îlots. S'ajoute à cela la perte de certaines caractéristiques physiologiques des îlots humains cultivés *ex vivo* et le prix qui limite l'accessibilité à ces îlots. Donc l'ensemble de ces facteurs et de nombreux autres contribuent à la difficulté d'étudier la réplication des cellules  $\beta$  dans les îlots humains.

C'est dans ce contexte qu'un effort collectif est réalisé afin d'identifier des facteurs mitogènes qui sont en mesure de stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  humaines. Comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette prolifération pourrait nous guider vers de potentielles cibles thérapeutiques. Dans ce chapitre, nous allons discuter de quelques facteurs identifiés à ce jour et de leurs mécanismes d'action.



Reproduit avec la permission de Moullé et al. 2017

Figure 10 : Le glucose stimule la prolifération en activant différentes voies dans la cellule  $\beta$ .

Le glucose entre dans la cellule  $\beta$  par le transporteur GLUT2. Il se fait phosphoryler par la glucokinase (GK) pour générer du glucose-6-phosphate (G6P). Le métabolisme du glucose augmente le ratio ATP/ADP ce qui provoque une dépolarisation membranaire et une sécrétion d'insuline. La glucokinase et la dépolarisation membranaire sont nécessaires à la prolifération induite par le glucose. Le métabolisme du glucose active la kinase mTOR et le facteur de transcription ChREBP qui stimulent la prolifération des cellules  $\beta$ .

## **IV.1 Le glucose**

### **IV.1.1 La glucokinase et le métabolisme du glucose**

Dans les cellules  $\beta$  de rongeur, le glucose est un important mitogène qui active la prolifération directement par son métabolisme et les voies de signalisation dérivée de ses métabolites ou indirectement par le biais des incrétines, de la voie de signalisation en aval de l'insuline et d'autres facteurs de croissance. Porat et coll. (195) ont montré que l'expansion de la masse des cellules  $\beta$  *in vivo*, est contrôlée par le métabolisme du glucose et nécessite l'activation de la glucokinase ainsi qu'une dépolarisation membranaire. Les souris invalidées pour la glucokinase  $GK^{-/-}$  ne prolifèrent pas en réponse à une hyperglycémie (195). Et inversement, les souris hypoglycémiques traitées avec des activateurs de la glucokinase affichent une augmentation de la prolifération (196). Le glucose active également la prolifération via ChREBP (de l'acronyme anglais, carbohydrate response element-binding protein) et mTOR (de l'anglais, mammalian target of rapamycin) (Figure 10).

### **IV.1.2 ChREBP**

ChREBP est un facteur de transcription exprimé dans de nombreux tissus impliqués dans la balance énergétique telle que la cellule  $\beta$ , le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cerveau et l'intestin (197). Le catabolisme du glucose promeut la translocation de ChREBP dans le noyau où il se lie à l'élément de réponse du type ChoRe de l'ADN et active les gènes cibles du glucose. ChREBP existe sous deux isoformes, l'isoforme  $\alpha$  induit par le métabolisme du glucose et l'isoforme  $\beta$  qui est constitutivement active (198). ChREBP est essentiel à la prolifération induite par le glucose. Une délétion de ChREBP empêche la stimulation de la prolifération en réponse au glucose chez les rongeurs (rats et souris). En revanche, la surexpression de l'isoforme  $\alpha$  stimule la prolifération en réponse au glucose (199).

### **IV.1.3 mTOR**

mTOR est une enzyme de la famille des sérines/thréonines kinases qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la croissance cellulaire. Son effet mitogène en réponse au glucose, aux acides aminés et à l'insuline a été rapporté à la fois dans des îlots de rongeurs et d'humains (200, 201). Les patients traités pour des insulinomes ou autres tumeurs neuroendocrines avec de la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, affichent une diminution de la prolifération des cellules  $\beta$ . Aussi, le traitement d'îlots humains *ex vivo* avec de la rapamycine inhibe complètement la prolifération des cellules  $\beta$  (202). Un modèle murin invalidé pour TSC2, un régulateur négatif de mTOR, se caractérise par une augmentation de la prolifération, de la masse ainsi que de la taille des cellules  $\beta$  (203).

## **IV.2 Les facteurs hormonaux et les incrétones**

### **IV.2.1 L'insuline et l'IGF**

L'insuline et le facteur de croissance de l'insuline (IGF) font partie des facteurs de croissance qui ont été rapportés comme étant importants à la réplication des cellules  $\beta$ . Des souris avec une délétion spécifique du récepteur à l'IGF dans les cellules  $\beta$  se caractérisent par une intolérance au glucose (204). Les souris avec une délétion spécifique du récepteur à l'insuline dans les cellules  $\beta$  ont une intolérance au glucose ainsi qu'une diminution de la taille des îlots et de la masse des cellules  $\beta$  associées au vieillissement (205). Lorsque l'insuline lie son récepteur, elle active par phosphorylation son substrat IRS2 (de l'anglais, insulin receptor substrate 2) qui active à son tour la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-AKT, qui joue un rôle majeur dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire (191). Alonso et coll. (206) ont montré que le glucose stimule la prolifération des cellules  $\beta$ , dans un modèle murin, indépendamment de l'insuline en activant directement la voie de signalisation en aval du récepteur à l'insuline. Le glucose est un important modulateur d'IRS2 et de la voie (PI3K)-AKT ainsi que de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), et de mTOR. De nombreuses études réalisées *in vitro* ont montré que dans un modèle murin, la délétion globale d'IRS1 induit une résistance périphérique à l'action de l'insuline et une augmentation de la masse des cellules  $\beta$ . Les souris ne deviennent cependant pas

diabétiques en raison de l'efficacité de leur sécrétion d'insuline (207, 208). En revanche, les souris avec une délétion d'IRS2 deviennent diabétiques en raison de leur incapacité à stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  et augmenter leur sécrétion d'insuline. Inversement, la surexpression d'IRS2 induit la prolifération des cellules  $\beta$  et prévient le diabète (209, 210). Ces résultats ont été reproduits dans un autre modèle murin (211). IRS2 semble donc jouer un rôle clé dans la compensation des cellules  $\beta$  en réponse à l'insulinorésistance.

#### **IV.2.2 Le GLP1**

Le GLP-1 est une incrétine produite par un mécanisme de clivage protéolytique différentiel du prépro-glucagon dans les cellules L de l'intestin. Le GLP-1 et son analogue exendine-4 ou liraglutide potentialisent la sécrétion d'insuline dans des îlots de rongeurs et humains (212). Ils semblent également stimuler la réplication des cellules  $\beta$  des îlots de rongeurs via l'activation du récepteur au GLP-1 (GLP-1R) (Figure 11) (213). Couplé aux protéines G, l'activation de ce récepteur induit une cascade de signalisation qui active de nombreuses voies, dont la voie Pi3K-AKT, la voie cAMP-PKA-CREB (de l'anglais, cyclic adenosine monophosphate - protein kinase A - cAMP response element binding protein) et la voie non canonique PKC $\zeta$  (de l'anglais, protein kinase C zeta)(214). Le GLP-1 régule également à la hausse les cyclines D1 et A2, activateurs du cycle cellulaire et dégrade l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 (215, 216). De plus, l'action mitogène du GLP-1 requiert la transactivation de récepteur des facteurs de croissance épidermiques par la BTC (217). Il a également été rapporté que l'exendine-4 stimule la prolifération chez le rongeur via l'activation de mTOR (218). Le GLP-1 et ses analogues ne semblent pas être en mesure de stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques de donneurs humains ; à l'exception d'une étude qui rapporté que l'exentide 4 augmente la prolifération des cellules  $\beta$  provenant de jeunes donneurs (environ 18 ans) (219). Davantage d'études sont nécessaires afin de déterminer si les analogues du GLP-1 sont plus efficaces chez les jeunes patients diabétiques.

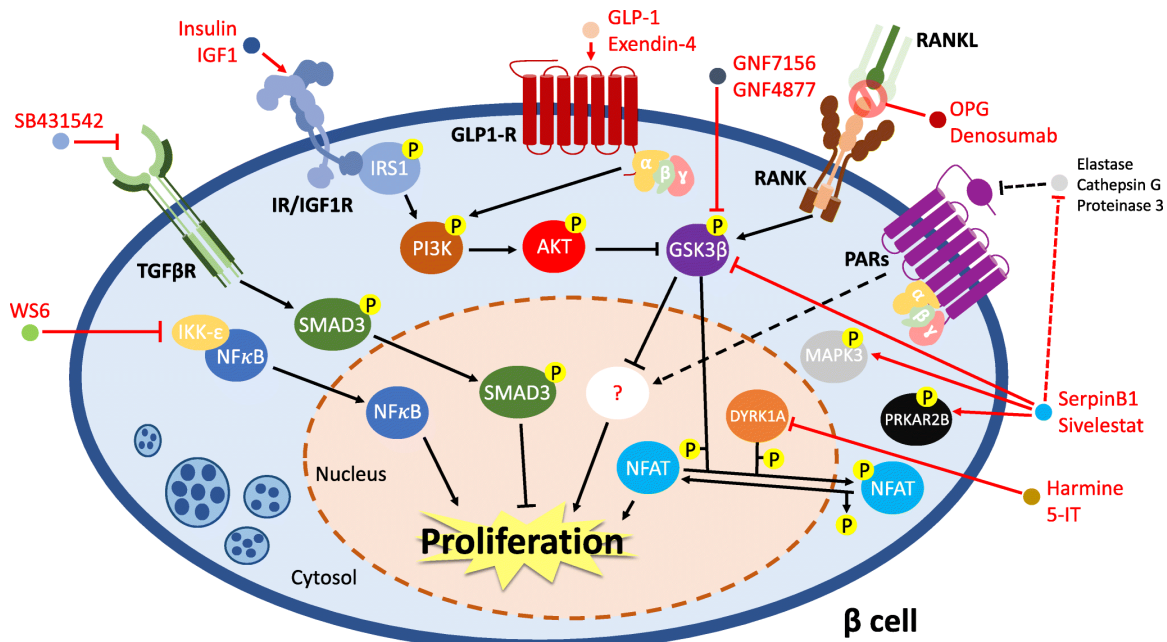
## **IV.3 Molécules stimulant la prolifération des cellules $\beta$ humaines**

### **IV.3.1 Le WS1**

Il est aujourd'hui bien accepté que les cellules  $\beta$  des îlots humains sont réfractaires à la prolifération. Cependant, en condition de stress métabolique nécessitant davantage d'insuline, ces cellules peuvent se diviser. Des analyses de criblage à haut débit ont permis d'identifier certaines molécules telles que WS1 et harmine. WS1 stimule la prolifération d'une lignée cellulaire de cellules  $\beta$  quiescentes de rats (R7T1). Son analogue le WS6 stimule la prolifération de cellules  $\beta$  (220) et  $\alpha$  humaines (221). Ces deux molécules induisent la prolifération en levant l'inhibition sur NF $\kappa$ -B et en activant le facteur de transcription E2F1, un important régulateur du cycle cellulaire et médiateur de la prolifération (220).

### **IV.3.2 Les inhibiteurs de la kinase DYRK1A**

L'harmine, un alcaloïde, est un autre exemple de molécules ayant un effet mitogène sur les cellules  $\beta$  d'îlots provenant de donneurs humains cultivés *ex vivo* ou transplantés dans un modèle murin (222). L'harmine inhibe la kinase DYRK1A (de l'anglais, dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A) qui elle-même régule la phosphorylation ainsi que l'activité du facteur de transcription NFAT (de l'anglais, nuclear factor of activated T cell). Lorsque DYRK1A est phosphorylée, elle phosphoryle NFAT, qui est maintenu dans le cytosol. En présence d'harmine, DYRK1A est inhibée. Ceci réduit la phosphorylation de NFAT, qui est alors transporté vers le noyau où il active la prolifération des cellules  $\beta$ . Le 5-iodotubercidin, un autre inhibiteur de DYRK1A, stimule également la prolifération des cellules  $\beta$  humaines (223, 224). Donc l'inhibition des kinases DYRK1A stimule la prolifération des cellules  $\beta$  humaines et pourrait être considérée comme une possible stratégie thérapeutique pour traiter le diabète.



Reproduit avec la permission de Basile et al. 2019

Figure 11 : Mécanismes stimulant la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques humaines.

Le facteur nucléaire kappa-B NF- $\kappa$ B est maintenu dans le cytosol sous sa forme inactive lorsqu'il est associé à la sous-unité epsilon de la kinase du facteur nucléaire kappa-B (IKK- $\epsilon$ ). WS6 inhibe IKK- $\epsilon$ , levant ainsi l'inhibition sur NF- $\kappa$ B qui transporté vers le noyau où il stimule la prolifération des cellules  $\beta$ . Le récepteur du facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF $\beta$ R) inhibe la prolifération des cellules  $\beta$  via l'activation de SMAD3. Le SB431542, un inhibiteur du TGF $\beta$ R, favorise la croissance cellulaire en empêchant l'activation du SMAD3. Les voies de signalisation du récepteur de l'incrétine GLP-1 (GLP-1R) stimulent la prolifération des cellules  $\beta$  via l'activation de la voie PI3K-AKT, entraînant l'inhibition de l'activité de la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). GSK3 $\beta$  peut également être directement inhibé par les molécules GNF7156 et GNF4877 ou indirectement par l'ostéoprogétérine (OPG) et le denosumab. L'OPG et le denosumab lient le récepteur activateur de NF- $\kappa$ B (RANK), empêchant ainsi la liaison de son ligand (RANKL) et donc l'activation de GSK3 $\beta$  et l'activation des voies apoptotiques extrinsèques. L'hépatokine SerpinB1 et le sivelestat, un inhibiteur des élastases, stimulent la prolifération cellulaire  $\beta$  en augmentant



*les niveaux de phosphorylation des MAPK3 (de l'anglais, mitogen-activated protein kinase 3), de la sous unité  $\beta$  des protéines kinases cAMP-dépendante de type II (PRKAR2B) et l'inhibition GSK3 $\beta$ . La kinase DYRK1A (de l'anglais, dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A) réprime la prolifération des cellules  $\beta$  en phosphorylant et en maintenant dans le cytosol le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT). L'inhibition de DYRK1A, en utilisant de petites molécules comme l'harmine ou la 5-iodotubercidine (5-IT), entraîne une diminution de l'état de phosphorylation de la NFAT, qui est transporté au noyau et active la prolifération des cellules  $\beta$ .*

### **IV.3.3 Les inhibiteurs du récepteur au TGF $\beta$**

Les inhibiteurs du récepteur au TGF $\beta$  (TGF $\beta$ R) ont également être rapporté comme étant d'importants facteurs mitogènes pour les cellules  $\beta$  humaines. L'inhibition du TGF $\beta$ R prévient la translocation des protéines SMAD au noyau où ils modulent l'expression de nombreux gènes responsables de la prolifération des cellules  $\beta$ . La combinaison de l'harmine à un inhibiteur du TGF $\beta$ R produit un effet synergique. En effet, l'activation des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines associées à l'inhibition des régulateurs du cycle cellulaire (225, 226) potentialise remarquablement la prolifération des cellules  $\beta$  humaines.

### **IV.3.4 L'hépatokine SerpineB1**

Le facteur circulant serpine B1 a été identifié dans le modèle murin de résistance à l'insuline LIRKO (de l'anglais, liver insulin receptor knockout) comme étant un important mitogène de la cellule  $\beta$  d'îlots de souris, de poisson-zèbre et d'humains (227, 228). Serpine B1 est une hépatokine synthétisée par le foie en réponse à la résistance à l'insuline dont les niveaux circulants sont altérés chez les patients diabétiques. La surexpression de serpine B1 chez le poisson-zèbre stimule la prolifération des cellules  $\beta$  alors que sa délétion dans un modèle murin prévient la compensation des cellules  $\beta$  dans un modèle de résistance à l'insuline induite par une diète obésogène (227). Elle appartient à la famille des inhibiteurs des protéases à sérine qui ciblent les élastases, les protéinases 3 et les cathepsines G. Elle active par phosphorylation de nombreuses voies de signalisation dont PARKAR2B (de l'anglais, protein kinase cAMP-dependent type II regulatory subunit  $\beta$ ), GSK3 et MAPK3. El ouaamari et coll. (227) ont également rapporté

d'autres inhibiteurs d'élastases, le sivelestat et le GW311616A qui stimulent la prolifération des cellules  $\beta$  d'îlots humains et de rongeurs. En conclusion, plusieurs molécules sont donc en mesure de stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  de donneurs humains adultes.

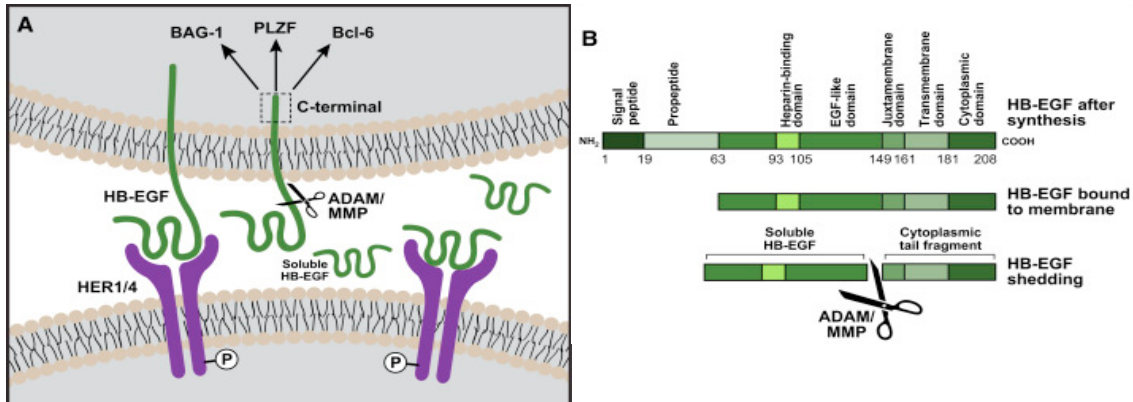
## IV.4 Les facteurs de croissance épidermiques (EGF)

### IV.4.1 Récepteurs à l'EGF et ses ligands

C'est en 1993 que la famille des facteurs de croissance épidermique (EGF) a attiré l'attention dans le domaine de la réplication des cellules  $\beta$ . lorsque la betacelluline (BTC) a été identifiée dans des lignées cellulaires d'insulinomes de souris (229). L'effet mitogène de la BTC a par la suite été démontré *in vitro* dans la lignée immortalisée sécrétrice d'insuline INS-1 (230) et *in vivo* dans des cellules  $\beta$  de rongeurs (231, 232). L'effet mitogène de la BTC est médié par l'activation du récepteur à l'EGF (EGFR) et la stimulation de l'expression d'IRS2 (233).

Le récepteur de l'EGF (de l'anglais, Epidermal Growth Factor) appartient à la famille des récepteurs Erb à activité tyrosine kinase. On en compte quatre membres : les HER1 ou ErbB1 aussi nommé EGFR ; les HER2/ErbB2, les HER3/ErbB3 et les HER4/ErbB4 (234). Ces récepteurs sont structurellement similaires. Ils se caractérisent par un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase avec de nombreux sites d'autophosphorylation. La liaison d'un ligand induit une homo ou hétérodimérisation entre ces récepteurs. Ceci entraîne l'activation de leur domaine tyrosine kinase qui active une cascade de signalisation en aval du récepteur, activant simultanément les voies des MAPK, les protéines kinases C, et les (PI3K)/AKT. Physiologiquement, l'activation de ces voies se traduit soit par la prolifération, la migration, l'adhésion ou la différenciation dépendamment du tissu et du récepteur activé. Aucun ligand n'a été identifié pour HER2 et HER3 est intrinsèquement inactif. Ces deux classes de récepteurs sont donc davantage reconnues pour leur dimérisation avec les récepteurs EGFR et HER4 (235). La famille des récepteurs ErbB comprend de nombreux ligands qui peuvent être regroupés en trois catégories. L'EGF, le TGF $\alpha$  (de l'anglais, transforming growth factor), et l'AR (amphireguline) qui lient spécifiquement l'EGFR. La BTC et l'HB-EGF (de l'anglais, Heparin-binding epidermal growth factor) qui lient l'EGFR et

ErbB4. Puis les NRG1-4 (neureguline) qui lient les récepteurs ErbB3 et ErbB4 (235). L'EGFR et ses ligands sont exprimés de façon variable dans l'ensemble du pancréas endocrine et exocrine (236).



Reproduit avec la permission de Dao et al. 2018

Figure 12 : Illustration du clivage de HB-EGF.

A-B : HB-EGF est initialement synthétisé sous forme d'un polypeptide transmembranaire, pro-HB-EGF, qui se lie à la membrane cytoplasmique. En réponse à un stimulus, les désintégrines, métalloprotéinases (ADAM) et métalloprotéinases matricielles (MMP) clivent pro-HB-EGF en HB-EGF soluble qui signale via ses récepteurs Her1/4 et la partie c-terminale qui est transportée dans le noyau et interagit directement avec certaines protéines.

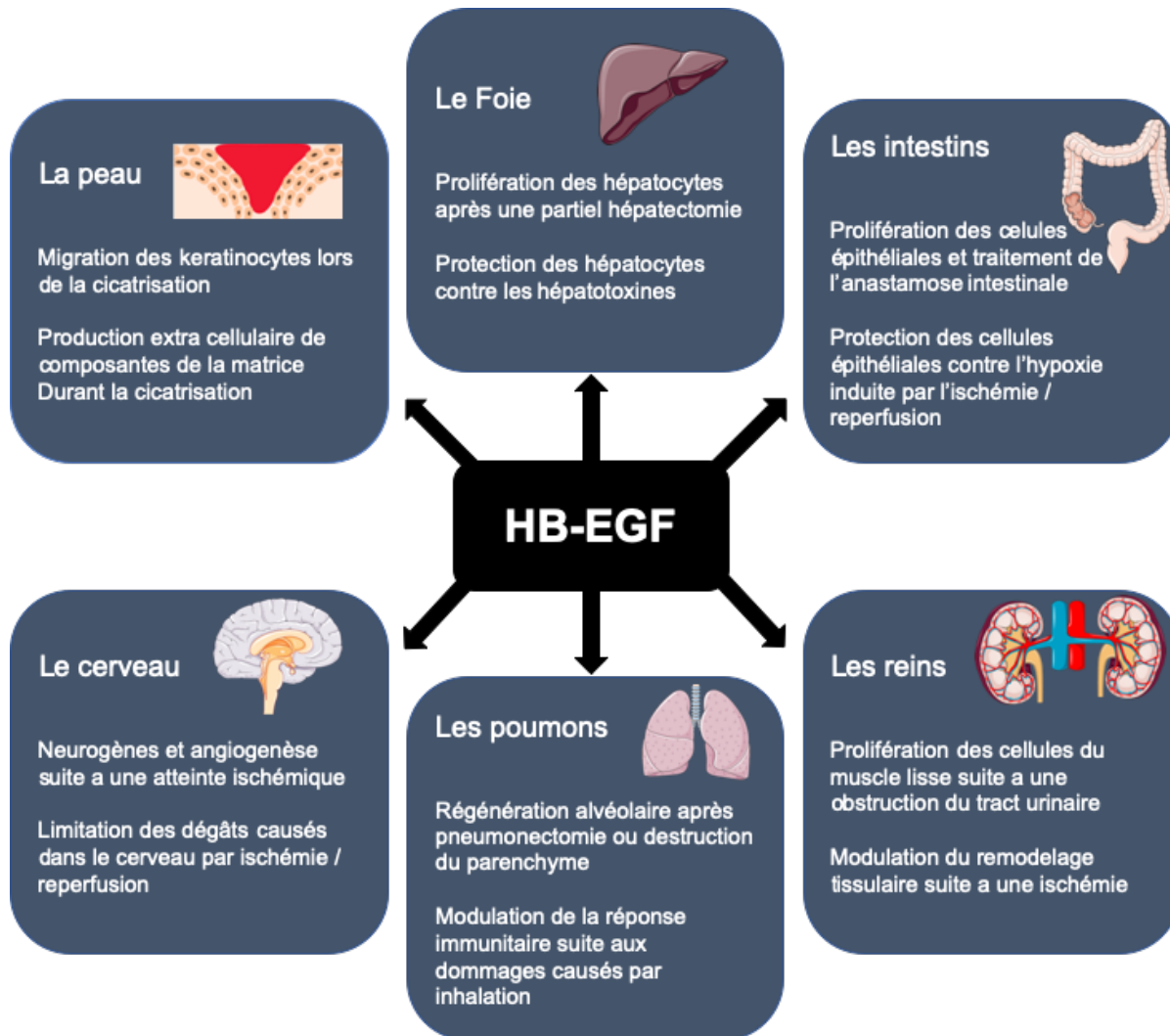
De nombreuses études ont démontré le rôle majeur de l'EGFR dans les mécanismes de compensation des cellules  $\beta$  en réponse à un stress physiologique ou pathologique. Par exemple, une délétion de ce récepteur, dans un modèle murin, induit une réduction de la prolifération des cellules  $\beta$  en raison d'une diminution de l'activation des voies de signalisation ERK et AKT (237-239). La surexpression d'un dominant négatif inactif de l'EGFR dans les cellules  $\beta$  de souris prévient l'expansion de leur masse en réponse à un régime obésogène et à la gestation (237). Plus récemment, l'EGFR et son ligand HB-EGF ont été identifiés comme étant responsables de la compensation des cellules  $\beta$  dans un modèle d'excès de nutriments généré dans le laboratoire du Dr Poitout (187). La compréhension des mécanismes régissant l'activation de la voie HB-EGF-EGFR

impliquée dans la compensation des cellules  $\beta$ , serait donc un atout majeur pour mieux comprendre la physiopathologie du DT2.

#### **IV.4.2 Structure et fonction du HB-EGF**

Le facteur de croissance épidermique liant l'héparine sulfate, également connu sous son acronyme anglophone (HB-EGF) est un polypeptide qui appartient à la grande famille de facteurs de croissance épidermiques (EGF). Cette famille se caractérise par 40 à 45 acides aminés avec un motif de plusieurs résidus cystéines ( $CX_7CX_{4-5}CX_{10-13}CX_8C$ ), qui permet la liaison à l'EGFR (240). Contrairement aux autres membres de cette famille, HB-EGF est caractérisé par un domaine héparine sulfate de 21 résidus, à l'extrémité N terminale, qui lui permet d'interagir avec le sulfate d'héparine présent à la surface des cellules (241). Le gène codant pour HB-EGF a été identifié sur le chromosome 5 chez l'humain, et le chromosome 18 chez la souris. Il se caractérise par 6 exons espacés de 5 introns et est synthétisé sous forme d'une protéine transmembranaire, pro-HB-EGF (242). Le pro-HB-EGF est clivé par une variété de protéases, dont les disintégrines, les métalloprotéines (ADAM) ainsi que les métalloprotéinases matricielles (MMP). Ceci génère du HB-EGF soluble et un fragment c-terminal cytoplasmique (Figure 12) (243, 244).

L'HB-EGF lie à la fois le récepteur à l'EGFR et Her4 et active respectivement la prolifération ou la migration. Bien qu'il ait été initialement identifié comme un important mitogène pour les cellules du muscle lisse, HB-EGF est largement exprimé dans l'ensemble de l'organisme et plus particulièrement au niveau des poumons, du cœur, du muscle squelettique et du cerveau (245). On lui reconnaît de nombreuses fonctions physiologiques telles que l'implantation des blastocytes, la cicatrisation, ou l'hyperplasie. Il est aussi un important agent mitogène dans de nombreuses cellules de l'organisme telles que les fibroblastes, les hépatocytes et les kératinocytes (246) (Figure 13). Il est également fortement exprimé dans de nombreux cancers tels que le cancer du pancréas, du sein, du colon, du cerveau, le glioblastome, les mélanomes ainsi les cancers gastriques et hépatiques (247, 248).



Adaptée avec la permission de Dao et al. 2018

Figure 13 : Schématisation de la fonction de HB-EGF dans différents organes.

HB-EGF semble jouer un rôle clé dans la régénération tissulaire suite à une lésion ou un dommage

### **IV.4.3 Rôle du HB-EGF dans la cellule $\beta$**

Dans les îlots de Langerhans, l'HB-EGF et la BTC sont les deux ligands de l'EGFR les plus exprimés. Le rôle de la BTC dans la cellule  $\beta$  a bien été identifié alors que celui du HB-EGF reste à déterminer. Dans un modèle murin, la surexpression d'HB-EGF sous le contrôle de Pdx1, dans les îlots de Langerhans, induit de la fibrose ainsi qu'une hyperplasie des cellules pancréatiques, et conduit à l'apparition d'un diabète chez plus de 10 % des souris(249). À l'inverse, la surexpression de la forme inactive d'HB-EGF induit un défaut de sécrétion d'insuline en raison de la diminution de l'expression du transporteur de glucose GLUT2 (250). Enfin, la surexpression d'HB-EGF dans les cellules ductales via injection d'un adénovirus induit la transdifférenciation de ces cellules en cellules  $\beta$  pancréatiques, la prolifération des cellules  $\beta$  existantes, et une expansion de la masse de ces cellules (251). Bien que les effets d'HB-EGF dans l'îlot soient variables, l'ensemble de ces travaux suggèrent que ce facteur de croissance régule différents mécanismes dans le pancréas et que son expression ainsi que son clivage doivent être régulés précisément afin de restreindre son action.

## IV.5 Les marqueurs de la prolifération cellulaire

Il existe principalement deux méthodes qui permettent d'étudier la prolifération des cellules  $\beta$ . La première consiste à utiliser des anticorps dirigés contre des antigènes du cycle cellulaire tels que Ki67, PCNA (de l'anglais, proliferating cell nuclear antigen) et phosphohistone H3. Identifié par Gerdes et al (252), le Ki67 est une protéine nucléaire qui est exprimée dans l'ensemble des cellules en prolifération et absente des cellules quiescentes. Son expression augmente graduellement tout au long des différentes phases du cycle cellulaire (G1-S-G2-M) (253). Elle débute à la phase G1, augmente à la phase S et atteint son maximum à la métaphase ou la phase M (254). Ensuite elle commence à diminuer lors de l'anaphase et la télophase. Le Ki67 n'est pas exprimé à la phase G0. Le PCNA est une autre protéine nucléaire identifiée dans les cellules en prolifération. Synthétisée principalement lors de la phase S du cycle cellulaire, elle joue un rôle clé dans la synthèse et la réplication de l'ADN (255, 256). Les histones sont des protéines qui jouent un rôle majeur lors de la division cellulaire. Les modifications post-translacionnelles des histones modulent l'accessibilité et la transcription de la chromatine des cellules eucaryotes. La phosphorylation de l'histone H3 est associée à l'ouverture de la chromatine lors de la transcription et la condensation de la chromatine lors de la division cellulaire (257, 258). La deuxième méthode utilisée pour mesurer la prolifération vise à utiliser des analogues marqués des nucléosides. Le 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) et 5-ethinyl-2'-deoxyuridine (EdU) sont les deux analogues de la thymidine les plus fréquemment utilisés. (259, 260). Ils s'insèrent dans l'ADN lors de la réplication cellulaire à la phase S. contrairement à la première méthode qui permet de détecter la synthèse d'une protéine donnée à un moment donné, cette deuxième méthode mesure la prolifération cumulative. C'est-à-dire l'ensemble des nucléosides insérés à chaque division cellulaire.

## Chapitre V – Mise en contexte de la thèse

Le DT2 est une maladie pandémique qui affecte plus de 370M de personnes dans le monde. Il apparaît lorsque la cellule  $\beta$  pancréatique devient incapable d'augmenter sa sécrétion d'insuline pour répondre à la demande accrue, due principalement à une résistance périphérique à l'action de l'insuline, notamment chez les individus obèses. Cette insuffisance sécrétoire est précédée d'une phase de compensation qui implique deux mécanismes: une sécrétion d'insuline accrue et une hyperplasie cellulaire. L'expansion de la masse des cellules  $\beta$  du pancréas a déjà été mise en évidence chez les individus obèses ainsi que chez les rongeurs et serait associée principalement à une prolifération de ces cellules (261, 262). Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la prolifération accrue en réponse à la résistance à l'insuline sont mal connus.

Le laboratoire du Dr Poitout a mis au point un modèle de perfusion prolongée (72h) de glucose et d'acides gras dans lequel des rats de 6 mois étaient comparés à des rats de 2 mois (187). Ce modèle a permis de démontrer qu'à des niveaux semblables d'hyperglycémie, d'hyperinsulinémie et d'hyperlipidémie, les rats de 6 mois développaient une résistance à l'insuline ainsi qu'une prolifération des cellules  $\beta$  qui n'étaient pas observées chez les rats de 2 mois. Ce modèle offre donc une opportunité unique d'identifier les mécanismes moléculaires de la prolifération des cellules  $\beta$  induite par l'excès de nutriments. Une étude transcriptomique réalisée dans les îlots de rats de 6 mois après perfusion a conduit à l'hypothèse selon laquelle le facteur de croissance «heparin-binding EGF-like growth factor» (HB-EGF) agit de manière autocrine ou paracrine pour stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse aux nutriments via le récepteur à l'EGF (EGFR) et la voie de la kinase mTOR.

L'activation de l'EGFR est nécessaire à la compensation des cellules  $\beta$  dans des conditions physiologiques ou pathologiques de diminution de la sensibilité à l'insuline. De nombreuses études ont montré l'implication de ce récepteur dans des modèles de résistance à l'insuline induite par une diète obésogène (237), par la gestation (237), ou une pancréatectomie partielle (263). Cependant, dans ces contextes, aucun ligand n'a été identifié comme étant responsable de l'activation de ce récepteur.



L'objectif de cette thèse est donc d'examiner la voie de signalisation HB-EGF-EGFR et son mécanisme d'activation dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Plus précisément, les objectifs spécifiques étaient de :

- 1- Évaluer l'effet mitogène du HB-EGF dans les cellules  $\beta$  pancréatiques de rats et humaines.
- 2- Déterminer si le glucose requiert l'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR pour stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques.
- 3- Identifier le mécanisme par lequel le glucose active la voie HB-EGF-EGFR dans les cellules  $\beta$  pancréatiques.
- 4- Déterminer la meilleure méthode d'étude de la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques humaines.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont mené à la rédaction de deux articles scientifiques comme premier auteur :

1. Maachi H, Fergusson G, Ethier E, Brill GN, Katz LS, Honig LB, Metukuri MR, Scott DK, Ghislain J, Poitout V. HB-EGF Signaling is Required for Glucose-Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation in Rats. *Diabetes*. 2020 Mar;69(3):369-380
2. Maachi H\*, Ghislain J\*, Tremblay C, Poitout V. Pronounced proliferation of non- $\beta$  cells in response to  $\beta$ -cell mitogens in human islets ex vivo. Sera soumis pour publication automne 2020.

# RÉSULTATS

# Article 1 – La prolifération des cellules $\beta$ pancréatiques de rats en réponse au glucose requiert l'activation de la voie HB-EGF-EGFR

## Mise en contexte

Le facteur de croissance HB-EGF a été initialement identifié dans le laboratoire du Dr Poitout dans un modèle de résistance à l'insuline induite par une perfusion prolongée (72h) de glucose et d'acides gras (187). Dans cette étude il avait été démontré en comparant des rats de 6 mois à des rats de 2 mois, qu'à des niveaux semblables d'hyperglycémie, d'hyperinsulinémie et d'hyperlipidémie, les rats de 6 mois développaient une résistance à l'insuline ainsi qu'une prolifération des cellules  $\beta$  qui n'étaient pas observées chez les rats de 2 mois. Une étude transcriptomique réalisée dans les îlots de rats de 6 mois après infusion a conduit à l'hypothèse selon laquelle le facteur de croissance HB-EGF agit de manière autocrine ou paracrine pour stimuler la prolifération des cellules  $\beta$ . L'inhibition du récepteur à l'EGF ainsi que de mTOR dans ce modèle bloquait la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse à la résistance à l'insuline.

Afin de mieux caractériser le mécanisme de compensation des cellules  $\beta$ , l'objectif de cette étude consistait à examiner la voie de signalisation HB-EGF-EGFR et son mécanisme d'activation dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Dans un premier temps nous avons voulu confirmer que l'HB-EGF exogène est capable de stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  de rongeur et humaines. Nous avons examiné le mécanisme d'activation de la voie HB-EGF-EGFR et notre hypothèse est que le glucose stimule la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques via son activation. À cet effet, nous avons traité des îlots de rats *ex vivo* avec du glucose seul ou combiné aux inhibiteurs pharmacologiques du ligand HB-EGF ou du récepteur EGFR. Nous avons également utilisé une approche moléculaire par infection des îlots avec un shRNA qui éteint spécifiquement l'expression de HB-EGF, puis nous avons transplanté ces îlots sous la capsule rénale de nouveaux rats que nous avons perfusé (72h) avec du glucose. Nous avons ensuite mesuré l'expression de HB-EGF en réponse au glucose puis évalué l'implication du facteur de transcription ChREBP. Lorsque HB-EGF est synthétisé, il est exprimé sous forme d'une protéine transmembranaire qui reste attachée à la membrane cellulaire jusqu'à ce qu'elle soit clivée par des métalloprotéinases.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le glucose active une protéine de la famille des protéines Src tyrosine kinase qui active à son tour les métalloprotéinases. Lorsque les métalloprotéinases sont activées, elles clivent HB-EGF qui signale via son récepteur et mTOR stimulant ainsi la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques.

## **HB-EGF Signaling is Required for Glucose-Induced Pancreatic $\beta$ -Cell Proliferation in Rats**

Hasna Maachi<sup>1, 2</sup>, Grace Fergusson<sup>1</sup>, Melanie Ethier<sup>1</sup>, Gabriel N. Brill<sup>3</sup>, Liora S. Katz<sup>3</sup>, Lee B. Honig<sup>3, 5</sup>, Mallikarjuna R. Metukuri<sup>6</sup>, Donald K. Scott<sup>3</sup>, Julien Ghislain<sup>1</sup>, Vincent Poitout<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup> Montreal Diabetes Research Center, Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Physiology, University of Montreal, QC, Canada

<sup>3</sup> Diabetes, Obesity, and Metabolism Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

<sup>4</sup> Department of Medicine, University of Montreal, QC, Canada

<sup>5</sup> Current address R&Q Solutions, Cincinnati, OH, USA

<sup>6</sup> Current address, Syneos Health, Morrisville, NC, USA

Running title: Glucose-HB-EGF axis promotes  $\beta$ -cell proliferation

Corresponding author:

Vincent Poitout, DVM, PhD

CRCHUM, 900 rue St Denis

Montréal, QC, H2X 0A9 - CANADA

Tel: (514) 890-8044

Email: [vincent.poitout@umontreal.ca](mailto:vincent.poitout@umontreal.ca)

Word count: Abstract, 200; Main text, 3999

8 figures and 5 supplemental figures and tables

## **ABBREVIATIONS**

|        |  |
|--------|--|
| 3C     | Chromosome conformation capture                            |
| BTC    | betacellulin   |
| ChIP   | Chromatin immunoprecipitation                              |
| ChREBP | Carbohydrate response element binding protein              |
| EGF    | Epidermal growth factor                                    |
| EGFR   | Epidermal growth factor receptor                           |
| FACS   | Fluorescent activated cell sorting                         |
| GIR    | Glucose infusion rate                                      |
| HB-EGF | Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor |
| mTORC1 | Mammalian target of rapamycin complex 1                    |
| TSS    | Transcriptional start site                                 |

## ABSTRACT

The molecular mechanisms of  $\beta$ -cell compensation to metabolic stress are poorly understood. We previously observed that nutrient-induced  $\beta$ -cell proliferation in rats is dependent on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signaling. The aim of this study was to determine the role of the EGFR ligand Heparin-Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) in the  $\beta$ -cell proliferative response to glucose, a  $\beta$ -cell mitogen and key regulator of  $\beta$ -cell mass in response to increased insulin demand. We show that exposure of isolated rat and human islets to HB-EGF stimulates  $\beta$ -cell proliferation. In rat islets, inhibition of EGFR or HB-EGF blocks the proliferative response not only to HB-EGF but also to glucose. Furthermore, knockdown of HB-EGF in rat islets blocks  $\beta$ -cell proliferation in response to glucose *ex vivo* and *in vivo* in transplanted glucose-infused rats. Mechanistically, we demonstrate that HB-EGF mRNA levels are increased in  $\beta$  cells in response to glucose in a Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP)-dependent manner. In addition, chromatin-immunoprecipitation studies identified ChREBP binding sites in proximity to the HB-EGF gene. Finally, inhibition of Sr family kinases, known to be involved in HB-EGF processing, abrogated glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation. Our findings identify a novel glucose/HB-EGF/EGFR axis implicated in  $\beta$ -cell compensation to increased metabolic demand.

## INTRODUCTION

In obesity, the maintenance of glucose homeostasis is dependent on the capacity of the pancreatic  $\beta$  cell to meet the increased insulin requirements that arise due to insulin resistance. Failure of this mechanism leads to type 2 diabetes (1). Hence, understanding how the  $\beta$  cell compensates for insulin resistance is a critical prerequisite to defining the pathogenesis of type 2 diabetes.

$\beta$ -cell compensation involves both an increase in the capacity to secrete insulin and an increase in mass. In adult rodents,  $\beta$ -cell expansion arises primarily from replication of existing  $\beta$  cells (2; 3). Over the last decade, modelling metabolic stress in rodents has led to the identification of an array of factors including insulin receptors (4), neurotransmitters (5), epidermal growth factor receptors (EGFR) (6), serpinB1 (7) and nutrients (8) that control  $\beta$ -cell proliferation. Prominent among these factors, glucose controls  $\beta$ -cell replication in rodent (9-12) and human (13) islets. Glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation requires glucokinase, ATP-sensitive potassium channel closure and membrane depolarisation (10; 11). While several studies implicated insulin receptor signaling in glucose-induced  $\beta$ -cell replication (14; 15) this observation has been challenged by evidence supporting a role for Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2), Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (16) and the Carbohydrate-Responsive Element Binding Protein (ChREBP) (17; 18). ChREBP is a glucose sensing transcription factor that binds DNA with its partner, Mlx, at carbohydrate response elements to stimulate glucose-responsive genes (19). Thus, the precise mechanisms underlying glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation remains debated.

We established an *in vivo* model of nutrient excess in rats, in which a 72-h co-infusion of glucose and a lipid emulsion triggers a marked increase in  $\beta$ -cell proliferation and mass (20). Subsequent studies identified a signaling cascade involving the EGFR-mTOR-FoxM1 that underlies the  $\beta$ -cell response to nutrient infusion (21). In support of these findings, EGFR loss-of-function prevents compensatory  $\beta$ -cell mass expansion in adult rodents under conditions of physiological (pregnancy) and pathophysiological (high-fat feeding) insulin resistance (6) as well as following partial pancreatectomy (22). However, the identity of the EGFR ligand mediating this effect remains unknown. In previous studies we discovered that expression of the Heparin-Binding



Epidermal Growth Factor (EGF)-like Growth Factor (HB-EGF) is up-regulated in islets from nutrient-infused rats, and that exogenous HB-EGF stimulates replication of MIN6 cells and primary rat  $\beta$  cells (21). HB-EGF is synthesized as a membrane-anchored precursor that is processed by the action of disintegrins and metalloproteinases (ADAM) to release the soluble active form (23). HB-EGF induces phosphorylation of EGFR and subsequent activation of a downstream signaling cascade including MAPK and PI3K/AKT.

The aim of this study was 1) to determine the role of HB-EGF in the  $\beta$ -cell proliferative response to glucose in rat islets *ex vivo* and *in vivo* and 2) to investigate the mechanisms linking glucose to an HB-EGF/EGFR signaling pathway promoting  $\beta$ -cell proliferation.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **Reagents and solutions**

RPMI-1640 and qualified FBS were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Recombinant HB-EGF and betacellulin (BTC) were from R&D Systems (Minneapolis, MN). The HB-EGF inhibitor, CRM197, and the Src family kinase inhibitor, PP1, were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 and the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibitor rapamycin were from LC Laboratories (Woburn, MA). Adenoviruses expressing shRNAs against HB-EGF (Adv-shHBEGF) and control scrambled shRNA (Adv-shCTL) were from Vector Biolabs (Malvern, PA). SmartPool small interfering RNA (siRNA) duplexes against rat ChREBP and control siRNA were obtained from Dharmacon (Lafayette, CO). Primary antibodies and dilutions are listed in Supplemental Table S1.

### **Rat islet isolation and adenoviral infection**

All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the CRCHUM. Islets were isolated from 2-month-old male Wistar or Lewis rats (Charles River, Saint-Constant, QC, Canada) by collagenase digestion and dextran density gradient centrifugation as described (24). For adenoviral infections, isolated islets were partially dissociated and then infected with 100 plaque-forming units of adenoviruses/cell overnight as described (25), after which the medium was replaced with complete medium and cultured for an additional 24 h prior to stimulation *ex vivo* or transplantation. To ensure that the HB-EGF knockdown was sustained for a period compatible with our *ex vivo* and *in vivo* experiments, we measured HB-EGF expression 5 days after infection. In Adv-shHBEGF-infected islets exposed to 16.7 mM glucose, HB-EGF mRNA was reduced by 32±8% ( $p<0.05$ ;  $n=5$ ) vs. Adv-shCTL-infected islets.

### **Human islets**

Islets from non-diabetic human donors were provided by the Alberta Diabetes Institute Islet Core and the Integrated Islet Distribution Program. The use of human islets was approved by the Institutional Ethics Committee of the CRCHUM (protocol no. ND-05-035).

### **Islet proliferation ex vivo**

Rat islets were cultured in RPMI-1640 with 10% (vol./vol.) qualified FBS (complete medium) for 72 h in the presence of glucose, 100 ng/ml HB-EGF or 50 ng/ml BTC as indicated in the Figure legends. EdU (10  $\mu$ M) was added as indicated. The media were changed every 24 h. At the end of treatment, islets were embedded in optimal cutting temperature compound, frozen, sectioned at 8  $\mu$ m and mounted on Superfrost Plus slides (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada). Sections were immunostained for insulin (Ins) or Nkx6.1 to mark  $\beta$  cells, and for the proliferative markers Ki67, phospho histone H3 (pH3) or EdU (Click-iT™ EdU Imaging Kit, Life Technologies Inc.). Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Images were acquired with a fluorescence microscope (Zeiss, Thornwood, NY). Proliferation was calculated as the percentage of double-positive Ki67+ (or pH3 + or EdU+) and Ins+ (or Nkx6.1+) cells over the total Ins+ (or Nkx6.1+) population. At least 1,500  $\beta$  cells from 7-17 individual islets were manually counted per condition.

Human islets were hand-picked, washed with PBS and dispersed in accutase (Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) for 10 min at 37°C. At the end of the digestion, cells were washed, resuspended and plated in 96-well plates (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) treated with Poly-D-Lysine Hydrobromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After 24 h, dispersed human islets were cultured in RPMI-1640 with 1% (vol./vol.) human albumin serum (Celprogen, Torrance, Ca) for 72 h in the presence of glucose and 100 ng/ml HB-EGF as indicated in the Figure legends. The medium was changed every 24 h. At the end of treatment, cells were fixed and immunostained for insulin (Ins) and EdU. Images were acquired with an Operetta high-content imaging system (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) at 20x magnification. Approximately 1,500 cells were manually counted per condition.

### **Static incubations**

Triplicate batches of ten islets each were sequentially incubated twice with KRB solution containing 0.1% (wt/vol.) BSA and 2.8 mM glucose for 20 min at 37 °C, then incubated for 1 h with 2.8 or 16.7 mM glucose. Intracellular insulin content was measured following acid–alcohol

extraction. Insulin was measured by radioimmunoassay using a rat insulin RIA kit (Millipore, Billerica, MA).

### **Islet transplantation and glucose infusions in rats**

*Male Lewis rats weighing 250–350 g (~2-month-old) (Charles River) underwent catheterization of the jugular vein for infusion and the carotid artery for sampling as described (26). For islet transplantation, 500 islets isolated from 2-month-old male Lewis rats were infected with Adv-shHBEGF or Adv-shCTL, as described above, and injected via a cannula under the left kidney capsule during the catheterization surgery. Animals were allowed to recover for 72 h followed by intravenous infusions of either saline (Sal) (0.9% wt/vol. NaCl; Baxter, Mississauga, ON, Canada) or 70% (wt/vol.) glucose (Glu) (McKesson, Montreal, QC, Canada) for an additional 72 h. The glucose infusion rate (GIR) was adjusted to maintain plasma glucose at 13.9–19.4 mmol/l throughout the 72-h infusion.*

### **Immunostaining of tissue sections**

Transplanted kidneys and pancreata were fixed for 4 h in 4% paraformaldehyde and cryoprotected overnight in 30% sucrose. Tissues were then embedded in OCT, frozen, sectioned at 8  $\mu\text{m}$  and mounted on Superfrost Plus slides (Life Technologies Inc.). Antigen retrieval was performed using sodium citrate buffer and  $\beta$ -cell proliferation was assessed as described above.

### **Flow cytometry of $\beta$ cells**

Islets were isolated from male RIP7-RLuc-YFP transgenic rats (27), washed in PBS and dispersed in accutase for 10 min at 37°C. At the end of the digestion, cells were washed, resuspended in PBS, and passed through a 40- $\mu\text{m}$  filter prior to sorting. Flow cytometric sorting of YFP-positive and -negative cells was carried out using a FACSAria II flow cytometer with FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA). YFP-expressing cells were detected using the 488-nm laser and 530/30-nm BP filter.

### **Quantitative RT-PCR**

Total RNA was extracted from 150-200 whole islets or 100,000 sorted islet cells using the RNeasy micro kit (Qiagen, Valencia, CA). RNA was quantified by spectrophotometry using a NanoDrop

2000 (Life Technologies Inc.) and 1 µg of RNA was reverse transcribed. Real-time PCR was performed by using QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen). Results were normalized to cyclophilin A RNA levels.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and chromatin confirmation capture (3C)**

INS1 832/13 cell culture, siRNA treatment and RNA isolation and RT-PCR were performed as described (17). The pool of siRNA duplexes directed against ChREBP was previously shown to significantly decrease ChREBP mRNA (65%) and protein (70%) levels (17). ChIP was performed as previously described (18). Briefly, INS-1 cells were cultured for 16 h in 2 mM glucose followed by 6 h at 2 or 20 mM glucose. An anti-ChREBP or normal rabbit IgG were used for immunoprecipitation and a genomic region 30 kb downstream from the transcription start site of the HB-EGF gene known to bind ChREBP (28) was amplified by RT-PCR. 3C was performed essentially as described in (29). INS-1 cells were treated as for ChIP. The sequences of primers used for RT-PCR, ChIP and 3C are shown in Supplemental Table S2.

### **Immunoblotting and ELISA**

For immunoblotting, proteins were extracted from rat islets and subjected to 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with primary antibodies against phospho-EGFR, phospho-S6 ribosomal protein and  $\alpha$ -tubulin in 5% (wt/vol) milk. Signals were revealed using horseradish peroxidase–conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (Bio-Rad, Richmond, CA) in 5% (wt/vol) milk and visualized using Western Lighting Plus-ECL (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA). Band intensity was quantified using ImageJ software (NIH).

HB-EGF was measured by ELISA (MyBiosource, San Diego, CA) in protein extracts from 200-300 rat islets treated with glucose for 1 h.

### **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.

### **Data and Resource Availability**

All data generated or analyzed during this study are included in the published article (and its online supplementary files). No applicable resources were generated or analyzed during the current study.

## RESULTS

### HB-EGF induces $\beta$ -cell proliferation via EGFR-mTOR signaling

We previously showed that HB-EGF stimulates  $\beta$ -cell proliferation in dispersed rat islets (21). To confirm and extend these findings, we assessed the  $\beta$ -cell proliferative response to HB-EGF in intact rat islets after a 72-h exposure using either Ki67 or EdU-labeling to mark proliferating cells and insulin or Nkx6.1 to mark  $\beta$  cells (Fig. 1). In the presence of 2.8 mM glucose, 100 ng/ml HB-EGF or 50 ng/ml BTC increased the percentage of Ki67-positive  $\beta$  cells to levels comparable to those detected in response to 16.7 mM glucose (Fig. 1A-D). Similar results were obtained when using EdU as a proliferative marker (Fig. 1E&F). Exposing islets to the EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 (300 nM) or the mTORC1 inhibitor rapamycin (10 nM) abrogated HB-EGF induced  $\beta$ -cell proliferation (Fig. 1G&H). In isolated dispersed human islets, exposure to HB-EGF for 72 h also induced  $\beta$  cell proliferation (Fig. 2).

We then asked whether HB-EGF affects insulin secretion in rat islets. Isolated islets were either exposed to HB-EGF simultaneously with glucose during a 1-h static incubation to measure insulin secretion, or during the 24-h period preceding the static incubation. Neither acute nor prolonged exposure to HB-EGF significantly affected insulin secretion or insulin content (Supplemental Fig. S1). These results indicate that exogenous HB-EGF promotes rat  $\beta$ -cell proliferation via EGFR and mTOR without significantly affecting insulin secretion.

### Glucose-induced $\beta$ -cell proliferation in isolated rat islets requires HB-EGF/EGFR signaling

Given that glucose is a known  $\beta$ -cell mitogen (9-12), we next examined the contribution of HB-EGF/EGFR signaling to glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation. Treatment of rat islets for 72 h with 16.7 mM glucose led to an approximately 3-fold increase in Ki67 staining compared to 2.8 mM glucose (Fig. 3A&B). Addition of AG1478 completely prevented the glucose-induced increase in  $\beta$ -cell proliferation (Fig. 3A&B). Likewise, the HB-EGF inhibitor CRM197 (10  $\mu$ g/ml) blocked the stimulatory effect of glucose on  $\beta$ -cell proliferation (Fig. 3C&D). Similar findings were obtained by labelling rat islets with Nkx6.1 and the M-phase marker pH3 after exposure to HB-EGF, 16.7 mM glucose, or 16.7 mM glucose + CRM197 (Fig. 3E&F). To further substantiate the implication of HB-EGF in glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation, we infected isolated rat islets with Adv-shHBEGF or

Adv-shCTL (Fig. 3G&H). Following a 72-h exposure to 16.7 mM glucose, Adv-shHBEGF-infected islets did not display any increase in  $\beta$ -cell proliferation (Fig. 3G&H). Collectively, these results demonstrate that HB-EGF/EGFR signaling is required for glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation in isolated rat islets.

### **Glucose-induced $\beta$ -cell proliferation in transplanted rat islets requires HB-EGF**

To test whether islet-derived HB-EGF is necessary for glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation *in vivo*, islets infected with either Adv-shHBEGF or Adv-shCTL were transplanted under the kidney capsule of Lewis rats. The rats were then infused with Sal or Glu for 72 h (Fig. 4A). Average blood glucose levels and glucose infusion rates were not different between both groups (Supplemental Fig. S2). As expected, the glucose infusion increased the percentage of Ki67-positive  $\beta$  cells in the endogenous pancreas to the same extent in Adv-shCTL and Adv-shHBEGF transplant recipients (Fig. 4B&C). Adv-shCTL-infected islet grafts also showed increased  $\beta$ -cell proliferation in response to glucose infusion (Fig. 4D&E). In contrast, Adv-shHBEGF-infected islets were unresponsive to glucose (Fig. 4D&E). These data demonstrate that, as observed in isolated islets (Fig. 3), HB-EGF/EGFR signaling is required for glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation *in vivo*.

### **HB-EGF gene expression is up-regulated in $\beta$ cells in response to glucose**

As we previously showed that infusion of glucose and lipids in rats increases HB-EGF mRNA levels in islets (21), we asked whether glucose alone was sufficient to stimulate HB-EGF expression in isolated islets. Indeed, isolated rat islets exposed to 16.7 mM glucose for 24 h displayed a 1.5-fold increase of HB-EGF mRNA compared to 2.8 mM glucose (Fig. 5A). To determine whether the increase in islet HB-EGF gene expression was primarily in  $\beta$  cells, we used a transgenic rat expressing yellow fluorescent protein (YFP) under the control of the Ins2 promoter (RIP7-RLuc-YFP) (27) to enrich for  $\beta$  cells by flow cytometry after glucose treatment. Glucose augmented HB-EGF mRNA levels in the YFP-positive ( $\beta$ -cell enriched; Fig. 5B) cells, but not the YFP-negative (Fig. 5C) fraction, suggesting that glucose stimulates HB-EGF gene expression in rat  $\beta$  cells.



### **Glucose stimulates HB-EGF gene expression via ChREBP**

ChREBP is a key mediator of glucose-induced transcriptional changes (28). Therefore, we asked whether HB-EGF is a direct target of ChREBP. Consistent with the results shown in Fig. 5, glucose increased HB-EGF expression in untransfected INS-1 cells and in cells transfected with a control siRNA (Fig. 6A). In contrast, siRNA-mediated knockdown of ChREBP abolished the glucose response (Fig. 6A). ChREBP ChIP-seq and DNase-seq analyses of INS-1 cells exposed to glucose identified putative enhancer elements containing canonical ChREBP binding sites located approximately 30 kb downstream of the HB-EGF transcriptional start site (28). ChIP analysis for one of these elements showed that a 6-h exposure to 20 mM glucose significantly increased ChREBP binding, whereas binding to a control region was unchanged (Fig. 6B). Furthermore, 3C analysis revealed increased interactions between these enhancers and the HB-EGF promoter in the presence of 20 mM glucose (Fig. 6C). These results show that glucose-induced HB-EGF gene expression is mediated by direct binding of ChREBP to enhancers located 3' to the HB-EGF gene.

### **Glucose-induced $\beta$ -cell proliferation is dependent on Src upstream of EGFR activation, but glucose-induced mTOR activation does not require HB-EGF**

Processing of proHB-EGF by ADAM proteins releases the active form that binds and activates EGFR (23). Previous studies in mesangial cells suggest that glucose-induced proteolytic processing of HB-EGF requires Src activation (30). Therefore, we investigated the role of Src family kinases in glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation. Addition of the Src inhibitor PP1 abrogated the  $\beta$ -cell proliferative response to 16.7 mM glucose but not to HB-EGF (Fig. 7A&B), consistent with the possibility that glucose promotes proHB-EGF cleavage via Src followed by HB-EGF activation of EGFR. To assess glucose-stimulated HB-EGF shedding, we attempted to measure HB-EGF levels in islet conditioned media following a 1-h exposure to 16.7 mM glucose. Unfortunately, HB-EGF levels in the samples were below the detection limit of the assay. However, we observed a trend towards an increase in total HB-EGF levels in islet extracts (Supplemental Fig. S3) which, although not statistically significant, is consistent with the glucose-induced HB-EGF expression shown in Fig. 5A & 6A.

Glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation is dependent on mTOR activation (16). As the mitogenic effect of HB-EGF was also dependent on mTOR in rat islets (Fig. 1G&H), we asked whether mTOR activation by glucose is dependent on HB-EGF. Exposing islets for 24 and 48 h to 16.7 mM glucose led to a significant increase in phosphorylation of the mTOR substrate S6 ribosomal protein (S6RP) (Fig. 7C&D). However, HB-EGF did not increase S6RP phosphorylation, and blocking HB-EGF with CRM197 did not affect glucose-induced mTOR activation (Fig. 7C&D). Hence, glucose activation of mTOR is independent of HB-EGF.

## DISCUSSION

The results of this study demonstrate a critical role for HB-EGF in glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation in rat  $\beta$  cells. Exposing isolated islets to exogenous HB-EGF induced  $\beta$ -cell proliferation, whereas blocking HB-EGF signaling by inhibiting either EGFR or HB-EGF completely prevented the proliferative response. *In vivo*, silencing HB-EGF prevented the increase in  $\beta$ -cell proliferation in islets transplanted under the kidney capsule of glucose-infused rats. Taken together, our data identify a glucose/HB-EGF/EGFR axis that controls  $\beta$ -cell proliferation. Mechanistically, we showed that HB-EGF gene expression is induced by glucose in the  $\beta$  cell through the action of ChREBP. In addition we found that glucose-, but not HB-EGF-induced  $\beta$ -cell proliferation is blocked by Src inhibition. As Src family kinases are involved in EGFR transactivation via ADAM metalloproteases, we propose a mechanism whereby glucose activates ChREBP and Src to promote HB-EGF gene expression and HB-EGF membrane shedding, respectively, and subsequently EGFR downstream signaling and cell cycle activation (Fig. 8).

Our previous (21) and current results are in agreement with studies showing that overexpression of HB-EGF by retrograde injection of adenoviruses into the pancreatic duct leads to proliferation of pre-existing  $\beta$  cells in adult mice (31). In contrast, no increase in  $\beta$ -cell proliferation was observed following HB-EGF expression in developing mouse  $\beta$  cells (32). However, the presence of pancreatic fibrosis, stromal expansion and islet dysfunction in this model may have precluded such an effect. Interestingly, overexpression of HB-EGF (31) or BTC (33) in pancreatic ducts promotes  $\beta$ -cell neogenesis, and EGF gain-of-function studies in human duct cells (34; 35) support a similar conclusion. Hence, we propose that the major effect of HB-EGF is to promote proliferation of existing  $\beta$  cells, but that  $\beta$ -cell neogenesis could also contribute to its overall beneficial effects on  $\beta$ -cell mass. In contrast to its effects on  $\beta$ -cell proliferation, acute and extended (24 h) exposure to HB-EGF did not alter insulin secretion or insulin content in rat islets *ex vivo*. However, positive, anti-diabetic, effects of HB-EGF on the  $\beta$  cell were demonstrated in multiple low-dose streptozotocin diabetic mice whereby combined treatment of gastrin and HB-EGF led to improved islet function due in part to a reduction in insulinitis (36). Further studies will be required to fully elucidate the pleotropic effects of HB-EGF on pancreatic islets.

We found that AG1478, a specific inhibitor of EGFR with minimal activity towards other ErbB isoforms, completely abrogates HB-EGF induced  $\beta$ -cell proliferation. As HB-EGF signals via EGFR (ErbB1) and ErbB4 but not ErbB2 or ErbB3 (37) and EGFR is expressed in  $\beta$ -cells, whereas ErbB4 is only weakly expressed in rodent islets (38), we propose that HB-EGF acts predominantly via EGFR to promote  $\beta$ -cell proliferation.

EGFR inhibition, loss-of-function and dominant negative studies in adult rodents in the context of pathophysiological and physiological metabolic stress (6; 21; 39), and partial pancreatectomy (22) suggest that  $\beta$ -cell EGFR underlies the maintenance of glucose homeostasis by transducing signals that increase  $\beta$ -cell proliferation and mass. Notwithstanding a role for BTC downstream of GLP-1 (40), however, attempts to investigate the role of EGFR ligands in the regulation of  $\beta$ -cell mass and function have been limited to gain-of-function approaches (31; 33; 41; 42), whereas the identification of endogenous ligands contributing to  $\beta$ -cell compensation is unknown. We found that glucose, a key effector of regulation of  $\beta$ -cell mass in the face of increased insulin demand (11), requires HB-EGF signaling. When rat islets were exposed to glucose *ex vivo* or *in vivo*, the  $\beta$ -cell mitogenic response was dependent on both EGFR and HB-EGF. Although HB-EGF was essential for the glucose response, whether HB-EGF is the sole endogenous EGFR ligand acting during  $\beta$ -cell compensation to metabolic stress remains an open question. BTC (41), epiregulin (EPGN) (43), TGF $\alpha$  and EGF (41; 44) exert mitogenic effects on the  $\beta$  cell and are expressed in developing (45) and adult (38) rodent islets and during  $\beta$ -cell neogenesis (46). Hence, different EGFR ligands likely contribute to  $\beta$ -cell compensation in a context-dependent manner.

In previous studies we showed that HB-EGF gene expression is upregulated in islets following nutrient infusion in rats (21) and a similar trend was found in obese, diabetes-resistant (B6) mice (47). Our present results suggest that the increase in HB-EGF gene expression is due, at least in part, to the direct action of glucose. They are consistent with the time- and dose-dependent increase in HB-EGF gene expression observed in response to glucose in INS-1 cells (28) and rat islets (48). In addition we found that ChREBP is necessary for HB-EGF gene expression and that ChREBP binds a 3' HB-EGF gene enhancer element. Primary targets of ChREBP in the  $\beta$ -cell include ROR $\gamma$  and Myc (28), whereas the cell cycle regulatory cyclins and cyclin dependent kinases (cdks), which lack ChREBP binding sites, respond to glucose in a delayed manner due to their dependency

on first-phase factors (17; 28). Hence, downstream of ChREBP, HB-EGF/EGFR signaling could play a role alongside first-phase transcription factors to drive cell cycle regulators and initiate  $\beta$ -cell cycle progression in response to glucose (Fig. 8).

Although membrane-anchored proHB-EGF may be involved in juxtacrine signaling (49), the major effects of HB-EGF in the  $\beta$  cell are likely mediated by the soluble form generated by proteolytic processing of proHB-EGF. In mesangial cells, glucose promotes HB-EGF shedding and EGFR transactivation through Src-dependent activation of metalloproteases (30). Our results showing that Src inhibition blocked glucose- but not HB-EGF-induced  $\beta$ -cell proliferation suggest that this phenomenon is also operative in  $\beta$  cells. Consistent with this possibility, short-term exposure of MIN6 and human islets to glucose leads to phosphorylation of the Src family kinase YES (50). Overall, our data are consistent with the model proposed in Fig. 8 whereby glucose promotes Src-dependent proHB-EGF processing leading to HB-EGF shedding and stimulation of  $\beta$ -cell proliferation via paracrine and/or autocrine signaling through the EGFR.

mTOR is an essential mediator of mitogen induced  $\beta$ -cell proliferation (51). Blocking mTOR activity prevents the mitogenic effects of glucose (16) and, as we showed in the present study, also mitigates HB-EGF-induced proliferation. Surprisingly however, blocking HB-EGF had no effect on the increase in mTOR activity in response to glucose yet HB-EGF inhibition completely prevented glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation. Hence, we postulate the existence of a parallel signal emanating from EGFR acting alongside the mTOR pathway that is necessary for  $\beta$ -cell cycle engagement. A number of signaling effectors are known to act downstream of EGFR including, MAPK, PI3K/AKT (21) and IRS2 (52) that could contribute to the mitogenic response to HB-EGF (Fig. 8). Full characterization of the signaling pathway linking EGFR to the  $\beta$ -cell mitogenic response will require additional studies examining the potential implication of these kinases.

In conclusion, this study reveals a critical role of HB-EGF/EGFR signaling in glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation in rat islets. Future studies will focus on further elucidating the underlying mechanism and assessing the importance of this pathway in human islet pathophysiology.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the National Institutes of Health (grant R01-DK-58096 to V.P. and R01-DK-108905 to D.K.S.) and the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP 77686 to V.P.). H.M. was supported by a doctoral studentship from the Fonds de Recherche Québec - Santé. V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta Cell Function.

We thank A. Levert (CRCHUM) for technical assistance with isolated experiments and R. Sreaton (Sunnybrook Research Institute, Toronto, ON, Canada) for advice on human islet culture.

H.M. and M.R.M. designed the experiments and acquired the data. H.M., M.R.M., D.K.S., J.G. and V.P. researched data, analyzed the results, and wrote the manuscript. 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 at the 77<sup>th</sup> Scientific Sessions of the American Diabetes association, San Diego, CA, 9-13 June 2017 and at the 79<sup>th</sup> Scientific Sessions of the American Diabetes association, San Francisco, CA, 7-11 June 2019.

## REFERENCES

1. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S: Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 2014;383:1068-1083
2. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004;429:41-46
3. Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA: Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 2007;12:817-826
4. Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, Yin C, Holzenberger M, Stoffel M, Kulkarni RN: Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8977-8982
5. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, German MS: Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 2010;16:804-808
6. Hakonen E, Ustinov J, Mathijs I, Palgi J, Bouwens L, Miettinen PJ, Otonkoski T: Epidermal growth factor (EGF)-receptor signalling is needed for murine beta cell mass expansion in response to high-fat diet and pregnancy but not after pancreatic duct ligation. *Diabetologia* 2011;54:1735-1743
7. El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, Hu J, Zhou JY, Shirakawa J, Hou L, Goodman J, Karampelias C, Qiang G, Boucher J, Martinez R, Gritsenko MA, De Jesus DF, Kahraman S, Bhatt S, Smith RD, Beer HD, Jungtrakoon P, Gong Y, Goldfine AB, Liew CW, Doria A, Andersson O, Qian WJ, Remold-O'Donnell E, Kulkarni RN: SerpinB1 Promotes Pancreatic beta Cell Proliferation. *Cell Metab* 2016;23:194-205
8. 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

9. Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, Scott DK, Kim SK, O'Donnell CP, Garcia-Ocana A: Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* 2007;56:1792-1801
10. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M, Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T: Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:246-257
11. Porat S, Weinberg-Corem N, Tornovsky-Babaey S, Schyr-Ben-Haroush R, Hija A, Stolovich-Rain M, Dadon D, Granot Z, Ben-Hur V, White P, Girard CA, Karni R, Kaestner KH, Ashcroft FM, Magnuson MA, Saada A, Grimsby J, Glaser B, Dor Y: Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* 2011;13:440-449
12. Stamateris RE, Sharma RB, Hollern DA, Alonso LC: Adaptive beta-cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E149-159
13. Levitt HE, Cyphert TJ, Pascoe JL, Hollern DA, Abraham N, Lundell RJ, Rosa T, Romano LC, Zou B, O'Donnell CP, Stewart AF, Garcia-Ocana A, Alonso LC: Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Diabetologia* 2011;54:572-582
14. Martinez SC, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Glucose Regulates Foxo1 Through Insulin Receptor Signaling in the Pancreatic Islet  $\beta$ -cell. *Diabetes* 2006;55:1581-1591
15. 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;96:329-339
16. Stamateris RE, Sharma RB, Kong Y, Ebrahimpour P, Panday D, Ranganath P, Zou B, Levitt H, Parambil NA, O'Donnell CP, Garcia-Ocana A, Alonso LC: Glucose Induces Mouse beta-Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor. *Diabetes* 2016;65:981-995



17. Metukuri MR, Zhang P, Basantani MK, Chin C, Stamateris RE, Alonso LC, Takane KK, Gramignoli R, Strom SC, O'Doherty RM, Stewart AF, Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Scott DK: ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 2012;61:2004-2015
18. Zhang P, Kumar A, Katz LS, Li L, Paulynice M, Herman MA, Scott DK: Induction of the ChREBPbeta Isoform Is Essential for Glucose-Stimulated beta-Cell Proliferation. *Diabetes* 2015;64:4158-4170
19. Stoeckman AK, Ma L, Towle HC: Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 2004;279:15662-15669
20. Fontes G, Zarrouki B, Hagman DK, Latour MG, Semache M, Roskens V, Moore PC, Prentki M, Rhodes CJ, Jetton TL, Poitout V: Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 2010;53:2369-2379
21. Zarrouki B, Benterki I, Fontes G, Peyot ML, Seda O, Prentki M, Poitout V: Epidermal growth factor receptor signaling promotes pancreatic beta-cell proliferation in response to nutrient excess in rats through mTOR and FOXM1. *Diabetes* 2014;63:982-993
22. Song Z, Fusco J, Zimmerman R, Fischbach S, Chen C, Ricks DM, Prasad K, Shiota C, Xiao X, Gittes GK: Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Regulates beta Cell Proliferation in Adult Mice. *J Biol Chem* 2016;291:22630-22637
23. Taylor SR, Markesbery MG, Harding PA: Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) and proteolytic processing by a disintegrin and metalloproteinases (ADAM): a regulator of several pathways. *Semin Cell Dev Biol* 2014;28:22-30
24. Kelpke CL, Johnson LM, Poitout V: Increasing triglyceride synthesis inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat islets of langerhans: a study using adenoviral expression of diacylglycerol acyltransferase. *Endocrinology* 2002;143:3326-3332

25. 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
26. Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK, Fontes G, Amyot J, Tremblay C, Semache M, Lausier JA, Roskens V, Mirmira RG, Jetton TL, Poitout V: Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 2008;57:424-431
27. Ghislain J, Fontes G, Tremblay C, Kebede MA, Poitout V: Dual-Reporter beta-Cell-Specific Male Transgenic Rats for the Analysis of beta-Cell Functional Mass and Enrichment by Flow Cytometry. *Endocrinology* 2016;157:1299-1306
28. Schmidt SF, Madsen JG, Frafjord KO, Poulsen L, Salo S, Boergesen M, Loft A, Larsen BD, Madsen MS, Holst JJ, Maechler P, Dalgaard LT, Mandrup S: Integrative Genomics Outlines a Biphasic Glucose Response and a ChREBP-RORgamma Axis Regulating Proliferation in beta Cells. *Cell Rep* 2016;16:2359-2372
29. Hagege H, Klous P, Braem C, Splinter E, Dekker J, Cathala G, de Laat W, Forne T: Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat Protoc* 2007;2:1722-1733
30. Taniguchi K, Xia L, Goldberg HJ, Lee KW, Shah A, Stavar L, Masson EA, Momen A, Shikatani EA, John R, Husain M, Fantus IG: Inhibition of Src kinase blocks high glucose-induced EGFR transactivation and collagen synthesis in mesangial cells and prevents diabetic nephropathy in mice. *Diabetes* 2013;62:3874-3886
31. Kozawa J, Tokui Y, Moriwaki M, Li M, Ohmoto H, Yuan M, Zhang J, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Tochino Y, Shimomura I, Higashiyama S, Miyagawa J: Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector. *Pancreas* 2005;31:32-42

32. Means AL, Ray KC, Singh AB, Washington MK, Whitehead RH, Harris RC, Jr., Wright CV, Coffey RJ, Jr., Leach SD: Overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia. *Gastroenterology* 2003;124:1020-1036
33. Tokui Y, Kozawa J, Yamagata K, Zhang J, Ohmoto H, Tochino Y, Okita K, Iwahashi H, Namba M, Shimomura I, Miyagawa J: Neogenesis and proliferation of beta-cells induced by human betacellulin gene transduction via retrograde pancreatic duct injection of an adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:987-993
34. Rescan C, Le Bras S, Lefebvre VH, Frandsen U, Klein T, Foschi M, Pipeleers DG, Scharfmann R, Madsen OD, Heimberg H: EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade. *Lab Invest* 2005;85:65-74
35. Suarez-Pinzon WL, Lakey JR, Brand SJ, Rabinovitch A: Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin induces neogenesis of human islet {beta}-cells from pancreatic duct cells and an increase in functional {beta}-cell mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3401-3409
36. Castillo GM, Nishimoto-Ashfield A, Banerjee AA, Landolfi JA, Lyubimov AV, Bolotin EM: Omeprazole and PGC-formulated heparin binding epidermal growth factor normalizes fasting blood glucose and suppresses insulinitis in multiple low dose streptozotocin diabetes model. *Pharm Res* 2013;30:2843-2854
37. Elenius K, Paul S, Allison G, Sun J, Klagsbrun M: Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J* 1997;16:1268-1278
38. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, van der Meulen T, Huisin MO: Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab* 2016;5:449-458
39. Hakonen E, Ustinov J, Palgi J, Miettinen PJ, Otonkoski T: EGFR signaling promotes beta-cell proliferation and survivin expression during pregnancy. *PLoS One* 2014;9:e93651

40. Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M: Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 2003;52:124-132
41. Huotari MA, Palgi J, Otonkoski T: Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. *Endocrinology* 1998;139:1494-1499
42. Li L, Seno M, Yamada H, Kojima I: Promotion of beta-cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology* 2001;142:5379-5385
43. Kuntz E, Broca C, Komurasaki T, Kaltenbacher MC, Gross R, Pinget M, Damge C: Effect of epiregulin on pancreatic beta cell growth and insulin secretion. *Growth Factors* 2005;23:285-293
44. Krakowski ML, Kritzik MR, Jones EM, Krahl T, Lee J, Arnush M, Gu D, Mroczkowski B, Sarvetnick N: Transgenic expression of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor in beta-cells results in substantial morphological changes. *J Endocrinol* 1999;162:167-175
45. Huotari MA, Miettinen PJ, Palgi J, Koivisto T, Ustinov J, Harari D, Yarden Y, Otonkoski T: ErbB signaling regulates lineage determination of developing pancreatic islet cells in embryonic organ culture. *Endocrinology* 2002;143:4437-4446
46. Li M, Miyagawa J, Moriwaki M, Yuan M, Yang Q, Kozawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Iwahashi H, Tochino Y, Yamagata K, Matsuzawa Y: Analysis of expression profiles of islet-associated transcription and growth factors during beta-cell neogenesis from duct cells in partially duct-ligated mice. *Pancreas* 2003;27:345-355
47. Tu Z, Keller MP, Zhang C, Rabaglia ME, Greenawalt DM, Yang X, Wang IM, Dai H, Bruss MD, Lum PY, Zhou YP, Kemp DM, Kendzioriski C, Yandell BS, Attie AD, Schadt EE, Zhu J: Integrative analysis of a cross-loci regulation network identifies App as a gene regulating insulin secretion from pancreatic islets. *PLoS Genet* 2012;8:e1003107
48. Bensellam M, Van Lommel L, Overbergh L, Schuit FC, Jonas JC: Cluster analysis of rat pancreatic islet gene mRNA levels after culture in low-, intermediate- and high-glucose concentrations. *Diabetologia* 2009;52:463-476

49. Ray KC, Blaine SA, Washington MK, Braun AH, Singh AB, Harris RC, Harding PA, Coffey RJ, Means AL: Transmembrane and soluble isoforms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor regulate distinct processes in the pancreas. *Gastroenterology* 2009;137:1785-1794
50. Yoder SM, Dineen SL, Wang Z, Thurmond DC: YES, a Src family kinase, is a proximal glucose-specific activator of cell division cycle control protein 42 (Cdc42) in pancreatic islet beta cells. *J Biol Chem* 2014;289:11476-11487
51. Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, Walsh K, Bernal-Mizrachi E: mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem* 2009;284:7832-7842
52. Oh YS, Shin S, Lee YJ, Kim EH, Jun HS: Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS One* 2011;6:e23894

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. HB-EGF stimulates  $\beta$ -cell proliferation via the EGFR.** (A-F) Isolated rat islets were exposed to 2.8 mM glucose, 16.7 mM glucose, or HB-EGF (100 ng/ml) or betacellulin (BTC; 50 ng/ml) in the presence of 2.8 mM glucose for 72 h. (G, H) Isolated rat islets were exposed to 2.8 mM glucose and left untreated or treated with HB-EGF (100 ng/ml) with or without AG1478 (300 nM) or rapamycin (Rap; 10 nM) for 72 h. Proliferation was assessed by Ki67 (A-D, G, H) or EdU (E, F) staining and Nkx6.1 (A, B) or insulin (Ins) (C-H). Representative images of Nkx6.1 (red), Ki67 (green) and nuclei (blue) (A) or insulin (green), Ki67 or EdU (red) and nuclei (blue) (C, E, G) staining. Arrows show positive nuclei for Ki67 and EdU. (B, D, H) The percentage of Ki67+ insulin+ (or Nkx6.1+) cells of total insulin+ (or Nkx6.1+) cells. (F) Percentage of EdU+ insulin+ cells of total insulin+ cells. Data represent individual values and are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=4–6). Scale bars, 50  $\mu$ m. \*p < 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, as compared to the 2.8 mM glucose control condition. ns, not significant.

**Figure 2. HB-EGF stimulates  $\beta$ -cell proliferation in human islets.** Human islets were dispersed and then subjected to 2.8 or 16.7 mM glucose or HB-EGF (100 ng/ml) in the presence of 2.8 mM glucose for 72 h. Proliferation was assessed by EdU and insulin (Ins) to mark  $\beta$  cells. (A) Representative images of insulin (green), EdU (red) and nuclei (blue) staining. Arrows show positive nuclei for EdU. (B) The percentage of EdU+ insulin+ cells of total insulin+ cells. Data represent individual values and are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=9). Scale bars, 50  $\mu$ m. \*\*p<0.01, as compared to the 2.8 mM glucose control condition.

**Figure 3. Glucose stimulates  $\beta$ -cell proliferation via HB-EGF/EGFR signaling.** (A,B) Isolated rat islets were exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose with or without AG1478 (300 nM) for 72 h. (C,D) Isolated rat islets were exposed to 2.8 mM glucose, 16.7 mM glucose, or 2.8 mM glucose + 100 ng/ml HB-EGF in the absence or presence of 10  $\mu$ g/ml CRM197 for 72 h. (E,F) Isolated rat islets were exposed to 2.8 mM glucose with or without 100 ng/ml HB-EGF, or 16.7 mM glucose with or without 10  $\mu$ g/ml CRM197, for 72 h. (G, H) Isolated rat islets were infected with Adv-shHBEGF or Adv-shCTL and exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose for 72 h. Proliferation was assessed by Ki67 (A-D,G,H) or pH3 (E,F) staining and insulin (Ins; A-D,G,H) or Nkx6.1 (E,F) staining to mark  $\beta$ -cells. (A,

C, E, G) Representative images of insulin (green) or Nkx6.1 (red), Ki67 (red) or pH3 (green) and nuclei (blue) staining. Arrows show positive nuclei for Ki67 or pH3. (B, D, H) Percentage of Ki67+ insulin+ cells of total insulin+ cells. (F) Percentage of pH3+ Nkx6.1+ cells of total Nkx6.1+ cells. Data represent individual values and means  $\pm$  SEM (n=4–6). Scale bars, 50  $\mu$ m. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, as compared to the 2.8 mM glucose condition. && p<0.01, as compared to 16.7 mM glucose. ns, not significant.

**Figure 4. HB-EGF is required for glucose-induced  $\beta$ -cell proliferation *in vivo*.** (A) Isolated rat islets were infected with Adv-shHBEGF or Adv-shCTL and transplanted under the kidney capsule of 2-mo-old Lewis rats infused with saline (Sal) or glucose (Glu) for 72 h. (B-E) Proliferation was assessed by Ki67 staining and insulin (Ins) staining. (B, D) Representative images of insulin (green), Ki67 (red) and nuclei (blue) staining in the pancreas (B) or transplanted islets (D). Arrows show positive nuclei for Ki67. (C, E) The percentage of Ki67+ insulin+ cells of total insulin+ cells in the pancreas (C) and transplanted islets (E). Data represent individual values and means  $\pm$  SEM (n=4–6). Scale bars, 50  $\mu$ m. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001, as compared to the saline condition. ns, not significant.

**Figure 5. Glucose increases HB-EGF gene expression in the  $\beta$ -cell.** (A-C) HB-EGF mRNA was measured in isolated intact rat islets (A) or in FACS-sorted YFP-positive (B) and YFP-negative (C) cells from isolated RIP7-RLuc-YFP islets following exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose for 24 h. mRNA was determined by quantitative RT-PCR and normalized to cyclophilin A. Data are presented as the fold-increase over the 2.8 mM glucose condition and represent individual values and means  $\pm$  SEM (n=5-6). \*p < 0.05, as compared to the 2.8 mM glucose condition. ns, not significant.

**Figure 6. ChREBP mediates glucose-induced HB-EGF gene expression in INS-1 cells.** (A) HB-EGF RNA was measured in INS-1 cells exposed to 3 or 15 mM glucose for 18 h in the presence of a control siRNA (SiCon) or an siRNA directed against ChREBP (SiChR) (n=3). mRNA was determined by quantitative RT-PCR and normalized to  $\beta$ -actin. NT, non transfected. (B) ChREBP binding to a genomic region 30 kb downstream from the transcription start site of the HB-EGF gene known to bind ChREBP (black bar in C, upper) was assessed in INS-1 cells exposed to 2 or 20 mM glucose

for 6 h followed by ChIP using an antibody against ChREBP or control IgG (n=3). Data indicate the percent binding after subtraction of the IgG control. Inset, Pklr coding region serves as a negative control. (C) Upper, genome browser view of 38,000 bp of the genomic locus spanning the TSS of the HB-EGF gene showing the ChREBP binding (ChREBP ChIP) and DNase hypersensitivity sites (DNase HS) downstream of the gene (28). Black bar, region amplified in (B). Lower, chromatin confirmation capture (3C) data from INS-1 cells treated as in (B), aligned to the genome browser and expressed as interaction frequency normalized to maximum interaction (n=3). Black line, anchor primer. Shaded gray added for clarity represents interaction frequency after 20 mM glucose treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001, as compared to the control condition. ns, not significant.

**Figure 7. Src is required for glucose- but not HB-EGF-induced  $\beta$ -cell proliferation and glucose-induced mTOR activation does not require HB-EGF.** (A, B) Isolated rat islets were exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose or HB-EGF (100 ng/ml) in the presence of 2.8 mM glucose for 72 h with or without the Src inhibitor PP1 (1  $\mu$ M). Proliferation was assessed by Ki67 staining and insulin (Ins). (A) Representative images of insulin (green), Ki67 (red) and nuclei (blue). Arrows show positive nuclei for Ki67. (B) The percentage of Ki67+ insulin+ cells of total insulin+ cells. Scale bars, 50  $\mu$ m. (C, D) Isolated rat islets were exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose or HB-EGF (100 ng/ml) in the presence of 2.8 mM glucose with or without CRM197 (10  $\mu$ g/ml) for 24 and 48 h. Representative Western blot (C) of phospho-S6RP (pS6RP) and  $\alpha$ -tubulin and densitometric quantification (D) of pS6RP normalized to  $\alpha$ -tubulin. Data represent individual values and means  $\pm$  SEM (n=4-6). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, as compared to the 2.8 mM glucose condition or as indicated in the graph (B). ns, not significant.

**Figure 8. Proposed mechanism of glucose/HB-EGF/EGFR axis controlling  $\beta$ -cell proliferation.** An increase in the soluble, active form of HB-EGF is mediated by glucose-induced ChREBP, which increases HB-EGF gene expression, and by glucose-induced Src, which is coupled to metalloprotease (ADAM)-dependent proHB-EGF processing. Subsequent binding of HB-EGF to the  $\beta$ -cell EGFR activates signaling pathways including mTOR but also possibly MAPK, PI3K/AKT and IRS2 that together promote  $\beta$ -cell proliferation. Specific inhibitors used in this study to block glucose- and HB-EGF-induced  $\beta$ -cell proliferation are indicated.



**Figure 1**

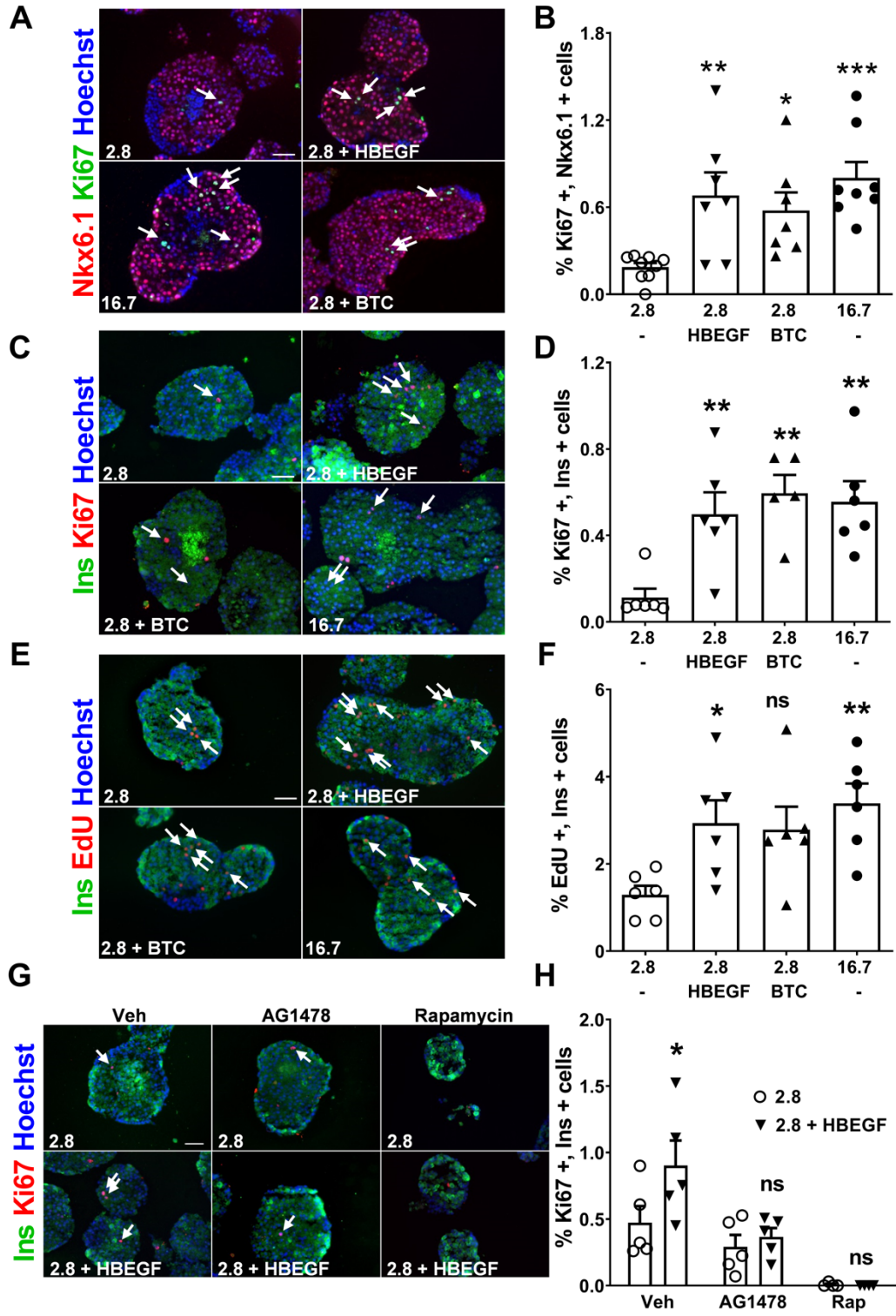
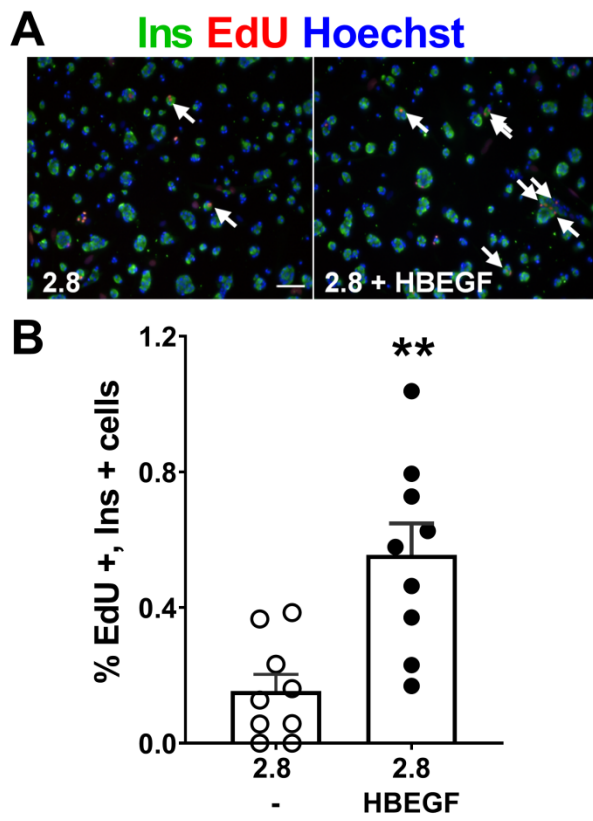


Figure 2



**Figure 3**

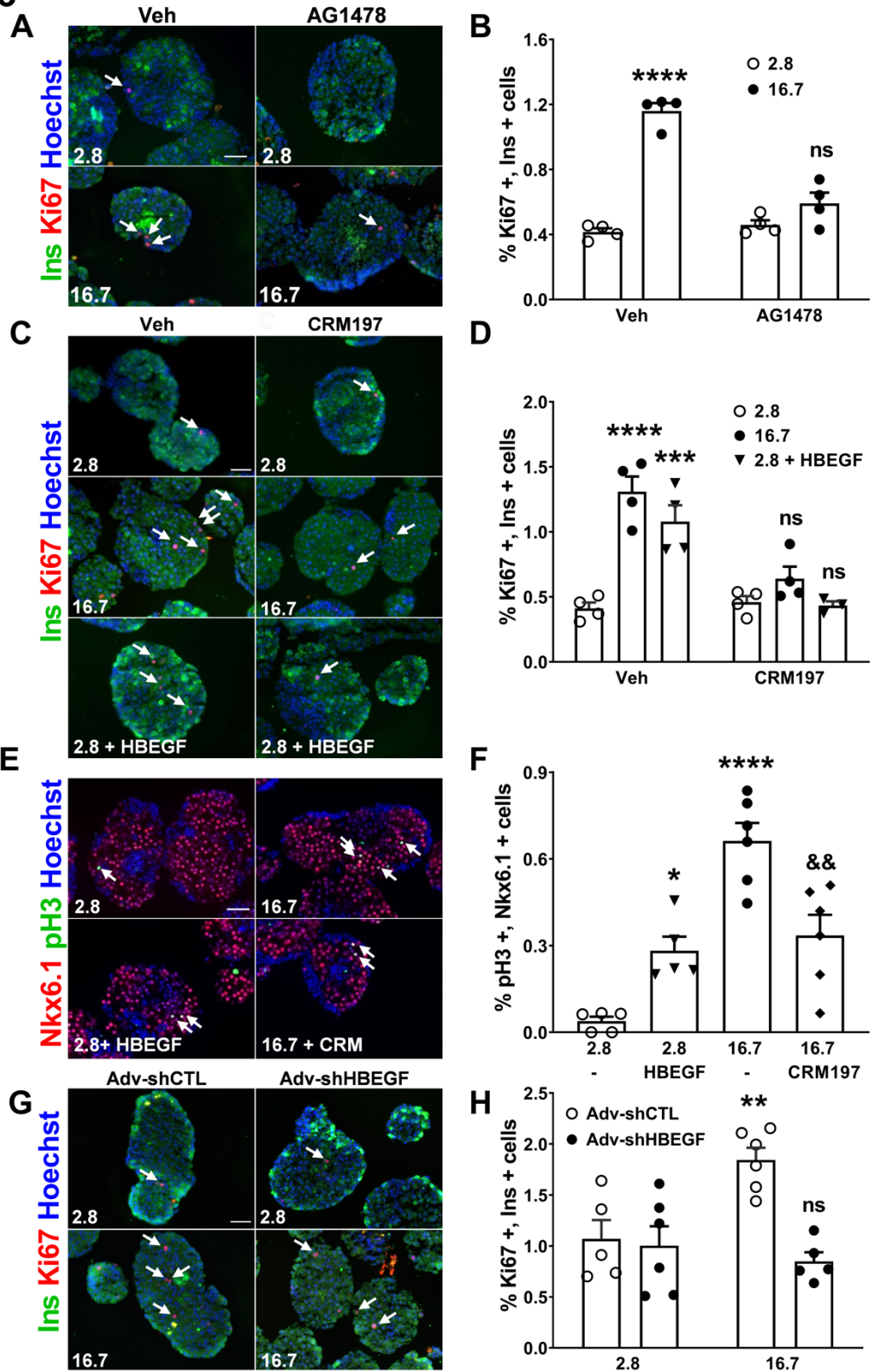


Figure 4

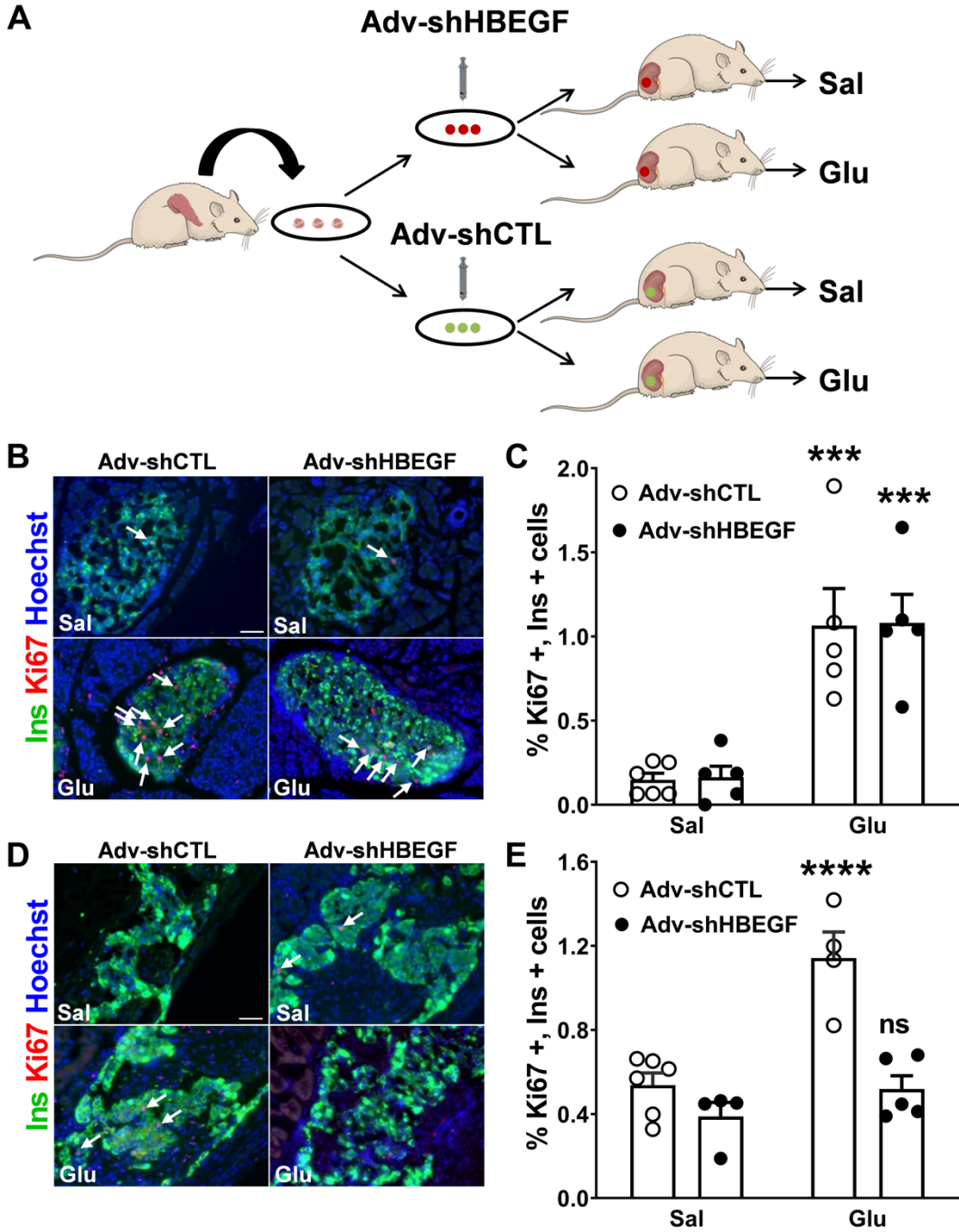
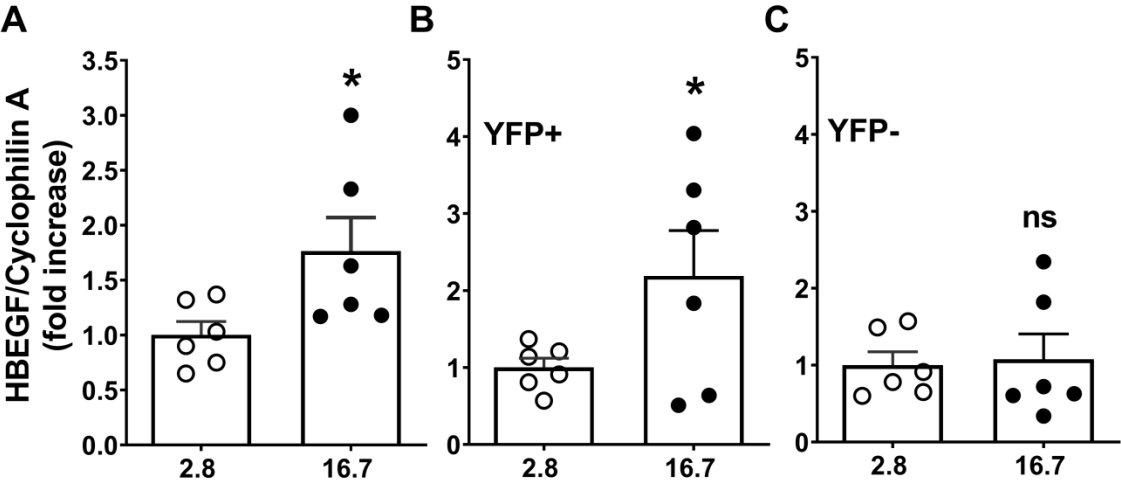
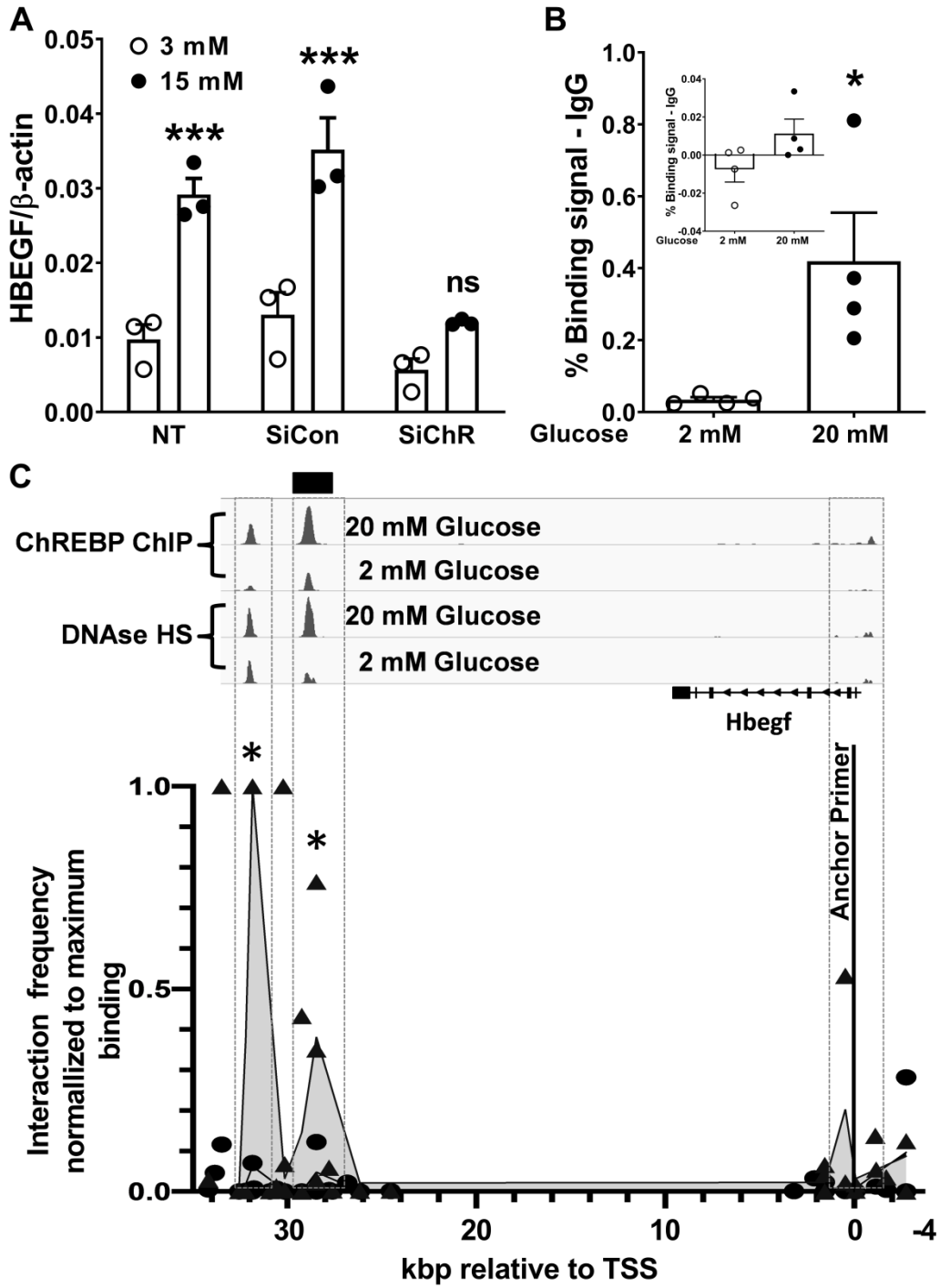


Figure 5



**Figure 6**



**Figure 7**

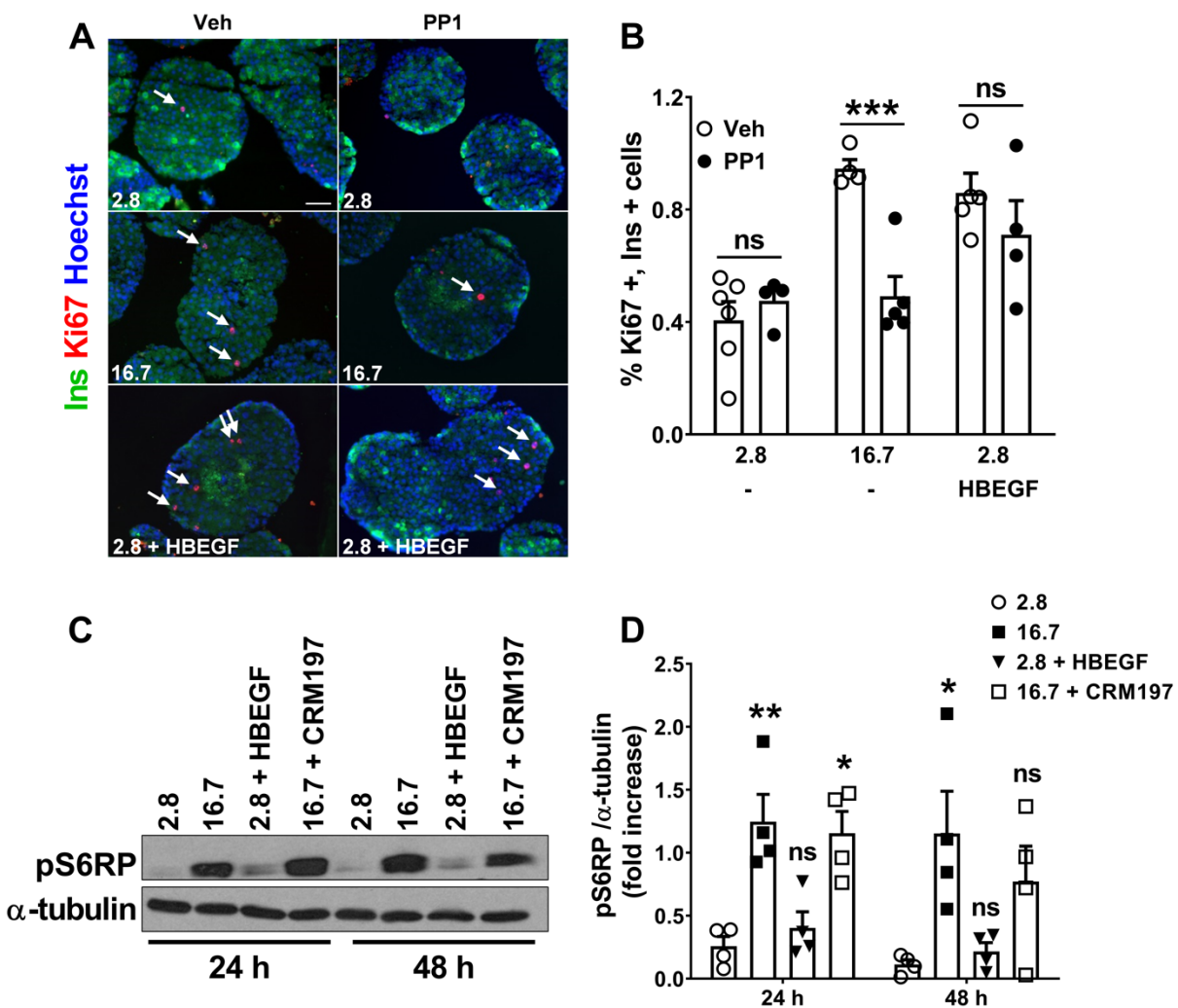
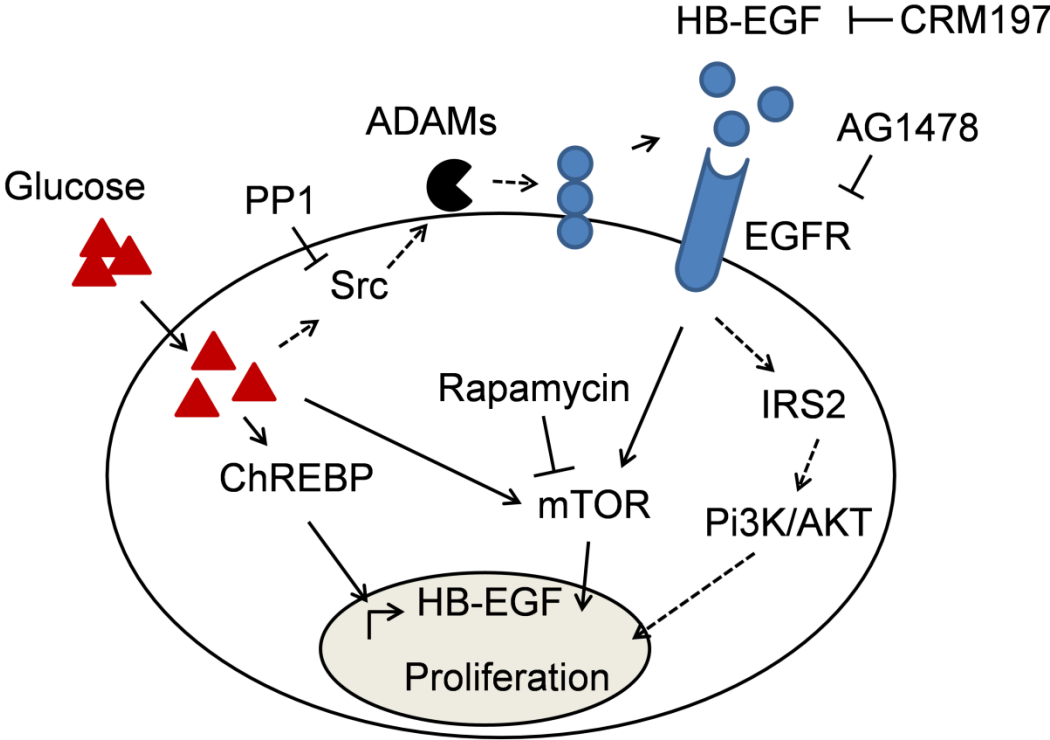


Figure 8





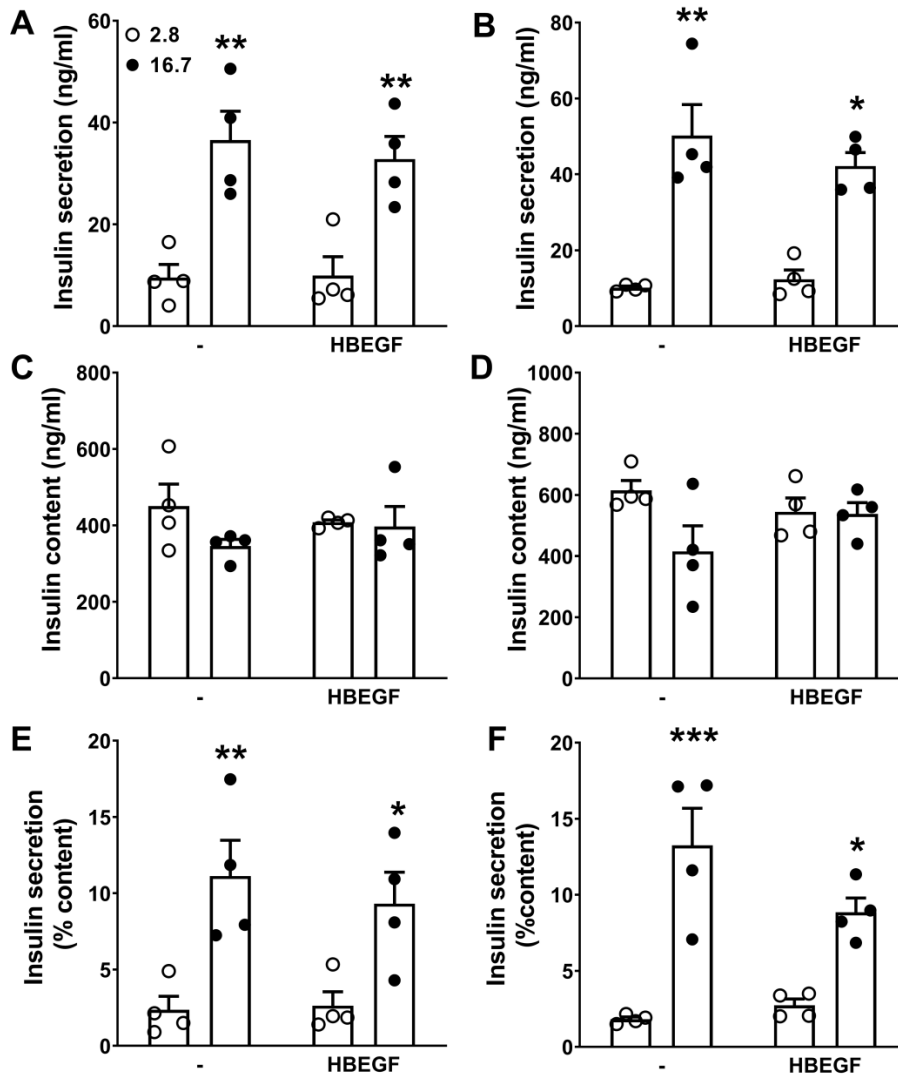
**Supplemental Table S1:** Sources of antibodies used.

| Antibody                    | Dilution/Concentration | Company        | Cat #     |
|-----------------------------|------------------------|----------------|-----------|
| <b>Immunohistochemistry</b> |                        |                |           |
| Insulin                     | 1:500                  | DAKO           | A0564     |
| Nkx6.1                      | 5 ug/ml                | DSHB           | F55A12    |
| Ki67                        | 1:400                  | Abcam          | 15580     |
| PHH3                        | 1:600                  | Novus          | NB21-1091 |
| <b>Immunoblotting</b>       |                        |                |           |
| p-S6 ribosomal protein      | 1:2500                 | Cell Signaling | 2211S     |
| alpha-tubulin               | 1:20000                | Abcam          | 4074      |
| <b>Immunoprecipitation</b>  |                        |                |           |
| ChREBP                      | -                      | Abcam          | ab157153  |
| Normal IgG                  | -                      | Santa Cruz     | sc-2027   |

**Supplemental Table S2. 3C, ChIP and RT-PCR primer**

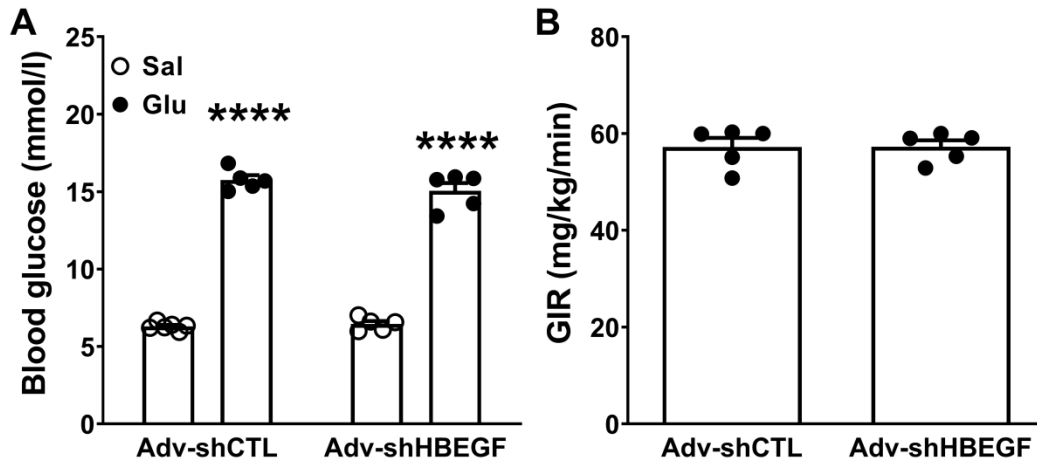
| Primer name        | forward                | Reverse or anchor     |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>3C</b>          |                        |                       |
| 2 3C               | TCCCAAGCCACGTATGATGT   | GGAGACACGGGCTCTTACCT  |
| 3 3C               | GTGTTGGGAATGGGATTTTG   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 4 3C               | AACACGAGGAAGGGAGGAAG   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 5 3C               | GACAACTGGGGGACTGAGAC   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 6 3C               | AAGCCTGAAATGAACAGAACAA | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 7 3C               | AGGTCCTAGGTGTCCTGGAA   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 8 3C               | TGCATCCCAAGCAACACTAA   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 17 3C              | GAGGGGTTGTGGGTTCATTA   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 18 3C              | AGGTTCCTTCTCCGTTGTGC   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 19 3C              | GTTGGTGACCGGTGAGAGTC   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 20 3C              | GGACCGACTCTGAACAGACA   | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| 21 3C              | ACATCCAACCTTGCCTTCTGC  | GGTAAGAGCCCGTGTCTCCG  |
| <b>ChIP</b>        |                        |                       |
| Pklr coding region | GTGGAGCACGGTGGTATCTT   | CTTCACGCCTTCATGGTTCT  |
| HB-EGF downstream  | GTGAGTGCCCATGTCACTGT   | GCTTGCCTTCCTTCCTTTTT  |
| <b>RT-PCR</b>      |                        |                       |
| HB-EGF-1           | GACCGATCTGGACCTTTTCA   | CCGTGGATGCAGTAGTCCTT  |
| HB-EGF-2           | GTGGGTAGCAGCTGGTTTGT   | GTTGGTGACCGGTGAGAGT   |
| Cyclophilin A      | GCCATTATGGCGTGTGAAGTC  | CTTGCTGCAGACATGGTCAAC |

**Figure S1**



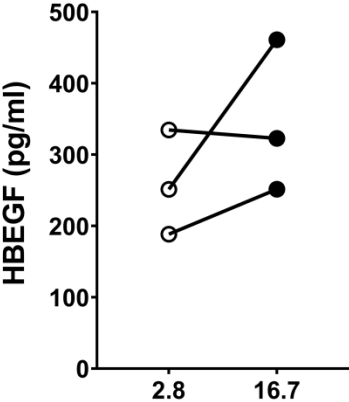
**Figure S1. HB-EGF does not affect glucose-induced insulin secretion or insulin content in rat islets *ex vivo*.** (A-D) Insulin secretion (A, B) and total islet insulin content (C, D) were determined in 1-h static incubations in response to 2.8 and 16.7 mM glucose in isolated rat islets with or without exposure to HB-EGF (100 ng/ml) during the static incubation with glucose (A, C, E) or 24 h prior (B, D, F). (E, F) Insulin levels are expressed as a percentage of total islet insulin content. Data represent individual values and means  $\pm$  SEM (n=4). \*p < 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, as compared to the 2.8 mM glucose condition.

**Figure S2**



**Figure S2. Blood glucose levels and GIR following glucose infusion in Lewis rats after islet transplant.** Control shRNA adenovirus (shCTL) or shHB-EGF adenovirus (shHBEGF) infected islets were transplanted under the kidney capsule of Lewis rats and infused with saline (Sal) or glucose (Glu) for 72 h. Blood glucose levels (A) and GIR (B) during the infusion. Data represent individual values and means  $\pm$  SEM (n=4-6). \*\*\*\*p<0.0001, as compared to the saline condition.

**Figure S3**



**Figure S3. HB-EGF levels in rat islet extracts.** Isolated rat islets were exposed to 2.8 and 16.7 mM glucose for 1h. HB-EGF was assessed in the protein extract by ELISA kit. Data represent individual values (n=3).

| Checklist for Reporting Human Islet Preparations Used in Research   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
|---|---|--|---|---|---|---|------------------|------------------|--|
| Adapted from Hart NJ, Powers AC (2018) Progress, challenges, and suggestions for using human islets to understand islet biology and human diabetes. <a href="https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9772-2">https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9772-2</a> . |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Report downloaded on 11/7/2019 11:08:20 AM  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Data provided by IDP  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Labels in blue text are additional fields or clarification provided by IDP  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Manuscript DOI: <a href="https://doi.org/10.2337/10.2337/10.2337/4618-1234">https://doi.org/10.2337/10.2337/4618-1234</a>   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Title   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Author list   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Corresponding author  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Email address   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Islet Preparation   | 1   | 2  | 3   | 4                                       | 5                                       | 6                                       | 7                | 8                | 9  |
| <b>MANDATORY INFORMATION</b>  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Unique Identifier   | SAMN08775078                                      | SAMN08775081                             | SAMN08775083                                      | SAMN08775087                            | SAMN13027809                            | RD73                                    | RD76             | RD77             | R326   |
| Donor Age (years)   | 60  | 32                                       | 32  | 32                                      | 45                                      | 43                                      | 74               | 63               | 54   |
| Donor Sex (M/F)   | F   | M  | M   | M                                       | F                                       | F                                       | F                | F                | M  |
| Donor BMI (kg/m <sup>2</sup> )  | 20.4  | 28.7                                     | 27.8  | 36.4                                    | 31.6                                    | 28.3                                    | 26.5             | 24.7             | 27   |
| Donor HbA1c   | Not Reported                                      | Not Reported                             | Not Reported                                      | Not Reported                            | 5.7                                     | 5.4                                     | ADI Islet core   | ADI Islet core   | ADI Islet core   |
| Origin/source of islets   | IDP   | IDP                                      | IDP   | IDP                                     | IDP                                     | IDP                                     | ADI Islet core   | ADI Islet core   | ADI Islet core   |
| Islet isolation center*   | The Scharp-Lay Research Institute                 | University of Miami                      | University of Miami                               | University of Wisconsin                 | The Scharp-Lay Research Institute       | University of Wisconsin                 | ADI Islet core   | ADI Islet core   | ADI Islet core   |
| Donor history of diabetes? Yes/No   | No  | No                                       | No  | No                                      | No                                      | No                                      | No               | No               | No   |
| If Yes, complete the next two lines if this information is available  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Diabetes duration (years)   | Not Applicable                                    | Not Applicable                           | Not Applicable                                    | Not Applicable                          | Not Applicable                          | Not Applicable                          | Not Applicable   | Not Applicable   | Not Applicable   |
| Glucose-lowering therapy at time of dx: Not Applicable  | Not Applicable                                    | Not Applicable                           | Not Applicable                                    | Not Applicable                          | Not Applicable                          | Not Applicable                          | Not Applicable   | Not Applicable   | Not Applicable   |
| <b>RECOMMENDED INFORMATION</b>  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Cause of death  | Cerebrovascular/stroke                            | Cerebrovascular/stroke                   | Anoxia  | Cerebrovascular/stroke                  | Anoxia                                  | Anoxia                                  | NDD-Neurological | NDD-Neurological | NDD-Neurological   |
| Warm ischemia time (h)  | Not Reported                                      | Not Reported                             | Not Reported                                      | Not Reported                            | 0.2                                     | Not Reported                            | Not Reported     | Not Reported     | Not Reported   |
| Cold ischemia time (h)  | 9.0   | 14.1                                     | 10.3  | 2.8                                     | 11.1                                    | 2.8                                     | 13               | 23               | 15   |
| Estimated purity (%)  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| By islet isolation center at time of shipment with Dithizone (DTZ) staining per IDP SOP   | 70  | 85                                       | 90  | 90                                      | 90                                      | 90                                      | 90               | 90               | 90   |
| Estimated viability (%)   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| By islet isolation center at time of broadcast with Fluorescence Diacetate/Propidium iodide (FDA/PI) staining per IDP SOP   | 90  | 94                                       | 92  | 96                                      | 95                                      | 95                                      | Not Reported     | Not Reported     | Not Reported   |
| Total culture time <sup>b</sup>   | Not Reported                                      | Not Reported                             | Not Reported                                      | Not Reported                            | 210 h                                   | 84 h                                    | 55 h             | 114 h            | 86 h   |
| Calculated start date/time of experiment (date/time islet culture began (below))  | Not Reported                                      | Not Reported                             | Not Reported                                      | Not Reported                            | 2019-10-11 05:00                        | 36 h                                    | 7 h              | 66 h             | 38 h   |
| Date/Time Islet Culture Began at Islet Isolation Center (Pacific Standard Time, 24-hour format)   | Not Reported                                      | Not Reported                             | Not Reported                                      | Not Reported                            | 2019-10-11 05:00                        | 36 h                                    | 7 h              | 66 h             | 38 h   |
| Glucose-stimulated insulin secretion or other functional measurement <sup>c</sup>   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Stimulation index (SI) by static incubation at islet isolation center pre-shipment per IDP SOP  | SI (G2.8mM-G28mM) <sup>d</sup> = 1.5              | SI (G2.8mM-G28mM) <sup>d</sup> = 14.7    | SI (G2.8mM-G28mM) <sup>d</sup> = 1.9              | SI (G2.8mM-G28mM) <sup>d</sup> = 3.4    | SI (G2.8mM-G28mM) <sup>d</sup> = 2.8    | SI (G2.8mM-G28mM) <sup>d</sup> = 2.8    | index: 7.3       | index: 5.62      | Mean 16.7 mM to 1 mM stimulation Mean 16.7 mM to 1 mM stimulation Mean 16.7 mM to 1 mM stimulation index: 5.63 |
| Glucose-stimulated insulin secretion or other functional measurement  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| Area Under the Curve (AUC) by perfusion at HPP post shipment sample per IDP SOP   | AUC (G5.6mM-G16.7mM) <sup>e</sup> = Not Available | AUC (G5.6mM-G16.7mM) <sup>e</sup> = 14.7 | AUC (G5.6mM-G16.7mM) <sup>e</sup> = Not Available | AUC (G5.6mM-G16.7mM) <sup>e</sup> = 3.4 | AUC (G5.6mM-G16.7mM) <sup>e</sup> = 2.8 | AUC (G5.6mM-G16.7mM) <sup>e</sup> = 2.8 | Not Reported     | Not Reported     | Not Reported   |
| Headpiced to purify? Yes/No   | Yes   | Yes                                      | Yes   | Yes                                     | Yes                                     | Yes                                     | Yes              | Yes              | Yes  |
| Additional notes  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| *Shipments of more than one batch type were received from this islet isolation  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| For example, IDP, ECT, Alberta IsletCore  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| †Please specify the therapy/therapies   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| ‡Time of islet culture at the isolation centre, during shipment and at the receiving laboratory   |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |
| §Please specify the test and the results  |   |  |   |   |   |   |                  |                  |  |

## **Article 2 – Importante prolifération des cellules non $\beta$ en réponse à plusieurs facteurs stimulant la prolifération des cellules $\beta$ humaines**

### **Mise en contexte**

Dans la première étude, présentée au début de cette thèse, nous avons identifié le facteur de croissance HB-EGF comme ayant un important rôle mitogène dans la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques d'îlots de rats puis humains. Nous avons également montré que l'induction de la prolifération en réponse au glucose nécessite l'activation de la voie de signalisation HB-GEF-EGFR-mTOR dans les îlots de rats. Nous avons proposé un mécanisme explicatif menant à l'activation de cette voie où nous avons démontré que le glucose stimule l'expression de HB-EGF via l'activation du facteur de transcription ChREBP, puis transactive l'EGFR via le clivage protéolytique du pro-HBEGF par l'activation d'une protéine tyrosine kinase de la famille Src .

L'identification de molécules capables de stimuler la réplication des cellules  $\beta$  humaines permettant de préserver leur masse fonctionnelle aurait un intérêt thérapeutique majeur, c'est donc dans cette optique que la suite du projet a consisté à tester si l'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR est requise pour stimuler la prolifération des cellules  $\beta$  humaines en réponse au glucose. Nous avons d'abord réalisé une étude ayant pour objectif d'identifier la méthode la plus appropriée pour étudier la prolifération des cellules  $\beta$  humaines. Il existe principalement deux méthodes, l'immunohistochimie et la cytométrie en flux. Dans cette deuxième étude, nous avons donc comparé systématiquement la mesure de la prolifération par immunohistochimie et cytométrie en flux, sur des îlots humains intacts ou dispersés, en réponse à différents facteurs mitogènes des cellules  $\beta$  pancréatiques tels que le glucose, l'HB-EGF et l'harmine.

## **Pronounced proliferation of non- $\beta$ cells in response to $\beta$ -cell mitogens in human islets *ex vivo***

Hasna Maachi<sup>1,2,\*</sup>, Julien Ghislain<sup>1,\*</sup>, Caroline Tremblay<sup>1</sup>, Vincent Poitout<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Physiology, University of Montreal, QC, Canada

<sup>3</sup> Department of Medicine, University of Montreal, QC, Canada

\*These authors contributed equally to the work

Running title: mitogen-induced human islet cell proliferation

Corresponding author:

Vincent Poitout, DVM, PhD

CRCHUM, 900 rue St Denis

Montréal, QC, H2X 0A9 - CANADA

Tel: (514) 890-8044

Email: [vincent.poitout@umontreal.ca](mailto:vincent.poitout@umontreal.ca)

Word count: Abstract, 183; Main text, 2761

3 figures, 1 table and 1 supplemental table



## **ABSTRACT**

The potential to treat diabetes by increasing  $\beta$ -cell mass is driving a major effort to identify  $\beta$ -cell mitogens. Demonstration of mitogen activity in human  $\beta$  cells is frequently performed in ex vivo assays. However, disparities in the potency of many  $\beta$ -cell mitogens between studies have led us to investigate the sources of this variability. We obtained 22 male (14) and female (7) human islet batches from multiple centers covering a range of donor ages (18-66 years) and BMI (16.4-38.5). Islets were kept intact or dispersed into single cells and cultured in the presence of the  $\beta$ -cell mitogens harmine, glucose, and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), and subsequently analyzed for cell proliferation by immunocytochemistry and flow cytometry. Harmine and HB-EGF promoted human  $\beta$ -cell proliferation, albeit weakly, whereas the effect of glucose was assay-dependent. In contrast to their effects on  $\beta$  cells, harmine potently stimulated  $\beta$ -cell proliferation and both harmine and HB-EGF increased proliferation of insulin- and glucagon-negative cells which included cytokeratin 19 (CK19)-positive duct cells. This study suggests that rigorous assessment of  $\beta$ -cell mitogens requires complementary approaches and careful identification of cell identity.

## INTRODUCTION

Type 2 diabetes is characterized by insufficient functional  $\beta$ -cell mass (1). In non-diabetic obese individuals and during pregnancy, accretion of insulin secretory capacity per  $\beta$  cell and  $\beta$ -cell mass maintain glucose homeostasis by balancing levels of circulating insulin and insulin resistance. Deciphering the mechanisms controlling  $\beta$ -cell proliferation has thus become a major research goal in the hope to identify therapeutic targets to expand  $\beta$ -cell mass and prevent or delay the onset of diabetes.

Diverse factors including insulin (2), GLP-1 (3), serotonin (4), epidermal growth factors (5), osteoprotegerin (6), serpinB1 (7) and nutrients such as glucose and free fatty acids (8-12) promote replication of rodent  $\beta$  cells. Unfortunately, our knowledge of the factors controlling human  $\beta$ -cell proliferation is more limited (13-15). Although human  $\beta$  cells respond to glucose (16-18), fatty acids (12), serpinB1 (7), harmine (19-21) and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) (22), proliferation rates are very low compared to rodents and published data on the efficacy of human  $\beta$ -cell mitogens are often highly variable.

In this study we assessed the mitogenic properties of harmine, glucose and HB-EGF in both intact and dispersed human islets using immunochemistry and flow cytometry to differentiate proliferating  $\beta$  and non- $\beta$  cell types, including  $\alpha$  cells and duct cells. We found that the effects of glucose on  $\beta$ -cell proliferation are assay-dependent, that HB-EGF stimulates human  $\beta$ -cell proliferation, and that harmine is a weak inducer of human  $\beta$ -cell proliferation. In addition, harmine and HB-EGF potently simulated proliferation of different non- $\beta$  cell populations.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **Human islets**

Islets from non-diabetic human donors were provided by the Clinical Islet Laboratory at the University of Alberta, the Alberta Diabetes Institute Islet Core, and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases-sponsored Integrated Islet Distribution Program (Table 1). The use of human islets was approved by the Institutional Ethics Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (protocol # ND-05-035). Human islets were cultured in cGMP Prodo Islet Media (Standard) with 5% (vol./vol.) human AB serum and 1% glutamine/glutathione mixture (Prodo Labs Inc., Irvine, CA) overnight prior to experimentation.

### **Dispersed islet proliferation assay**

Dispersed human islet proliferation assay was performed essentially as described (22). Briefly, hand-picked human islets were dispersed in accutase for 10 min at 37°C and plated in a 96 well plate (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) treated with Poly-D-Lysine Hydrobromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The next day, cells were cultured in RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) with 1% (vol./vol.) human serum albumin (Celprogen, Torrance, CA) for 3 days in the presence of EdU (10 µM) and glucose (2.8, 5.5 or 16.7 mM), harmine (10 µM; Millipore-Sigma, Darmstadt, Germany) or HB-EGF (100 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN) as indicated in the Figure legends. At the end of the treatment, cells were fixed and immunostained for Nkx6.1 (Supplemental Table S1) and the proliferative marker EdU detected using the Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired with an Operetta CLS™ high-content imaging system (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA) at 20X magnification using Harmony 4.5 software. Cell counts were determined using ImageJ software (National Institutes of Health). Proliferation was calculated as the percentage of double-positive EdU+ and Nkx6.1+ cells over the total Nkx6.1+ population. At least 1,500 Nkx6.1+ cells were manually counted per condition.

### **Whole islet proliferation assay**

Hand-picked human islets (approximately 200/condition) were cultured in RPMI-1640 with 1% (vol./vol.) human serum albumin in 6-well plates for 3 days in the presence of glucose (2.8 or 16.7 mM), 100 ng/ml HB-EGF or harmine (10  $\mu$ M) as indicated in the Figure legends. EdU (10  $\mu$ M) was added throughout. Media were replaced daily.

### **Immunostaining of islet sections**

At the end of treatment, islets were embedded in optimal cutting temperature (OCT) compound, frozen, sectioned at 8  $\mu$ m and mounted on Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific). Sections were fixed in 4% PFA and treated with triton 0.5%. Nkx6.1 was detected by immunostaining (Supplemental Table S1) and the proliferative marker EdU using the Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific). Secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Images were taken with an Axio Imager upright fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Cell counts and proliferation were determined as described above.

### **Flow cytometry**

At the end of treatment, islets were dispersed in accutase (1  $\mu$ l/islet; Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA) for 10 min at 37°C and dead cells labeled using the LIVE/DEAD™ Aqua (405 nm) Dead Cell Stain Kit (BD Biosciences, San Jose, CA). EdU detection, using the Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit, and immunostaining was performed according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Fluorophore-coupled primary antibodies and dilutions are listed in Supplemental Table S1. Flow cytometric analysis was carried out using a LSRIIB flow cytometer with FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA). Dead-cell stain, EdU, c-peptide (CPEP), glucagon (GCG) and cytokeratin 19 (CK19) labelled cells were detected using the 405-, 488-, 640- and 561-nm lasers coupled with 525/50-, 530/30-, 670/14- and 586/15-nm BP filters, respectively. Proliferation was calculated as the percentage of double-positive EdU+ and CPEP+, GCG+, CK19+ or CPEP-/GCG- cells over the corresponding total cell population. At least 2,000 CPEP+, GCG+, CK19+ and CPEP-/GCG- cells were counted in each sample.

## **Statistical analyses**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significance was tested using one-way ANOVA with Dunnett post hoc test using GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA).  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

As the majority of previous studies describe the effects of mitogens in human  $\beta$ -cell proliferation in dispersed islet cultures (17-19; 21; 23-26) we began by attempting to reproduce these findings. Following recovery, human islets were dispersed, plated and exposed to harmine (10  $\mu$ M), high glucose (16.7 mM) or HB-EGF (100 ng/ml) for 3 days. At the end of the treatment cells were stained for Nkx6.1 and EdU (Fig. 1). Harmine exposure led to a significant increase in  $\beta$ -cell proliferation compared to vehicle in 5/6 donors (mean responder change between harmine and vehicle condition  $\Delta=0.22\%\pm 0.07$ ) (Fig. 1A & B). In contrast, glucose was a poor inducer with only 2/6 donors responding (Fig. 1C & D). HB-EGF increased  $\beta$ -cell proliferation in 5/6 donors (mean responder  $\Delta=0.14\%\pm 0.03$ ) (Fig. 1E & F). Interestingly, we frequently observed Nkx6.1-negative, EdU-positive cells in the presence of harmine and HB-EGF (Fig. 1A and E) suggesting that non- $\beta$  cells may also respond to these mitogens.

As islet architecture and cell-to-cell contact may contribute to the capacity of  $\beta$  cells to proliferate (27), we exposed intact human islets to harmine, glucose or HB-EGF and assessed  $\beta$ -cell proliferation in cryosections by immunohistochemistry for Nkx6.1 and EdU (Fig. 2). Harmine increased  $\beta$ -cell proliferation in 2/4 donors (Fig. 2A & B). In contrast to the results in dispersed islets, 5/6 donors responded to glucose (mean responder  $\Delta=0.26\%\pm 0.08$ ) (Fig. 2A & C), whereas only 1/5 donors responded to HB-EGF (Fig. 2A & D). As many proliferating cells in response to these mitogens were non- $\beta$  cells we also quantified proliferation in the Nkx6.1-negative population. In the basal condition (2.8 mM glucose) the mean percentage of EdU-positive/Nkx6.1-negative cells of the 6 donors was  $1.1\%\pm 0.3$  (Fig. 2A & C, right panel). Harmine exposure led to a dramatic increase in Nkx6.1-negative cell proliferation in 4/4 donors (mean responder  $\Delta=4.0\%\pm 0.3$ ) (Fig. 2A & B, right panel). Glucose was weakly active, increasing proliferation in only 2/6 donors (Fig. 2A & C, right panel). HB-EGF stimulated proliferation in 3/5 donors (mean responder  $\Delta=0.9\%\pm 0.2$ ) (Fig. 2A & D, right panel).

We then exposed intact human islets to mitogens and assessed islet cell proliferation by flow cytometry using EdU and immunostaining for C-peptide (CPEP;  $\beta$  cells), glucagon (GCG;  $\alpha$  cells) and CK19 (Fig. 3A). The mean proportion of  $\beta$  and  $\alpha$  cells in the donor islet batches was  $18\%\pm 4$

and  $36\% \pm 7$ , respectively, whereas GCG- and CPEP-negative cells represented the remaining  $46\% \pm 6$  (Fig. 3B). In general we observed that  $\beta$ -cell proliferation was very low relative to the proliferation levels detected in  $\alpha$  cells, GCG- and CPEP-negative cells and CK19-positive cells in both control and stimulated conditions (Fig. 3C-E; left panels). Harmine induced  $\beta$ -cell proliferation in 4/4 donors (mean  $\Delta = 0.10\% \pm 0.03$ ) (Fig. 3C). In contrast, harmine was a potent mitogen for  $\alpha$  cells and GCG- and CPEP-negative cells in 4/4 donors ( $\alpha$  cells: mean  $\Delta = 3.48\% \pm 1.51$ , GCG- and CPEP-negative cells: mean  $\Delta = 2.74\% \pm 1.27$ ). Glucose did not promote  $\beta$ -cell proliferation in any of the 8 donors tested (Fig. 3D). Furthermore, unlike harmine glucose was ineffective as a mitogen for  $\alpha$  cells and GCG- and CPEP-negative cells (Fig. 3D; left panel). HB-EGF increased  $\beta$ -cell proliferation in 7/11 donors (mean responder  $\Delta = 0.22\% \pm 0.06$ ) (Fig. 3E). Although HB-EGF was inactive on  $\alpha$  cells, 11/11 donor GCG- and CPEP-negative cells and 3/3 donor CK19-positive cells responded strongly to HB-EGF (GCG- and CPEP-negative cells: mean  $\Delta = 4.9\% \pm 1.7$ , CK19-positive cells: mean  $\Delta = 34\% \pm 1.2$ ) (Fig. 3E; left panel).

## DISCUSSION

In this study we evaluated the capacity of harmine, glucose and HB-EGF to promote  $\beta$ -cell proliferation in isolated human islets using a multi-faceted approach involving intact and dispersed islet cultures, flow cytometry and immunohisto/cytochemistry and multiple cell type-specific markers. Our data indicate that human  $\beta$  cells respond variably and generally poorly to these mitogens. Nevertheless, an increase in  $\beta$ -cell proliferation was detected in the majority of islet batches in response to harmine and HB-EGF irrespective of the assay used, whereas the response to glucose was assay-dependent. The abundance of proliferating non- $\beta$  cells in human islet batches prompted us to assess the effects of these mitogens on  $\alpha$  cells, CPEP/GCG-negative cells and CK19-positive cells by flow cytometry. Unlike the  $\beta$  cell response, harmine potently increased the proliferation of  $\alpha$  cells whereas HB-EGF principally stimulated CPEP/GCG-negative and CK19-positive cell proliferation.

We recently demonstrated that the EGF receptor ligand HB-EGF exerts mitogenic activity on the human  $\beta$  cell (22). In the present study we substantiated these findings by showing that  $\beta$  cells proliferate in response to HB-EGF in the majority of human islet batches in both intact and dispersed islet assays. Although  $\alpha$  cells were only weakly responsive to HB-EGF, CPEP/GCG-negative cells and CK19-positive duct cells were highly responsive to the mitogenic effects of HB-EGF. In agreement with these findings, the EGFR is expressed in endocrine  $\beta$  and  $\alpha$  cells and exocrine ducts cells in the adult human pancreas (28; 29). Furthermore, duct cells constitute a neogenic source of  $\beta$  cells in rodents and humans (30) that are also responsive to EGFR ligands. In mice, adenoviral transduction of HB-EGF leads to duct cell proliferation and differentiation into insulin-positive cells (31). In humans, duct cells proliferate in response to EGF and the related ligand betacellulin (29) and the combination of EGF and gastrin promotes duct cell expansion and differentiation into Pdx-1/insulin-positive  $\beta$  cells (32). Hence, the proliferating  $\beta$  cells detected in the presence of HB-EGF in this study could potentially arise from replication of existing  $\beta$  cells and/or through  $\beta$ -cell neogenesis from proliferating duct cells.

We observed that the DYRK1A inhibitor harmine is a relatively weak inducer of human  $\beta$ -cell proliferation. Similarly, Aamodt et al. detected 0.3% Ki67-positive  $\beta$  cells in response to harmine



in dispersed islets (33). In contrast, a number of studies describe a considerably higher level of human  $\beta$ -cell proliferation induced by harmine. By exposing dispersed islets to a range of concentrations of harmine, Shen et al., observed up to 5-10% EdU-positive  $\beta$  cells (24). Likewise, using BrdU or Ki67 to mark dividing cells, harmine variably increased the proliferation of  $\beta$  cells between 0.5-5% in dispersed human islets (21; 25). Furthermore, using EdU to detect proliferating  $\beta$  cells in dispersed human islets Dirice et al. observed approximately 2.5%  $\beta$ -cell proliferation in the presence of harmine (19). Overall, the level of human  $\beta$ -cell proliferation induced by harmine is highly variable. Although these differences may be due to a lack of robustness of the human  $\beta$  cell proliferation assay, it is noteworthy that harmine promotes  $\beta$  cell proliferation in a narrow concentration range (25). Imprecise dosing of harmine may in part account for these differences.

Our observation that harmine preferentially increased proliferation of non- $\beta$  cells such as  $\alpha$  cells and CK19-positive duct cells in human islet batches is supported by several studies. First, DYRK1A signaling is ubiquitous and exocrine duct cells and endocrine  $\alpha$  and  $\delta$  cells proliferate in response to the combined inhibition of DYRK1A and TGF $\beta$  signaling (21). Second, the DYRK1A inhibitor 5-IT, a  $\beta$ -cell mitogen, also promotes  $\alpha$ -cell proliferation (19). Finally, using single cell mass cytometry to measure Ki67-positive endocrine cell types following culture of intact human islets exposed to harmine, Wang et al. (20) found that  $\alpha$  cells are considerably more responsive than  $\beta$  cells to the mitogenic effects of harmine.

We found that the capacity of glucose to increase human  $\beta$ -cell proliferation was dependent on the assay used; in dispersed islets glucose was weakly active, whereas in intact islets glucose increased  $\beta$ -cell proliferation as assessed by immunohistochemistry. cell proliferation as assessed by immunohistochemistry but not by flow cytometry. In line with these results we previously showed that glucose stimulates human  $\beta$ -cell proliferation in intact islets as measured by immunostaining for insulin and Ki67 (34). The discrepancy between our immunohistochemical and flow cytometric data from intact islet assays may be a consequence of the stringent criteria we applied to score  $\beta$  cells by flow cytometry due to the abundance of proliferating non- $\beta$  cell types. Nevertheless, previous studies also diverge with regard to the mitogenic effect of glucose on human  $\beta$  cells. Glucose (15-20 mM) increased  $\beta$ -cell proliferation as high as 2% (approximately 2-fold over basal) in dispersed human islets using insulin and Ki67 or BrdU staining (17; 18; 23;

26; 35). In contrast, using a similar approach Aamodt et al. (33) reported the complete absence of a proliferative response to glucose. Variability in the potency of glucose as a human  $\beta$ -cell mitogen has also been observed in vivo. Transplantation of human islets into streptozotocin-induced diabetic NOD-severe combined immunodeficient mice revealed a correlation between glucose levels and  $\beta$ -cell proliferation following glucose infusion (16). Similarly, transplantation of human islets into spontaneously diabetic immunodeficient NOD-Rag1null IL2r $\gamma$ null Ins2Akita mice was used to show that  $\beta$ -cell proliferation positively correlates with glucose levels (36). Yet, when human islets were transplanted into NSG-DT mice, a model of hyperglycemia, no increase in  $\beta$ -cell proliferation was detected (37). In light of the ex vivo human islet data, we speculate that the major effect of glucose on human  $\beta$ -cell proliferation in vivo may be indirect, whereas the direct effects of glucose, in striking contrast to the mouse  $\beta$  cell (9; 10; 18; 38), may be relatively minor.

In conclusion, our data suggest that harmine and HB-EGF are consistent but weak inducers of human  $\beta$ -cell proliferation, whereas the glucose response is highly variable and assay-dependent. Discrepancies between the present data and previously published studies point to the sensitivity of human  $\beta$  cells to the culture conditions, for example using dispersed or intact islets, but also the need for careful labeling and scoring of proliferating  $\beta$  cells. In particular, the abundance of non- $\beta$ -cell types in human islet batches and the low level of  $\beta$ -cell proliferation compared to non- $\beta$  cells could lead to the mis-identification of some proliferating cells as  $\beta$  cells by immunohistochemistry. Importantly, we note that non- $\beta$  cell types are rarely scored in human islet cell proliferation assays yet human islet batches contain a multitude of diverse cell types including other endocrine cells but also exocrine duct and acinar as well as endothelial, immune and stellate cells (39). Overall, we propose based on our experience that flow cytometry is more reliable than and provides several advantages over immunohistochemistry to assess  $\beta$ -cell proliferation in isolated human islets. First, it eliminates the subjectivity of visually scoring cells. Second, far higher cell counts can be easily and much more rapidly achieved increasing confidence in the data. Finally, multiple markers for  $\beta$  cells (INS, CPEP, Nkx6.1) and proliferating cells (EdU, Ki67, phospho-histone H3) as well as endocrine, exocrine and other cell types can be stained simultaneously or in parallel to enhance the robustness of the conclusions and assess the relative efficacy of potential  $\beta$ -cell mitogens on several islet cell populations.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the National Institutes of Health (grant R01-DK-58096 to V.P.) and the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP 77686 to V.P.). H.M. was supported by a doctoral studentship from the Fonds de Recherche Québec - Santé. V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic  $\beta$  Cell Function.

H.M., J.G. and C.T. designed the experiments and acquired the data. J.G., H.M. and V.P. researched the data, analyzed the results, and wrote the manuscript. 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.

## REFERENCES

1. Kahn SE: The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 2000;108 Suppl 6a:2s-8s.
2. Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, Yin C, Holzenberger M, Stoffel M, Kulkarni RN: Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8977-8982.
3. Park S, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, White MF: Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function. *J Biol Chem* 2006;281:1159-1168.
4. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, German MS: Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* 2010;16:804-808.
5. Hakonen E, Ustinov J, Mathijs I, Palgi J, Bouwens L, Miettinen PJ, Otonkoski T: Epidermal growth factor (EGF)-receptor signalling is needed for murine beta cell mass expansion in response to high-fat diet and pregnancy but not after pancreatic duct ligation. *Diabetologia* 2011;54:1735-1743.
6. Kondegowda NG, Fenutria R, Pollack IR, Orthofer M, Garcia-Ocana A, Penninger JM, Vasavada RC: Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Pathway. *Cell Metab* 2015;22:77-85.
7. El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, Hu J, Zhou JY, Shirakawa J, Hou L, Goodman J, Karampelias C, Qiang G, Boucher J, Martinez R, Gritsenko MA, De Jesus DF, Kahraman S, Bhatt S, Smith RD, Beer HD, Jungtrakoon P, Gong Y, Goldfine AB, Liew CW, Doria A, Andersson O, Qian WJ, Remold-O'Donnell E, Kulkarni RN: SerpinB1 Promotes Pancreatic beta Cell Proliferation. *Cell Metab* 2016;23:194-205.
8. Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, Scott DK, Kim SK, O'Donnell CP, Garcia-Ocana A: Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* 2007;56:1792-1801.

9. Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M, Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T: Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:246-257.
10. Porat S, Weinberg-Corem N, Tornovsky-Babaey S, Schyr-Ben-Haroush R, Hija A, Stolovich-Rain M, Dadon D, Granot Z, Ben-Hur V, White P, Girard CA, Karni R, Kaestner KH, Ashcroft FM, Magnuson MA, Saada A, Grimsby J, Glaser B, Dor Y: Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab* 2011;13:440-449.
11. Stamateris RE, Sharma RB, Hollern DA, Alonso LC: Adaptive beta-cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E149-159.
12. 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.
13. Kulkarni RN, Mizrachi EB, Ocana AG, Stewart AF: Human beta-cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map. *Diabetes* 2012;61:2205-2213.
14. Bernal-Mizrachi E, Kulkarni RN, Scott DK, Mauvais-Jarvis F, Stewart AF, Garcia-Ocana A: Human beta-cell proliferation and intracellular signaling part 2: still driving in the dark without a road map. *Diabetes* 2014;63:819-831.
15. Stewart AF, Hussain MA, Garcia-Ocana A, Vasavada RC, Bhushan A, Bernal-Mizrachi E, Kulkarni RN: Human beta-cell proliferation and intracellular signaling: part 3. *Diabetes* 2015;64:1872-1885.
16. Levitt HE, Cyphert TJ, Pascoe JL, Hollern DA, Abraham N, Lundell RJ, Rosa T, Romano LC, Zou B, O'Donnell CP, Stewart AF, Garcia-Ocana A, Alonso LC: Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Diabetologia* 2011;54:572-582.

17. Lakshmipathi J, Alvarez-Perez JC, Rosselot C, Casinelli GP, Stamateris RE, Rausell-Palamos F, O'Donnell CP, Vasavada RC, Scott DK, Alonso LC, Garcia-Ocana A: PKCzeta Is Essential for Pancreatic beta-Cell Replication During Insulin Resistance by Regulating mTOR and Cyclin-D2. *Diabetes* 2016;65:1283-1296.
18. Stamateris RE, Sharma RB, Kong Y, Ebrahimpour P, Panday D, Ranganath P, Zou B, Levitt H, Parambil NA, O'Donnell CP, Garcia-Ocana A, Alonso LC: Glucose Induces Mouse beta-Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor. *Diabetes* 2016;65:981-995.
19. Dirice E, Walpita D, Vetere A, Meier BC, Kahraman S, Hu J, Dancik V, Burns SM, Gilbert TJ, Olson DE, Clemons PA, Kulkarni RN, Wagner BK: Inhibition of DYRK1A Stimulates Human beta-Cell Proliferation. *Diabetes* 2016;65:1660-1671.
20. Wang YJ, Golson ML, Schug J, Traum D, Liu C, Vivek K, Dorrell C, Naji A, Powers AC, Chang KM, Grompe M, Kaestner KH: Single-Cell Mass Cytometry Analysis of the Human Endocrine Pancreas. *Cell Metab* 2016;24:616-626.
21. Wang P, Karakose E, Liu H, Swartz E, Ackeifi C, Zlatanovic V, Wilson J, Gonzalez BJ, Bender A, Takane KK, Ye L, Harb G, Pagliuca F, Homann D, Egli D, Argmann C, Scott DK, Garcia-Ocana A, Stewart AF: Combined Inhibition of DYRK1A, SMAD, and Trithorax Pathways Synergizes to Induce Robust Replication in Adult Human Beta Cells. *Cell Metab* 2019;29:638-652.e635.
22. Maachi H, Fergusson G, Ethier M, Brill GN, Katz LS, Honig LB, Metukuri MR, Scott DK, Ghislain J, Poitout V: HB-EGF Signaling is Required for Glucose-Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation in Rats. *bioRxiv* 2019:683003.
23. Metukuri MR, Zhang P, Basantani MK, Chin C, Stamateris RE, Alonso LC, Takane KK, Gramignoli R, Strom SC, O'Doherty RM, Stewart AF, Vasavada RC, Garcia-Ocana A, Scott DK: ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes* 2012;61:2004-2015.
24. Shen W, Taylor B, Jin Q, Nguyen-Tran V, Meeusen S, Zhang YQ, Kamireddy A, Swafford A, Powers AF, Walker J, Lamb J, Bursalaya B, DiDonato M, Harb G, Qiu M, Filippi CM, Deaton L, Turk CN, Suarez-Pinzon WL, Liu Y, Hao X, Mo T, Yan S, Li J, Herman AE, Hering BJ, Wu T, Martin Seidel

H, McNamara P, Glynn R, Laffitte B: Inhibition of DYRK1A and GSK3B induces human beta-cell proliferation. *Nat Commun* 2015;6:8372.

25. Wang P, Alvarez-Perez JC, Felsenfeld DP, Liu H, Sivendran S, Bender A, Kumar A, Sanchez R, Scott DK, Garcia-Ocana A, Stewart AF: A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication. *Nat Med* 2015;21:383-388.

26. Kumar A, Katz LS, Schulz AM, Kim M, Honig LB, Li L, Davenport B, Homann D, Garcia-Ocana A, Herman MA, Haynes CM, Chipuk JE, Scott DK: Activation of Nrf2 Is Required for Normal and ChREBPalpha-Augmented Glucose-Stimulated beta-Cell Proliferation. *Diabetes* 2018;67:1561-1575.

27. Aamodt KI, Powers AC: Signals in the pancreatic islet microenvironment influence  $\beta$ -cell proliferation. *Diabetes, obesity & metabolism* 2017;19 Suppl 1:124-136.

28. Miyagawa J, Hanafusa O, Sasada R, Yamamoto K, Igarashi K, Yamamori K, Seno M, Tada H, Nammo T, Li M, Yamagata K, Nakajima H, Namba M, Kuwajima M, Matsuzawa Y: Immunohistochemical localization of betacellulin, a new member of the EGF family, in normal human pancreas and islet tumor cells. *Endocr J* 1999;46:755-764.

29. Rescan C, Le Bras S, Lefebvre VH, Frandsen U, Klein T, Foschi M, Pipeleers DG, Scharfmann R, Madsen OD, Heimberg H: EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade. *Lab Invest* 2005;85:65-74.

30. Dirice E, De Jesus DF, Kahraman S, Basile G, Ng RW, El Ouaamari A, Teo AKK, Bhatt S, Hu J, Kulkarni RN: Human duct cells contribute to  $\beta$  cell compensation in insulin resistance. *JCI insight* 2019;4:e99576.

31. Kozawa J, Tokui Y, Moriwaki M, Li M, Ohmoto H, Yuan M, Zhang J, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Tochino Y, Shimomura I, Higashiyama S, Miyagawa J: Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector. *Pancreas* 2005;31:32-42.

32. Suarez-Pinzon WL, Lakey JR, Brand SJ, Rabinovitch A: Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin induces neogenesis of human islet  $\beta$ -cells from pancreatic duct cells and an increase in functional  $\beta$ -cell mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3401-3409.
33. Aamodt KI, Aramandla R, Brown JJ, Fiaschi-Taesch N, Wang P, Stewart AF, Brissova M, Powers AC: Development of a reliable automated screening system to identify small molecules and biologics that promote human  $\beta$ -cell regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016;311:E859-e868.
34. Vivot K, Moulle VS, Zarrouki B, Tremblay C, Mancini AD, Maachi H, Ghislain J, Poitout V: The regulator of G-protein signaling RGS16 promotes insulin secretion and  $\beta$ -cell proliferation in rodent and human islets. *Mol Metab* 2016;5:988-996.
35. Sharma RB, O'Donnell AC, Stamateris RE, Ha B, McCloskey KM, Reynolds PR, Arvan P, Alonso LC: Insulin demand regulates  $\beta$  cell number via the unfolded protein response. *J Clin Invest* 2015;125:3831-3846.
36. Diiorio P, Jurczyk A, Yang C, Racki WJ, Brehm MA, Atkinson MA, Powers AC, Shultz LD, Greiner DL, Bortell R: Hyperglycemia-induced proliferation of adult human  $\beta$  cells engrafted into spontaneously diabetic immunodeficient NOD-Rag1null IL2rgammanull Ins2Akita mice. *Pancreas* 2011;40:1147-1149.
37. Dai C, Kayton NS, Shostak A, Poffenberger G, Cyphert HA, Aramandla R, Thompson C, Papagiannis IG, Emfinger C, Shiota M, Stafford JM, Greiner DL, Herrera PL, Shultz LD, Stein R, Powers AC: Stress-impaired transcription factor expression and insulin secretion in transplanted human islets. *J Clin Invest* 2016;126:1857-1870.
38. Salpeter SJ, Klochendler A, Weinberg-Corem N, Porat S, Granot Z, Shapiro AM, Magnuson MA, Eden A, Grimsby J, Glaser B, Dor Y: Glucose regulates cyclin D2 expression in quiescent and replicating pancreatic  $\beta$ -cells through glycolysis and calcium channels. *Endocrinology* 2011;152:2589-2598.
39. Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson E-M, Andréasson A-C, Sun X, Picelli S, Sabirsh A, Clausen M, Bjursell MK, Smith DM, Kasper M, Ämmälä C, Sandberg R: Single-Cell



Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell metabolism* 2016;24:593-607.

## FIGURE LEGENDS

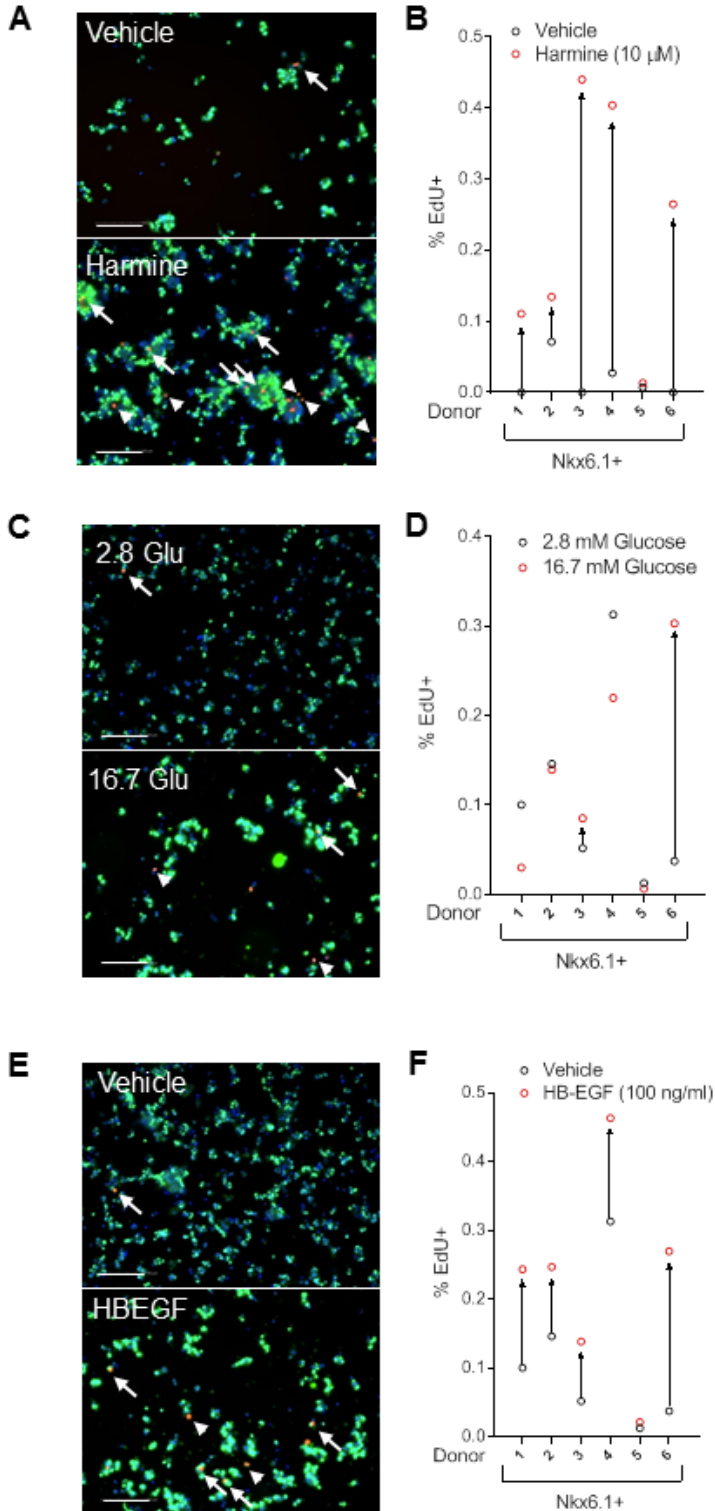
**Figure 1. Analysis of  $\beta$ -cell proliferation in mitogen-stimulated dispersed human islets by immunocytochemistry.** (A-F) Dispersed human islets were exposed to 5.5 mM glucose (Vehicle, A and B), 2.8 mM glucose (Vehicle or 2.8 Glu, C-F), harmine (10  $\mu$ M) (A and B), 16.7 mM glucose (16.7 Glu, C and D) and HB-EGF (100 ng/ml) (E and F) for 72 h. EdU (10  $\mu$ M) was added throughout. Proliferation was assessed by EdU staining and Nkx6.1 to mark  $\beta$  cells. Representative images of Nkx6.1 (green), EdU (red) and nuclei (blue) staining are shown (A, C and E). Arrows and arrowheads highlight EdU+/Nkx6.1+ and EdU+/Nkx6.1- cells, respectively. Scale bar, 50  $\mu$ m. A minimum of 1,500 Nkx6.1+ cells were counted to assess proliferation by EdU incorporation. Proliferation is presented as the percentage of EdU+/Nkx6.1+ cells over the total Nkx6.1+ cells. Donor identifiers (Table 1) are indicated. The 2.8 mM glucose (C and D) and vehicle (E and F) conditions are identical for each donor.

**Figure 2. Analysis of  $\beta$ -cell proliferation in mitogen-stimulated intact human islets by immunohistochemistry.** (A-D) Intact human islets were exposed to 2.8 mM glucose (A-D), harmine (10  $\mu$ M) (A and B), 16.7 mM glucose (A and C) and HB-EGF (100 ng/ml) (A and D) for 72 h. EdU (10  $\mu$ M) was added throughout. Proliferation was assessed by EdU staining and Nkx6.1 to mark  $\beta$  cells. Representative images of Nkx6.1 (green), EdU (red) and nuclei (blue) staining are shown (A). Arrows and arrowheads highlight EdU+/Nkx6.1+ and EdU+/Nkx6.1- cells, respectively. Scale bar, 50  $\mu$ m. A minimum of 1,500 Nkx6.1+ and Nkx6.1- cells were counted to assess proliferation by EdU incorporation. Proliferation is presented as the percentage of EdU+/Nkx6.1+ over the total Nkx6.1+ cells (left panels) or EdU+/Nkx6.1- cells over the total Nkx6.1- cells (right panels). Donor identifiers (Table 1) are indicated. The vehicle and 2.8 mM glucose conditions are identical for each donor in all panels.

**Figure 3. Analysis of cell proliferation in mitogen-stimulated intact human islets by flow cytometry.** (A-E) Intact human islets were exposed to 2.8 mM glucose (B-E), harmine (10  $\mu$ M) (C), 16.7 mM glucose (D) and HB-EGF (100 ng/ml) (E) for 72 h. EdU (10  $\mu$ M) was added throughout. At the end of the treatment islets were dispersed into single cells and analyzed by flow cytometry for viability, C-peptide (CPEP), glucagon (GCG), cytokeratin 19 (CK19) and EdU (A). The

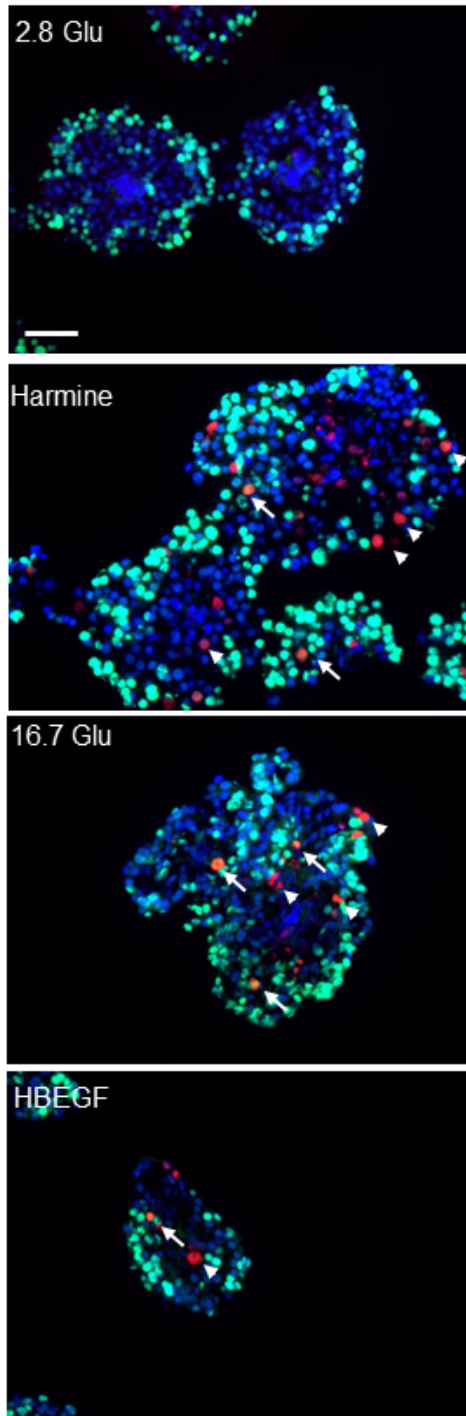
proportions of CPEP+, GCG+ and GCG-/CPEP- cells for each donor are shown (B). A minimum of 2,000 CPEP+, GCG+, CK19+ or GCG-/CPEP- cells were counted to assess proliferation by EdU incorporation. Proliferation is presented as the percentage of EdU+ cells over the total cells of each cell type. Donor identifiers (Table 1) are indicated. Data for the CPEP+ cells are replicated in the panels on the right to highlight the proliferative responses. The vehicle and 2.8 mM glucose conditions are identical for each donor in all panels.

**Figure 1**

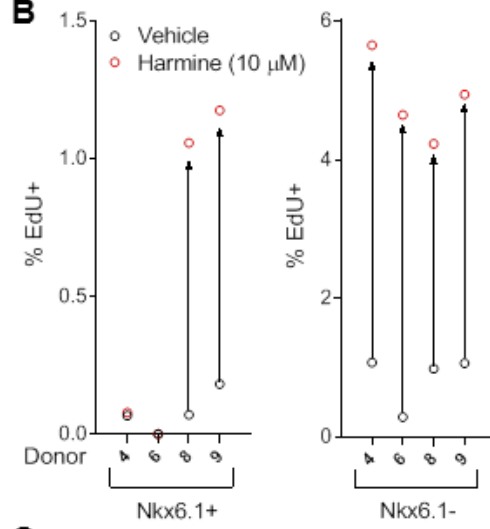


**Figure 2**

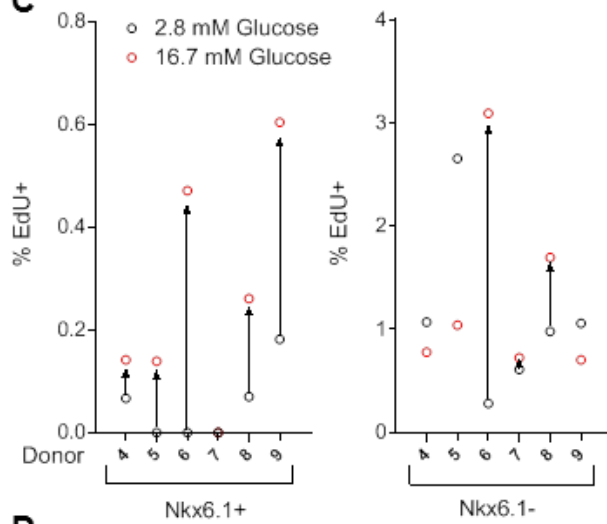
**A**



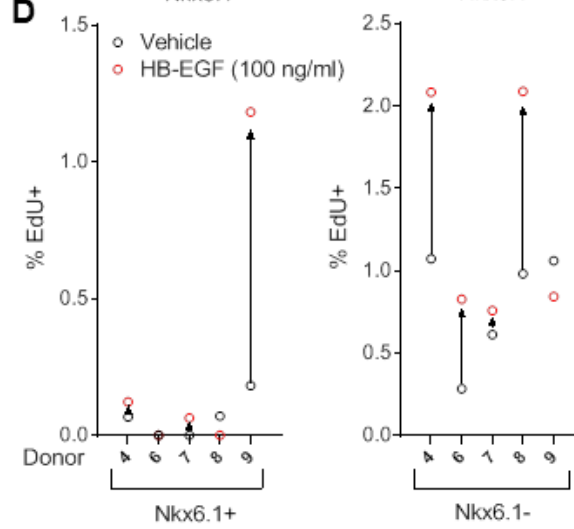
**B**

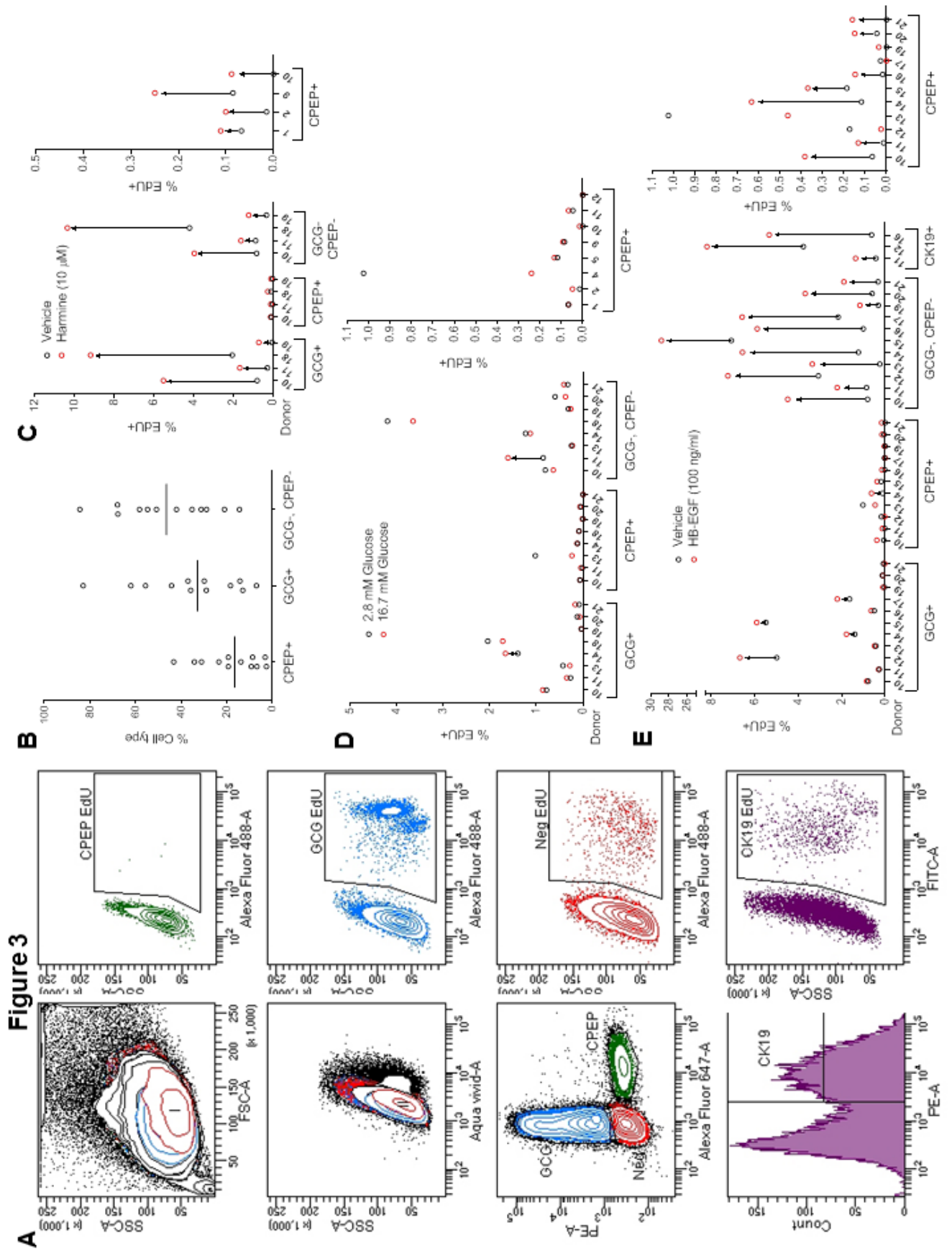


**C**



**D**





**Supplemental Table S1** Source of antibodies used in study.

| Antibody   | Dilution/Concentration | Company        | Cat #      |
|--|------------------------|----------------|------------|
| <b>Immunohistochemistry/<br/>Immunocytochemistry</b> |                        |                |            |
| Rabbit polyclonal<br>Nkx6.1                          | 1:100                  | Novus          | NBP1-82553 |
| <b>Flow cytometry</b>                                |                        |                |            |
| Alexa Fluor® 647<br>Mouse Anti-C-Peptide             | 1:50                   | BD Biosciences | 565831     |
| PE Mouse Anti-<br>Glucagon                           | 1:50                   | BD Biosciences | 565860     |
| Anti-Cytokeratin 19<br>[RCK108]                      | 1:250                  | Abcam          | ab9221     |

|                                      | 1  | 2  | 3                                  | 4                                  | 5                                  | 6  | 7                                  | 8                          | 9  | 10                         | 11                                 |
|--------------------------------------|--|--|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|------------------------------------|
| <b>Islet Preparation</b>             |  |  |                                    |                                    |                                    |  |                                    |                            |  |                            |                                    |
| Unique Identifier                    | R340   | SAMN12924398                                   | SAMN13027809                       | R346                               | SAMN13134368                       | R348   | R341                               | R344                       | SAMN11791244                                   | R301                       | SAMN10869303                       |
| Donor Age (years)                    | 36   | 38   | 43                                 | 27                                 | 62                                 | 43   | 42                                 | 59                         | 47   | 18.0                       | 25.0                               |
| Donor Sex (M/F)                      | M  | M  | F                                  | M                                  | M                                  | F  | M                                  | M                          | M  | M                          | M                                  |
| Donor BMI (kg/m <sup>3</sup> )       | 23.3   | 28.0   | 31.6                               | 24.1                               | 31.3                               | 16.4   | 30                                 | 27.8                       | 36.1   | 19                         | 27.7                               |
| Donor HbA1c                          | 5.3  | 5.4  | 5.7                                | 5.7                                | 5.5                                | 5.7  | Not Reported                       | 5.5                        | 5.7  | 5.0                        | 5.2                                |
| Origin/source of islets              | Alberta IsletCore                              | IIDP   | IIDP                               | Alberta IsletCore                  | IIDP                               | Alberta IsletCore                              | Alberta IsletCore                  | Alberta IsletCore          | IIDP   | Alberta IsletCore          | IIDP                               |
| Islet isolation center               | Alberta IsletCore                              | The Scharp-Lacy Research Institute             | The Scharp-Lacy Research Institute | Alberta IsletCore                  | The Scharp-Lacy Research Institute | Alberta IsletCore                              | Alberta IsletCore                  | Alberta IsletCore          | Southern California Islet Cell Resource Center | Alberta IsletCore          | The Scharp-Lacy Research Institute |
| Donor history of diabetes            | No   | No   | No                                 | No                                 | No                                 | No   | No                                 | No                         | No   | No                         | No                                 |
| Cause of death                       |  | Head trauma                                    | Anoxia                             |                                    | Cerebrovascular/str                | Cerebrovascular/str                            |                                    |                            | Cerebrovascular/str                            |                            | Anoxia                             |
| Warm ischemia time (h)               | Not Reported                                   | Not Reported                                   | 0.2                                | Not Reported                       | Not Reported                       | Not Reported                                   | Not Reported                       | Not Reported               | 0.3  | Not Reported               | 0.5                                |
| Cold ischemia time (h)               | 12.5   | 8.8  | 11.1                               | 12                                 | 10.2                               | 15.5   | 15.75                              | 11.5                       | 6.4  | 5                          | 8.4                                |
| Estimated purity (%)                 | 95   | 80   | 90                                 | 90                                 | 90                                 | 90   | 95                                 | 95                         | 95   | 75                         | 90                                 |
| Estimated viability (%)              | 95   | 95   | 95                                 | 95                                 | 95                                 | 95   | 95                                 | 95                         | 96   | 95                         | 95                                 |
| Total culture time(h)                | 40   | 90   | 210                                | 71                                 | 132                                | 56   | 60                                 | 66                         | 70   | 60                         | 61                                 |
| Glucose-stimulated insulin secretion | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 4.56                     | SI (G2.8mM- G28mM)= 1.8                        | SI (G2.8mM- G28mM)= 2.8            | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 6.17         | G28mM)= Not Reported               | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 1.63                     | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 9.81         | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 3.11 | SI (G2.8mM- G28mM)= 2.5                        | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 9.21 | SI (G2.8mM- G28mM)= 8.9            |
| Handpicked to purity                 | Partial  | Partial  | Partial                            | Partial                            | Partial                            | Partial  | Partial                            | Partial                    | Partial  | Partial                    | Partial                            |
| <b>Islet Preparation</b>             |  |  |                                    |                                    |                                    |  |                                    |                            |  |                            |                                    |
| Unique Identifier                    | SAMN10023853                                   | SAMN0962214                                    | SAMN09370567                       | SAMN10410585                       | H2182                              | SAMN0929594                                    | SAMN10516338                       | R305                       | R271   | SAMN09228907               |                                    |
| Donor Age (years)                    | 25.0   | 31.0   | 32.0                               | 38.0                               | 48.0                               | 51.0   | 52.0                               | 60.0                       | 60.0   | 62                         |                                    |
| Donor Sex (M/F)                      | F  | M  | M                                  | M                                  | F                                  | F  | F                                  | M                          | F  | M                          |                                    |
| Donor BMI (kg/m <sup>3</sup> )       | 33.5   | 31.8   | 28.5                               | 28.2                               | 38.5                               | 29.7   | 26.9                               | 21                         | 25.9   | 36.1                       |                                    |
| Donor HbA1c                          | 5.1  | 5.3  | 5.2                                | 5.9                                | 5.8                                | 5.8  | 4.5                                | 5.6                        | 5.5  | 5.8                        |                                    |
| Origin/source of islets              | Southern California Islet Cell Resource Center | Southern California Islet Cell Resource Center | IIDP                               | Alberta Islet lab                  | Alberta Islet lab                  | IIDP   | IIDP                               | Alberta IsletCore          | Alberta IsletCore                              | Alberta IsletCore          | IIDP                               |
| Islet isolation center               | Southern California Islet Cell Resource Center | Southern California Islet Cell Resource Center | University of Wisconsin            | The Scharp-Lacy Research Institute | Alberta Islet lab                  | Southern California Islet Cell Resource Center | The Scharp-Lacy Research Institute | Alberta IsletCore          | Alberta IsletCore                              | Alberta IsletCore          | The Scharp-Lacy Research Institute |
| Donor history of diabetes            | No   | No   | No                                 | No                                 | No                                 | No   | No                                 | No                         | No   | No                         | No                                 |
| Cause of death                       | Anoxia   | Head trauma                                    | Head trauma                        | Head trauma                        |                                    | Cerebrovascular/str                            | Cerebrovascular/str                |                            |  | Anoxia                     |                                    |
| Warm ischemia time (h)               | 0.1  | Not Reported                                   | 0.1                                | Not Reported                       | Not Reported                       | Not Reported                                   | Not Reported                       | Not Reported               | Not Reported                                   | Not Reported               | Not Reported                       |
| Cold ischemia time (h)               | 7.0  | 5.5  | 11.5                               | 7.3                                | 6.9                                | 6.3  | 6.3                                | 10                         | 13.5   | 10.7                       |                                    |
| Estimated purity (%)                 | 75   | 80   | 95                                 | 90                                 | 90                                 | 75   | 80                                 | 80                         | 95   | 90                         |                                    |
| Estimated viability (%)              | 96   | 95   | 91                                 | 95                                 | 94                                 | 94   | 95                                 | 95                         | 95   | 95                         |                                    |
| Total culture time(h)                | 54   | 66   | 67                                 | 56                                 | 65                                 | 52   | 88                                 | 64                         | 67   | 65                         |                                    |
| Glucose-stimulated insulin secretion | SI (G2.8mM- G28mM)= 0.7                        | SI (G2.8mM- G28mM)= 2.0                        | SI (G2.8mM- G28mM)= 1.8            | SI (G2.8mM- G28mM)= 6.6            | SI (G2.8mM- G28mM)= 2.1            | SI (G2.8mM- G28mM)= 6.5                        | SI (G2.8mM- G28mM)= 6.5            | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 1.29 | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 2.5                      | SI (G2.8mM- G16.7mM)= 4.98 | SI (G2.8mM- G28mM)= 3.9            |
| Handpicked to purity                 | Partial  | Partial  | Partial                            | Partial                            | Partial                            | Partial  | Partial                            | Partial                    | Partial  | Partial                    | Partial                            |



## **DISCUSSION**

# **1. La prolifération des cellules $\beta$ pancréatiques de rats en réponse au glucose requiert l'activation de la voie HB-EGF-EGFR**

## **1.1 Rappel des principaux résultats**

Les résultats présentés dans cet article démontrent que le glucose nécessite l'activation de la voie HB-EGF-EGFR pour induire la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques de rat. Traiter des îlots à l'aide du HB-EGF exogène stimule la prolifération des cellules  $\beta$  de rat et humaines. Bloquer la voie de signalisation HB-EGF-EGFR à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre le ligand HB-EGF ou le récepteur EGFR inhibe la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au glucose. Ces résultats ont été reproduits *ex vivo et in vivo* dans des îlots transplantés sous la capsule rénale de rats perfusés au glucose, à l'aide d'un ARN interférent qui entraîne la dégradation de l'ARNm d'HB-EGF et prévient donc sa synthèse. Nous avons ensuite examiné le mécanisme d'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR en réponse au glucose. Nous avons montré que le glucose stimule l'expression du gène codant pour HB-EGF en activant le facteur de transcription ChREBP, puis démontré que l'inhibition de la famille des protéines tyrosines kinases Src bloque la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au glucose, mais pas en réponse au HB-EGF. Src étant un membre de la famille des kinases qui transactivent l'EGFR via le clivage protéolytique de son ligand ; nous avons donc proposé un mécanisme selon lequel le glucose stimule la prolifération des cellules  $\beta$  via l'activation de la voie HB-EGF-EGFR à l'aide de ChREBP et de Src.

## **1.2 HB-EGF et la prolifération des cellules $\beta$**

Nos résultats sont en accord avec les travaux rapportés dans la littérature. La surexpression d'HB-EGF dans le canal pancréatique d'un modèle murin induit une expansion de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques qui se traduit par une amélioration de la tolérance au glucose (251). La surexpression d'un autre agoniste de l'EGFR, la BTC, a également conduit au même résultat (232). Dans ces deux modèles, l'expansion de la masse des cellules  $\beta$  a été associée à la réplication des cellules  $\beta$  existantes et à la néogénèse de nouvelles cellules  $\beta$  à partir de

cellules ductales. Paradoxalement, les souris transgéniques surexprimant HB-EGF spécifiquement dans les cellules  $\beta$  se caractérisent par une mauvaise ségrégation de leurs cellules acineuses et ductales dans le pancréas exocrine ainsi qu'une distribution altérée des cellules endocrines dans les îlots. Ces souris manifestent donc un défaut structural du parenchyme pancréatique, ainsi que de la fibrose et une sévère hyperglycémie (249). La différence majeure entre les deux modèles de surexpression est que dans le premier, ils ont infecté des souris adultes avec un adénovirus surexprimant HB-EGF spécifiquement dans les cellules ductales (232, 251). Alors que dans le deuxième, ils ont généré des souris transgéniques surexprimant HB-EGF dès la naissance. HB-EGF étant important à la différenciation et la croissance des cellules endocrines au cours du développement (264), sa surexpression précoce pourrait altérer sa fonction et expliquer le phénotype observé chez les souris transgéniques (249). Chez l'homme, l'action mitogène du HB-EGF a été associée au développement de nombreux cancer tels que le cancer du foie, du pancréas, de l'intestin et du sein (265). Ce qui soulève la question de savoir si la surexpression d'HB-EGF aurait un effet carcinogène. Les modèles de surexpression du HB-EGF n'ont pas rapporté d'évidence du développement de lésions cancéreuses (249, 251, 266). Nos travaux rapportent qu'une exposition aiguë (1h) ou chronique (24h) des îlots de rats au HB-EGF n'affecte pas la sécrétion d'insuline. Ceci pourrait s'expliquer par la brève durée du traitement puisque l'administration du HB-EGF ou de l'EGF, un autre agoniste de l'EGFR, combinés à la gastrine augmente la masse des cellules  $\beta$  améliorant ainsi la tolérance au glucose de rats rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine (267, 268). Donc l'HB-EGF permet de restaurer une masse fonctionnelle des cellules  $\beta$  pancréatiques.

HB-EGF peut se lier à la fois au récepteur ErbB1 (EGFR) et ErbB4 et induire respectivement la prolifération ou la migration cellulaire. Dans les îlots, ErbB4 est faiblement exprimé alors que l'EGFR est fortement exprimé (269). Nous avons donc considéré que HB-EGF signale principalement via l'EGFR. Le récepteur à l'EGF joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie glycémique. La délétion de ce récepteur dans un modèle murin se traduit par une diminution du taux de prolifération basale des cellules  $\beta$  (263). L'expression d'un mutant dominant négatif d'EGFR, dans un autre modèle murin, prévient l'expansion de la masse des cellules  $\beta$  en réponse à un stress métabolique tel que la gestation, un régime hyperlipidique

obésogène (237) ou une pancréatectomie partielle (263). De plus, des études de suivi de lignées « lineage tracing » ont démontré que dans certains modèles, l'activation de l'EGFR induit une transdifférenciation des cellules acineuses en cellules ductales (270) ainsi qu'une néogénèse des cellules  $\beta$  à partir des cellules du tissu exocrine (271). L'ensemble de ces études concorde avec nos travaux démontrant l'implication de l'EGFR dans les mécanismes de compensation des cellules  $\beta$  pancréatiques (187). Cependant, aucune d'entre elles ne propose un ligand endogène responsable de l'activation de l'EGFR dans un contexte de stress métabolique. Nos résultats identifient HB-EGF comme étant le ligand responsable de l'activation de cette voie de signalisation dans un contexte d'une résistance à l'insuline induite par un excès de glucose.

### **1.3 L'effet mitogène du glucose requiert l'activation de la voie HB-EGF-EGFR**

Le glucose est un important régulateur de l'expansion de la masse des cellules  $\beta$  en réponse à la résistance à l'insuline (195). À ce jour, nous savions que l'effet mitogène du glucose était médié par son métabolisme qui implique l'activation de la glucokinase, l'enzyme responsable de l'étape limitante de la glycolyse, et la dépolarisation membranaire (195). Le glucose nécessite également l'activation du facteur de transcription ChREBP qui augmente l'expression et l'activité des cyclines D2, A et E stimulant ainsi la prolifération des cellules  $\beta$  (272). Enfin, l'effet mitogène du glucose requiert l'activation d'IRS2 et de mTOR (206). Nos travaux démontrent que l'action mitogène du glucose nécessite également l'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR. Bloquer l'EGFR à l'aide du AG1478 ou l'HB-EGF à l'aide soit du CRM197, soit d'un ARN interférent contre HB-EGF, bloque complètement la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au glucose *ex vivo*. *In vivo*, des îlots infectés avec un ARN interférent contre HB-EGF puis transplantés sous la capsule rénale ne montrent aucune prolifération des cellules  $\beta$  en réponse à une perfusion de glucose. Le modèle de transplantation utilisé dans cette étude offre de nombreux avantages. Le premier étant l'absence de rejet du transplant due au fait que les rats lewis sont consanguins. Le second avantage est d'avoir un contrôle interne pour chaque animal, le pancréas endogène, dans lequel la perfusion de glucose stimule la prolifération des cellules  $\beta$ . Le dernier avantage consiste à avoir un second contrôle, les îlots infectés avec un

adénovirus témoin qui répondent également aux concentrations de glucose systémiques démontrant que les îlots transplantés sont viables et revascularisés.

Dans notre précédente étude, nous avons montré qu'une perfusion prolongée de glucose et d'acides gras (187) stimule l'expression d'HB-EGF. Nos résultats actuels suggèrent que l'augmentation de l'expression du gène codant pour HB-EGF est due, au moins en partie, à l'action directe du glucose. Nous montrons que le facteur de transcription ChREBP se lie à l'élément enhancer de la région 3' du gène codant pour HB-EGF pour stimuler son expression en réponse au glucose. Nous montrons également que l'inhibition de ChREBP atténue complètement l'expression de HB-EGF en réponse au glucose. Nos travaux sont d'ailleurs en adéquation avec ce qui a été rapporté récemment dans la littérature montrant que l'expression d'HB-EGF augmente avec le temps en réponse au glucose (273). En effet, l'expression d'HB-EGF est augmentée d'un facteur de 1.5 dans des îlots de rats exposés au glucose pendant une journée. Elle est augmentée d'un facteur de 1,7 après 2 jours, de 2 après 3 jours et de 3 après 4 jours de stimulation au glucose. De plus cette étude a montré que ChREBP contrôle l'expression d'HB-EGF et l'expression du gène codant pour le proto-oncogène c-MYC qui sont tous les deux impliqués dans la prolifération des cellules  $\beta$  (273). Les auteurs ont aussi observé que l'expression d'HB-EGF est augmentée dans des lignées cellulaires exprimant la forme active de ChREBP et diminuée dans des lignées cellulaires exprimant un dominant inactif de ChREBP (274). Bien que nos travaux et de nombreux autres suggèrent que l'activation de l'expression d'HB-EGF aurait un rôle bénéfique dans les cellules  $\beta$ , il est tout de même important de remarquer que l'augmentation de la concentration plasmatique d'HB-EGF est corrélée à l'obésité et aux maladies coronariennes (275). Davantage d'études sont donc nécessaires afin de déterminer le rôle systémique d'HB-EGF.

HB-EGF est synthétisé sous forme d'une protéine transmembranaire pro-HBEGF. Or l'effet biologique majeur du HB-EGF est médié par sa forme soluble, générée par clivage protéolytique par des métalloprotéinases (250). Dans les cellules mésangiales, le glucose stimule la transactivation de l'EGFR via la kinase c-Src. Le glucose, via un mécanisme non identifié encore, induit la phosphorylation de c-Src qui active à son tour les métalloprotéinases responsables du clivage du proHB-EGF. L'HB-EGF soluble signale alors via son récepteur EGFR (276). Une stimulation au glucose, de courte durée, des cellules sécrétrices d'insuline MIN6 et d'îlots

humains conduit à la phosphorylation de Yes, une protéine de la famille des kinases Src (277). Aussi, dans les cellules INS-1 le GLP-1 stimule la prolifération via la transactivation de l'EGFR. Le GLP-1 active la kinase c-Src qui active les métalloprotéinases responsables du clivage de la BTC. La BTC signale alors via l'EGFR (217). Nos travaux démontrent que l'inhibition des protéines tyrosine kinase de la famille Src bloque la prolifération en réponse au glucose sans affecter la prolifération induite par HB-EGF. Ceci suggère l'implication d'une protéine tyrosine kinase de la famille Src dans l'activation des métalloprotéinases qui clivent le pro-HBEGF libérant du HB-EGF soluble. L'HB-EGF signale alors de façon autocrine et/ou paracrine via son récepteur et stimule la réplication des cellules  $\beta$  pancréatiques de rats. Le modèle que nous proposons est schématisé sur la (Figure 8).

La kinase mTOR joue un rôle clé dans la prolifération des cellules  $\beta$  (278). L'inhibition de mTOR prévient l'effet mitogène du glucose (206). Dans la présente étude, nous montrons que l'inhibition de mTOR bloque à la fois la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au glucose et au HB-EGF. Nous montrons également que l'inhibition d'HB-EGF à l'aide du CRM197 bloque complètement la prolifération en réponse au glucose sans atténuer l'activité de mTOR, ce qui suggère l'existence d'une voie parallèle à mTOR émanant de l'EGFR qui est nécessaire à la prolifération des cellules  $\beta$ . En aval de l'EGFR, il existe un certain nombre d'effecteurs, notamment MAPK, PI3K/AKT (187) et IRS2 (279) qui pourraient contribuer à la réponse mitogène du HB-EGF (Figure 8).

En conclusion, cette première étude identifie la voie de signalisation HB-EGF-EGFR comme étant nécessaire à la prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au glucose. Elle propose également un mécanisme expliquant l'activation de cette voie de signalisation dans les îlots de rats. Des travaux supplémentaires restent à venir afin d'évaluer l'importance de cette voie de signalisation dans la pathophysiologie des cellules  $\beta$  humaines.

## **2. Importante prolifération des cellules non $\beta$ en réponse à plusieurs facteurs stimulant la prolifération des cellules $\beta$ humaines**

### **2.1 Rappel des principaux résultats**

Le deuxième volet de cette thèse a pour objectif d'identifier la méthode la plus appropriée pour étudier la prolifération des cellules  $\beta$  humaines. Nous avons comparé systématiquement la réplication des cellules  $\beta$  en réponse au glucose, à l'harmine ou au HB-EGF par immunohistochimie et cytométrie en flux, sur des îlots intacts ou dispersés. Nous avons d'abord observé que les cellules  $\beta$  prolifèrent modestement en réponse à l'harmine et au HB-EGF et ne prolifèrent pas en réponse au glucose par immunofluorescence sur des îlots dispersés. Toujours par immunofluorescence, mais sur des îlots intacts, nous avons observé que la prolifération des cellules  $\beta$  est augmentée en réponse au glucose alors qu'elle est peu ou pas augmentée en réponse à l'harmine et au HB-EGF respectivement. Nous avons également observé que c'est principalement la population de cellules non  $\beta$  qui prolifère en réponse à l'harmine, au glucose et au HB-EGF par immunofluorescence. Enfin, nos résultats de cytométrie en flux montrent que la prolifération des cellules  $\beta$  et non  $\beta$  augmente en réponse à l'harmine et au HB-EGF, mais pas en réponse au glucose. Ces résultats suggèrent que la méthode utilisée pour étudier la prolifération des cellules  $\beta$  humaines a un impact majeur sur les effets observés.

### **2.2 Prolifération en réponse à l'HB-EGF**

La première étude, présentée au début de cette thèse, démontre l'activité mitogène qu'exerce l'HB-EGF sur les cellules  $\beta$  humaines. Cette deuxième étude corrobore ces résultats en montrant, encore fois, que les cellules  $\beta$  prolifèrent en réponse au HB-EGF indépendamment de la méthode utilisée. Nous avons également démontré que des cellules négatives pour Nkx6.1, CPEP et GCG ainsi que les cellules ductales CK19 positives répondent à l'action mitogène qu'exerce l'HB-EGF. Ces résultats sont en accord avec les travaux de la littérature montrant que les cellules ductales d'îlots humains prolifèrent en réponse à l'EGF ou à la BTC (251). De plus, l'EGFR ciblé par ces ligands est exprimé dans les cellules endocrines  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que les cellules

exocrines ductales dans les îlots humains (280, 281). L'activation de ce récepteur est associée à la néogénèse des cellules  $\beta$  à partir des cellules ductales dans des îlots de rongeurs et humains (282). Enfin, la surexpression d'HB-EGF dans les cellules ductales d'un modèle murin entraîne la prolifération de ces cellules ainsi que leur différenciation en cellules insuline positives (251). Par conséquent, les cellules  $\beta$  qui prolifèrent en réponse à l'HB-EGF pourraient potentiellement provenir de la réplication de cellules  $\beta$  existantes et/ou de la néogénèse à partir des cellules ductales.

### **2.3 Prolifération en réponse à l'harmine**

L'harmine a été récemment identifiée comme étant un important mitogène des cellules  $\beta$  pancréatiques humaines. Cependant les taux de proliférations observés en réponse à l'harmine sont variables d'une étude à l'autre. Shen et coll. (283) rapportent un taux de prolifération de 5-10% mesuré à l'aide de l'incorporation de l'EdU dans les cellules  $\beta$  d'îlots dispersés alors que Dirice et coll. (223) observent une augmentation de seulement 2.5%. Wang et coll. (222, 226) rapportent, toujours sur des îlots dispersés, mais cette fois-ci à l'aide des marqueurs Brdu et Ki67, un taux de prolifération de 0,5 et 5%. En comparaison à ces études, nous avons observé un effet plus modeste de l'harmine sur la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques, en accord avec ceux décrits par Aamodt et coll. (284) (une augmentation de 0.3% de la prolifération des cellules  $\beta$  mesurée par Ki67 sur des îlots dispersés). Nous avons observé que l'harmine exerce un important effet mitogène sur des cellules non  $\beta$  tels que les cellules  $\alpha$  ou les cellules ductales. Ces observations concordent avec les travaux de Wang et coll. (285) qui ont rapporté que les cellules  $\alpha$  répondent davantage à l'harmine que les cellules  $\beta$ . De plus, le 5-IT, un inhibiteur de DYRK1A analogue de l'harmine, stimule également la prolifération des cellules  $\alpha$  (223). Dans l'ensemble, l'harmine exerce un effet mitogène sur les cellules  $\beta$  à des taux variables allant de très robustes à modestes. Cette large variabilité pourrait s'expliquer du moins en partie par la méthode de détection utilisée pour identifier les cellules  $\beta$ . En effet, l'harmine a un important effet mitogène sur les cellules  $\alpha$ . Or les îlots humains étant structurellement différents des îlots de rongeurs. La distribution aléatoire et presque aussi prépondérante des cellules  $\alpha$  que des cellules  $\beta$  au sein de l'îlot pourrait introduire un biais d'identification des cellules qui prolifèrent. D'où la nécessité



d'utiliser différentes méthodes et différents marqueurs pour identifier la prolifération des cellules  $\beta$  dans les îlots humains.

## **2.4 Prolifération en réponse au glucose**

Nos travaux montrent que la prolifération des cellules  $\beta$  et non  $\beta$  en réponse au glucose varie selon la méthode de détection utilisée et selon que les îlots soient intacts ou dispersés. L'immunofluorescence sur îlots intacts démontre une action mitogène du glucose sur l'ensemble des cellules de l'îlot. Cet effet est grandement diminué lorsque la prolifération est mesurée par immunofluorescence sur îlots dispersés, puis perdu lorsque la prolifération est mesurée par cytométrie en flux. La discordance dans la réponse proliférative au glucose ne peut pas être attribuée uniquement à une différence dans la sensibilité de détection des techniques utilisées. La comparaison de la prolifération entre les îlots intacts ou dispersés par immunofluorescence suggère que la structure des îlots est nécessaire à l'action mitogène du glucose. En effet, l'îlot offre un microenvironnement complexe dans lequel les cellules  $\beta$  peuvent interagir avec d'autres cellules endocrines, des cellules endothéliales vasculaires, la matrice extracellulaire, les projections neuronales et les cellules immunitaires (286). L'ensemble de ces interactions contribue au bon fonctionnement de ces cellules et favorise leur survie (287). Notamment, les interactions avec la matrice extracellulaire régulent la prolifération, la différenciation et la polarisation des cellules  $\beta$  (288-290). Les jonctions communicantes « Gap » formées principalement par les connexine 36 sont requises pour la maturation des cellules  $\beta$  (291). Les macrophages favorisent la régénération de ces cellules (284, 292, 293). Enfin, les molécules d'adhésion cellulaires sont nécessaires à la sécrétion d'insuline (294, 295). Donc, il ne serait pas surprenant de penser que l'action mitogène du glucose requière la structure de l'îlot pour stimuler la prolifération des cellules  $\beta$ . En cytométrie en flux, nous n'avons détecté aucune prolifération en réponse au glucose dans les cellules  $\beta$  et non  $\beta$  bien que les îlots ont été cultivés en étant intacts. Nous supposons que c'est principalement en raison des exigences rigoureuses de nos critères d'analyse que nos résultats de cytométrie en flux ne montrent pas de réponse proliférative en réponse au glucose.

La variabilité de la réponse proliférative des cellules  $\beta$  humaines au glucose a déjà été observée. De nombreuses études rapportent la réplique des cellules  $\beta$  en réponse à 15-20 mM glucose, mesuré par immunofluorescence sur des îlots dispersés à l'aide du marquage insuline identifiant les cellules  $\beta$  et ki67 ou Brdu identifiant les cellules en prolifération (206, 272, 296-298). Avec cette même méthode et ces mêmes marqueurs, Aamodt et coll. (284) n'ont pas observé de prolifération des cellules  $\beta$  en réponse au glucose. Des îlots humains transplantés dans des souris immunodéficientes NOD rendues diabétiques par traitement à la streptozotocine ont montré une corrélation entre la prolifération des cellules  $\beta$  et l'hyperglycémie après une perfusion de glucose (299). Cette corrélation a également été rapportée dans un autre modèle de transplantation d'îlots humains dans des souris immunodéficientes spontanément diabétiques (300). Pourtant, les îlots humains transplantés dans des souris NSG-DT, un modèle d'hyperglycémie, n'ont montré aucune augmentation de prolifération des cellules  $\beta$  (301). À la lumière de ces données, nous proposons que l'effet du glucose sur la prolifération des cellules  $\beta$  humaines se fait principalement de façon indirecte via l'activation d'autres voies de signalisations et qu'*ex vivo* la réponse proliférative est mineure et variable.

En résumé, nos résultats démontrent que l'harmine et l'HB-EGF exercent une action mitogène sur les cellules  $\beta$  et non  $\beta$ . Nous démontrons également que la réponse proliférative des îlots humains au glucose est variable et dépend de la méthode utilisée pour la mesurer. À la suite de ces travaux, nous considérons la cytométrie en flux plus fiable que l'immunofluorescence pour mesurer la prolifération des cellules  $\beta$  en raison des nombreux avantages qu'elle offre. Elle permet d'analyser un nombre plus important de cellules, plus facilement et plus rapidement que l'immunofluorescence, ce qui accroît la fiabilité des données. Par ailleurs, il est possible de combiner de nombreux marqueurs en une seule expérience, ce qui permet d'identifier chaque population de cellules qui prolifère en réponse à un stimulus. Enfin, elle élimine la subjectivité de l'observateur. Notre conclusion est donc que la cytométrie en flux est une technique plus robuste qui permet d'évaluer rapidement la prolifération des cellules  $\beta$  et non  $\beta$  pancréatiques humaines.

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Collectivement, les travaux présentés dans cette thèse identifient HB-EGF comme étant un important facteur mitogène des cellules  $\beta$  pancréatiques d'îlots de rats et humains. Ils soulignent également l'importance de l'activation de la voie de signalisation HB-EGF-EGFR-mTOR pour stimuler la réplication des cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse au glucose, et proposent un mécanisme selon lequel le glucose induit l'expression du HB-EGF via ChREBP et transactive l'EGFR via une protéine tyrosine kinase de la famille Src. Nos travaux soulignent également le défi d'étudier la prolifération des cellules  $\beta$  humaines en observant une variabilité de l'action mitogène du glucose en fonction de la technique utilisée. Enfin, en mesurant la prolifération par différentes méthodes, nous en sommes venus à la conclusion que la cytométrie en flux reste l'approche la plus appropriée pour étudier la réplication des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Cela dit, la voie de signalisation HB-EGF-EGFR a été identifiée dans un modèle de résistance à l'insuline induite par une perfusion de glucose et d'acides gras pendant 72H. Davantage de travaux sont nécessaires afin de valider l'importance de cette voie de signalisation dans d'autres modèles de compensation des cellules  $\beta$  ; en l'occurrence le modèle murin obèse diabétique db/db et un modèle où la résistance à l'insuline a été induite par un régime obésogène. Aussi, nos travaux se sont concentrés principalement sur le ligand HB-EGF, mais de nombreux autres ligands de cette même famille telle que l'EGF, la BTC, la neurogenine, l'epireguline ou TGF $\alpha$  pourraient être impliqués dans la compensation des cellules  $\beta$  en réponse à tout stress métabolique. Enfin, la question principale demeure l'identification de mécanismes impliqués dans la stimulation de la prolifération des cellules  $\beta$  humaines. Le rôle de cette voie de signalisation dans les cellules  $\beta$  humaines reste donc à être évalué.

## Références bibliographiques

1. Drake RL. Gray's anatomie pour les étudiants. Deuxième édition. ed. Vogl W, Mitchell AWM, Duparc F, Duparc J, Gray H, Drake RL, editors: Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson; 2010.
2. Wang X, Misawa R, Zielinski MC, Cowen P, Jo J, Periwal V, et al. Regional differences in islet distribution in the human pancreas--preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(6):e67454.
3. Dolensek J, Rupnik MS, Stozer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*. 2015;7(1):e1024405.
4. Elayat AA, el-Naggat MM, Tahir M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat*. 1995;186 ( Pt 3):629-37.
5. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets*. 2009;1(2):129-36.
6. Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*. 2010;2(3):135-45.
7. Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*. 2009;326(1):4-35.
8. Da Silva Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med*. 2018;7(3).
9. Menge BA, Schrader H, Breuer TG, Dabrowski Y, Uhl W, Schmidt WE, et al. Metabolic consequences of a 50% partial pancreatectomy in humans. *Diabetologia*. 2009;52(2):306-17.
10. Kendall DM, Sutherland DE, Najarian JS, Goetz FC, Robertson RP. Effects of hemipancreatectomy on insulin secretion and glucose tolerance in healthy humans. *N Engl J Med*. 1990;322(13):898-903.
11. Hellman B. The frequency distribution of the number and volume of the islets Langerhans in man. I. Studies on non-diabetic adults. *Acta Soc Med Ups*. 1959;64:432.
12. Alanentalo T, Asayesh A, Morrison H, Loren CE, Holmberg D, Sharpe J, et al. Tomographic molecular imaging and 3D quantification within adult mouse organs. *Nat Methods*. 2007;4(1):31-3.
13. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev*. 2018;98(1):117-214.
14. Ganong WF. Physiologie médicale. Québec: Québec : Presses de l'Université Laval; 2005.

15. Lundquist I, Ericson L.  $\beta$ -Adrenergic insulin release and adrenergic innervation of mouse pancreatic islets. *Cell Tissue Res.* 1978;193(1):73-85.
16. Thorens B. Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2014;16(S1):87-95.
17. Rodriguez-Diaz R, Caicedo A. Neural control of the endocrine pancreas. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2014;28(5):745-56.
18. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2334-9.
19. Bosco D, Armanet M, Morel P, Niclauss N, SgROI A, Muller YD, et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes.* 2010;59(5):1202-10.
20. Göpel S, Kanno T, Barg S, Galvanovskis J, Rorsman P. Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *The Journal of physiology.* 1999;521(3):717-28.
21. Olofsson CS, Göpel SO, Barg S, Galvanovskis J, Ma X, Salehi A, et al. Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflügers Archiv.* 2002;444(1-2):43-51.
22. Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2003;46(8):1029-45.
23. Tang J-G, Tsou C-L. The insulin A and B chains contain structural information for the formation of the native molecule. Studies with protein disulphide-isomerase. *Biochem J.* 1990;268(2):429-35.
24. Smith GD, Pangborn WA, Blessing RH. The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003;59(Pt 3):474-82.
25. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9(1):25-53.
26. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018;217(7):2273-89.
27. Meier JJ, Veldhuis JD, Butler PC. Pulsatile insulin secretion dictates systemic insulin delivery by regulating hepatic insulin extraction in humans. *Diabetes.* 2005;54(6):1649-56.
28. Stevenson R, Cherrington A, Steiner K. The relationship between plasma concentration and disappearance rate of immunoreactive insulin in the conscious dog. *Horm Metab Res.* 1985;17(11):551-3.

29. Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog Biophys Mol Biol.* 1989;54(2):87-143.
30. Henquin J-C, Ravier M, Nenquin M, Jonas J-C, Gilon P. Hierarchy of the  $\beta$ -cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(9):742-50.
31. Brun T, Maechler P. Beta-cell mitochondrial carriers and the diabetogenic stress response. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(10):2540-9.
32. Maechler P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379(1-2):12-8.
33. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e219.
34. Wang Z, Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 7):893-903.
35. Yau B, Hays L, Liang C, Laybutt DR, Thomas HE, Gunton JE, et al. A fluorescent timer reporter enables sorting of insulin secretory granules by age. *J Biol Chem.* 2020.
36. Walker JN, Ramracheya R, Zhang Q, Johnson PR, Braun M, Rorsman P. Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes Obes Metab.* 2011;13 Suppl 1:95-105.
37. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, Ellrichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes.* 2008;57(3):678-87.
38. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology.* 1992;130(3):1459-66.
39. Cerasi E, Ktorza A. [Anatomical and functional plasticity of pancreatic beta-cells and type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris).* 2007;23(10):885-94.
40. Ahren B, Thorsson O. Increased insulin sensitivity is associated with reduced insulin and glucagon secretion and increased insulin clearance in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(3):1264-70.
41. Moghetti P, Bacchi E, Brangani C, Dona S, Negri C. Metabolic Effects of Exercise. *Front Horm Res.* 2016;47:44-57.
42. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1802-12.
43. Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats.

Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. *J Clin Invest.* 1994;94(1):399-404.

44. Chen C, Bumbalo L, Leahy JL. Increased catalytic activity of glucokinase in isolated islets from hyperinsulinemic rats. *Diabetes.* 1994;43(5):684-9.

45. Liu YQ, Jetton TL, Leahy JL. beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem.* 2002;277(42):39163-8.

46. Weir GC, Mojsov S, Hendrick GK, Habener JF. Glucagonlike peptide I (7-37) actions on endocrine pancreas. *Diabetes.* 1989;38(3):338-42.

47. Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, et al. Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia.* 2006;49(9):2120-30.

48. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia.* 2000;43(4):393-410.

49. Bonner-Weir S. beta-cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes.* 2001;50 Suppl 1:S20-4.

50. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cells. *J Pathol.* 2002;197(4):519-26.

51. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(1):102-10.

52. Khadra A, Schnell S. Development, growth and maintenance of beta-cell mass: models are also part of the story. *Mol Aspects Med.* 2015;42:78-90.

53. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes.* 2008;57(6):1584-94.

54. Wang P, Fiaschi-Taesch NM, Vasavada RC, Scott DK, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Diabetes mellitus--advances and challenges in human beta-cell proliferation. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(4):201-12.

55. Ogilvie RF. The islands of langerhans in 19 cases of obesity. *The Journal of Pathology and Bacteriology.* 1933;37(3):473-81.

56. Chen C, Cohrs CM, Stertmann J, Bozsak R, Speier S. Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Mol Metab.* 2017;6(9):943-57.

57. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10 Suppl 4:32-42.



58. Cox AR, Lam CJ, Rankin MM, King KA, Chen P, Martinez R, et al. Extreme obesity induces massive beta cell expansion in mice through self-renewal and does not alter the beta cell lineage. *Diabetologia*. 2016;59(6):1231-41.
59. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2553-61.
60. Razavi R, Najafabadi HS, Abdullah S, Smukler S, Arntfield M, van der Kooy D. Diabetes enhances the proliferation of adult pancreatic multipotent progenitor cells and biases their differentiation to more beta-cell production. *Diabetes*. 2015;64(4):1311-23.
61. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Clemente G, Hu J, Pontecorvi A, et al. Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. *Diabetes*. 2014;63(3):994-1007.
62. Yoneda S, Uno S, Iwahashi H, Fujita Y, Yoshikawa A, Kozawa J, et al. Predominance of beta-cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):2053-61.
63. Salomon D, Meda P. Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res*. 1986;162(2):507-20.
64. Hiriart M, Ramirez-Medeles MC. Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology*. 1991;128(6):3193-8.
65. Bosco D, Meda P. Actively synthesizing beta-cells secrete preferentially after glucose stimulation. *Endocrinology*. 1991;129(6):3157-66.
66. Van Schravendijk CF, Kiekens R, Pipeleers DG. Pancreatic beta cell heterogeneity in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 1992;267(30):21344-8.
67. Nasteska D, Vilorio K, Everett L, Hodson DJ. Informing beta-cell regeneration strategies using studies of heterogeneity. *Mol Metab*. 2019;27S:S49-S59.
68. Da Silva Xavier G, Rutter GA. Metabolic and Functional Heterogeneity in Pancreatic beta Cells. *J Mol Biol*. 2019.
69. Wojtuszczyk A, Armanet M, Morel P, Berney T, Bosco D. Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts. *Diabetologia*. 2008;51(10):1843-52.
70. Johnston NR, Mitchell RK, Haythorne E, Pessoa MP, Semplici F, Ferrer J, et al. Beta Cell Hubs Dictate Pancreatic Islet Responses to Glucose. *Cell Metab*. 2016;24(3):389-401.
71. Salem V, Silva LD, Suba K, Georgiadou E, Neda Mousavy Gharavy S, Akhtar N, et al. Leader  $\beta$ -cells coordinate  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics across pancreatic islets in vivo. *Nature Metabolism*. 2019;1(6):615-29.

72. Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(8):604-12.
73. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(7):2334-9.
74. Gersell DJ, Gingerich RL, Greider MH. Regional Distribution and Concentration of Pancreatic Polypeptide in the Human and Canine Pancreas. *Diabetes*. 1978;28(1):11-5.
75. Malaisse-Lagae F, Stefan Y, Cox J, Perrelet A, Orci L. Identification of a lobe in the adult human pancreas rich in pancreatic polypeptide. *Diabetologia*. 1979;17(6):361-5.
76. Olehnik SK, Fowler JL, Avramovich G, Hara M. Quantitative analysis of intra- and inter-individual variability of human beta-cell mass. *Sci Rep*. 2017;7(1):16398.
77. Atlas D. International diabetes federation. *IDF Diabetes Atlas, 7th edn* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2015.
78. Evans JM, Newton RW, Ruta DA, MacDonald TM, Morris AD. Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2000;17(6):478-80.
79. Bruno G, Runzo C, Cavallo-Perin P, Merletti F, Rivetti M, Pinach S, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care*. 2005;28(11):2613-9.
80. Holman N, Young B, Gadsby R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med*. 2015;32(9):1119-20.
81. Bally L, Thabit H, Hovorka R. Glucose-responsive insulin delivery for type 1 diabetes: The artificial pancreas story. *Int J Pharm*. 2018;544(2):309-18.
82. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2019.
83. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15019.
84. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773-95.
85. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006;29(5):1130-9.
86. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999;104(6):787-94.

87. Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes*. 2003;52(9):2304-14.
88. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell*. 2012;150(6):1223-34.
89. Gutierrez GD, Bender AS, Cirulli V, Mastracci TL, Kelly SM, Tsigos A, et al. Pancreatic beta cell identity requires continual repression of non-beta cell programs. *J Clin Invest*. 2017;127(1):244-59.
90. Swisa A, Avrahami D, Eden N, Zhang J, Feleke E, Dahan T, et al. PAX6 maintains beta cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *J Clin Invest*. 2017;127(1):230-43.
91. Hunter CS, Stein RW. Evidence for Loss in Identity, De-Differentiation, and Trans-Differentiation of Islet beta-Cells in Type 2 Diabetes. *Front Genet*. 2017;8:35.
92. Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia*. 1987;30(10):763-8.
93. Kaprio J, Tuomilehto J, Koskenvuo M, Romanov K, Reunanen A, Eriksson J, et al. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*. 1992;35(11):1060-7.
94. Hemminki K, Li X, Sundquist K, Sundquist J. Familial risks for type 2 diabetes in Sweden. *Diabetes Care*. 2010;33(2):293-7.
95. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet*. 2011;378(9793):815-25.
96. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000;26(1):76-80.
97. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006;38(3):320-3.
98. Mitchell RK, Mondragon A, Chen L, McGinty JA, French PM, Ferrer J, et al. Selective disruption of Tcf7l2 in the pancreatic beta cell impairs secretory function and lowers beta cell mass. *Hum Mol Genet*. 2015;24(5):1390-9.
99. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2155-63.

100. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-5.
101. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of H, Mit LU, Novartis Institutes of BioMedical R, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007;316(5829):1331-6.
102. De Jesus DF, Kulkarni RN. "Omics" and "epi-omics" underlying the beta-cell adaptation to insulin resistance. *Mol Metab*. 2019;27S:S42-S8.
103. Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H, et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia*. 2008;51(4):615-22.
104. Gao T, McKenna B, Li C, Reichert M, Nguyen J, Singh T, et al. Pdx1 maintains beta cell identity and function by repressing an alpha cell program. *Cell Metab*. 2014;19(2):259-71.
105. Yang BT, Dayeh TA, Volkov PA, Kirkpatrick CL, Malmgren S, Jing X, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*. 2012;26(7):1203-12.
106. Yang BT, Dayeh TA, Kirkpatrick CL, Taneera J, Kumar R, Groop L, et al. Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2011;54(2):360-7.
107. Kameswaran V, Bramswig NC, McKenna LB, Penn M, Schug J, Hand NJ, et al. Epigenetic regulation of the DLK1-MEG3 microRNA cluster in human type 2 diabetic islets. *Cell Metab*. 2014;19(1):135-45.
108. LaPierre MP, Stoffel M. MicroRNAs as stress regulators in pancreatic beta cells and diabetes. *Mol Metab*. 2017;6(9):1010-23.
109. Lean ME, Leslie WS, Barnes AC, Brosnahan N, Thom G, McCombie L, et al. Primary care-led weight management for remission of type 2 diabetes (DiRECT): an open-label, cluster-randomised trial. *Lancet*. 2018;391(10120):541-51.
110. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*. 2011;34(6):1249-57.
111. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;302(2):179-88.
112. Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kroger J, Schulze MB, et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(10):810-8.

113. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*. 2003;144(9):4154-63.
114. Lytrivi M, Castell AL, Poitout V, Cnop M. Recent Insights Into Mechanisms of beta-Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. *J Mol Biol*. 2020;432(5):1514-34.
115. Chess DJ, Stanley WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):269-78.
116. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
117. Prentki M, Corkey BE. Are the  $\beta$ -cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*. 1996;45(3):273-83.
118. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008;29(3):351-66.
119. Nolan CJ, Prentki M. Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(2):118-27.
120. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98-107.
121. Donath MY, Dalmas E, Sauter NS, Boni-Schnetzler M. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metab*. 2013;17(6):860-72.
122. Acosta-Montano P, Garcia-Gonzalez V. Effects of Dietary Fatty Acids in Pancreatic Beta Cell Metabolism, Implications in Homeostasis. *Nutrients*. 2018;10(4).
123. Carta G, Murru E, Lisai S, Sirigu A, Piras A, Collu M, et al. Dietary triacylglycerols with palmitic acid in the sn-2 position modulate levels of N-acylethanolamides in rat tissues. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120424.
124. Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladriere L, Ortis F, Grieco FA, et al. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(7):1395-405.
125. Cnop M, Abdulkarim B, Bottu G, Cunha DA, Igoillo-Esteve M, Masini M, et al. RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes*. 2014;63(6):1978-93.
126. Collier JJ, Sparer TE, Karlstad MD, Burke SJ. Pancreatic islet inflammation: an emerging role for chemokines. *J Mol Endocrinol*. 2017;59(1):R33-R46.
127. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(1):15-28.

128. Westwell-Roper CY, Ehses JA, Verchere CB. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 $\beta$  production and beta-cell dysfunction. *Diabetes*. 2014;63(5):1698-711.
129. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2002;110(6):851-60.
130. Ehses JA, Lacraz G, Giroix MH, Schmidlin F, Coulaud J, Kassis N, et al. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13998-4003.
131. Everett BM, Donath MY, Pradhan AD, Thuren T, Pais P, Nicolau JC, et al. Anti-Inflammatory Therapy With Canakinumab for the Prevention and Management of Diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(21):2392-401.
132. Cabrera SM, Wang X, Chen YG, Jia S, Kaldunski ML, Greenbaum CJ, et al. Interleukin-1 antagonism moderates the inflammatory state associated with Type 1 diabetes during clinical trials conducted at disease onset. *Eur J Immunol*. 2016;46(4):1030-46.
133. Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes*. 2009;58(3):673-81.
134. Stiles L, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics and morphology in beta-cells. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(6):725-38.
135. Sigfrid LA, Cunningham JM, Beeharry N, Hakan Borg LA, Rosales Hernandez AL, Carlsson C, et al. Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the islets of Langerhans from the BB/S rat model of type 1 diabetes and an insulin-producing cell line. *J Mol Med (Berl)*. 2004;82(5):325-35.
136. Fu J, Cui Q, Yang B, Hou Y, Wang H, Xu Y, et al. The impairment of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells caused by prolonged glucotoxicity and lipotoxicity is associated with elevated adaptive antioxidant response. *Food Chem Toxicol*. 2017;100:161-7.
137. Thielen L, Shalev A. Diabetes pathogenic mechanisms and potential new therapies based upon a novel target called TXNIP. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018;25(2):75-80.
138. Gateva AT, Assyov YS, Velikova T, Kamenov ZA. Higher levels of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in patients with prediabetes compared to obese normoglycemic subjects. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(1):734-7.
139. Elsner M, Gehrman W, Lenzen S. Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells. *Diabetes*. 2011;60(1):200-8.

140. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*. 2007;50(2):359-69.
141. Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77 Suppl 1:S65-70.
142. Robertson RP. Beta-cell deterioration during diabetes: what's in the gun? *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(8):388-93.
143. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1589-96.
144. Harmon JS, Bogdani M, Parazzoli SD, Mak SS, Oseid EA, Berghmans M, et al. beta-Cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db mice. *Endocrinology*. 2009;150(11):4855-62.
145. Flamment M, Foufelle F. [Endoplasmic reticulum stress: from physiology to pathogenesis of type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)*. 2013;29(8-9):756-64.
146. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:767-93.
147. Foufelle F, Ferre P. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(3):291-6.
148. Yong J, Itkin-Ansari P, Kaufman RJ. When Less Is Better: ER Stress and Beta Cell Proliferation. *Dev Cell*. 2016;36(1):4-6.
149. Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8885-90.
150. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, et al. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2005;280(47):39609-15.
151. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet*. 2000;25(4):406-9.
152. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*. 2001;7(6):1153-63.
153. Arunagiri A, Haataja L, Cunningham CN, Shrestha N, Tsai B, Qi L, et al. Misfolded proinsulin in the endoplasmic reticulum during development of beta cell failure in diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2018;1418(1):5-19.

154. Jurgens CA, Toukatly MN, Fligner CL, Udayasankar J, Subramanian SL, Zraika S, et al. beta-cell loss and beta-cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. *Am J Pathol.* 2011;178(6):2632-40.
155. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R, Marselli L, Masini M, Boggi U, et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia.* 2007;50(12):2486-94.
156. Moon JS, Karunakaran U, Elumalai S, Lee IK, Lee HW, Kim YW, et al. Metformin prevents glucotoxicity by alleviating oxidative and ER stress-induced CD36 expression in pancreatic beta cells. *J Diabetes Complications.* 2017;31(1):21-30.
157. Butler AE, Dhawan S, Hoang J, Cory M, Zeng K, Fritsch H, et al. beta-Cell Deficit in Obese Type 2 Diabetes, a Minor Role of beta-Cell Dedifferentiation and Degranulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(2):523-32.
158. Guo S, Dai C, Guo M, Taylor B, Harmon JS, Sander M, et al. Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3305-16.
159. Aguayo-Mazzucato C, van Haaren M, Mruk M, Lee TB, Jr., Crawford C, Hollister-Lock J, et al. beta Cell Aging Markers Have Heterogeneous Distribution and Are Induced by Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2017;25(4):898-910 e5.
160. Aguayo-Mazzucato C, Andle J, Lee TB, Jr., Midha A, Talemal L, Chipashvili V, et al. Acceleration of beta Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. *Cell Metab.* 2019;30(1):129-42 e4.
161. Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, et al. Evidence of  $\beta$ -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2016;101(3):1044-54.
162. Cieslar-Pobuda A, Knoflach V, Ringh MV, Stark J, Likus W, Siemianowicz K, et al. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(7):1359-69.
163. Salinno C, Cota P, Bastidas-Ponce A, Tarquis-Medina M, Lickert H, Bakhti M. beta-Cell Maturation and Identity in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
164. Remedi MS, Emfinger C. Pancreatic beta-cell identity in diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18 Suppl 1:110-6.
165. Weir GC, Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. beta-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? *Islets.* 2013;5(5):233-7.
166. Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, et al. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol.* 2005;25(12):4969-76.
167. Conrad E, Stein R, Hunter CS. Revealing transcription factors during human pancreatic beta cell development. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(8):407-14.



168. Brereton MF, Rohm M, Ashcroft FM. beta-Cell dysfunction in diabetes: a crisis of identity? *Diabetes Obes Metab.* 2016;18 Suppl 1:102-9.
169. Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):966-72.
170. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine.* 2017;21:21-8.
171. Childs BG, Durik M, Baker DJ, Van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424.
172. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009;11(8):973-9.
173. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008;133(6):1019-31.
174. Thompson PJ, Shah A, Ntranos V, Van Gool F, Atkinson M, Bhushan A. Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. *Cell Metab.* 2019;29(5):1045-60 e10.
175. Wang Z, York NW, Nichols CG, Remedi MS. Pancreatic beta cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab.* 2014;19(5):872-82.
176. Spijker HS, Ravelli RB, Mommaas-Kienhuis AM, van Apeldoorn AA, Engelse MA, Zaldumbide A, et al. Conversion of mature human beta-cells into glucagon-producing alpha-cells. *Diabetes.* 2013;62(7):2471-80.
177. Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature.* 2010;464(7292):1149-54.
178. Ye L, Robertson MA, Hesselson D, Stainier DY, Anderson RM. Glucagon is essential for alpha cell transdifferentiation and beta cell neogenesis. *Development.* 2015;142(8):1407-17.
179. Lee SH, Hao E, Scharp D, Levine F. Insulin acts as a repressive factor to inhibit the ability of PAR2 to induce islet cell transdifferentiation. *Islets.* 2018:1-12.
180. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.* 2008;455(7213):627-32.
181. Clayton HW, Osipovich AB, Stancill JS, Schneider JD, Vianna PG, Shanks CM, et al. Pancreatic Inflammation Redirects Acinar to beta Cell Reprogramming. *Cell Rep.* 2016;17(8):2028-41.

182. van der Meulen T, Mawla AM, DiGrucchio MR, Adams MW, Nies V, Dolleman S, et al. Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets. *Cell Metab.* 2017;25(4):911-26 e6.
183. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA. Human pancreas development. *Development.* 2015;142(18):3126-37.
184. Tschen SI, Dhawan S, Gurlo T, Bhushan A. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes.* 2009;58(6):1312-20.
185. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes.* 1989;38(1):49-53.
186. Alonso LC, Yokoe T, Zhang P, Scott DK, Kim SK, O'Donnell CP, et al. Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes.* 2007;56(7):1792-801.
187. 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.
188. Swenne I, Bone AJ, Howell SL, Hellerstrom C. Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture. *Diabetes.* 1980;29(9):686-92.
189. Swenne I. The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. *Diabetes.* 1982;31(9):754-60.
190. Swenne I. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. *Diabetes.* 1983;32(1):14-9.
191. Kulkarni RN, Mizrachi E-B, Ocana AG, Stewart AF. Human  $\beta$ -Cell Proliferation and Intracellular Signaling. Driving in the Dark Without a Road Map. 2012;61(9):2205-13.
192. Bernal-Mizrachi E, Kulkarni RN, Scott DK, Mauvais-Jarvis F, Stewart AF, Garcia-Ocaña A. Human  $\beta$ -Cell Proliferation and Intracellular Signaling Part 2: Still Driving in the Dark Without a Road Map. *Diabetes.* 2014;63(3):819-31.
193. Stewart AF, Hussain MA, García-Ocaña A, Vasavada RC, Bhushan A, Bernal-Mizrachi E, et al. Human  $\beta$ -Cell Proliferation and Intracellular Signaling: Part 3. *Diabetes.* 2015;64(6):1872-85.
194. Hart NJ, Powers AC. Use of human islets to understand islet biology and diabetes: progress, challenges and suggestions. *Diabetologia.* 2019;62(2):212-22.
195. Porat S, Weinberg-Corem N, Tornovsky-Babaey S, Schyr-Ben-Haroush R, Hija A, Stolovich-Rain M, et al. Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab.* 2011;13(4):440-9.

196. Nakamura A, Terauchi Y, Ohyama S, Kubota J, Shimazaki H, Nambu T, et al. Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and beta-cell mass. *Endocrinology*. 2009;150(3):1147-54.
197. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(19):7281-6.
198. Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schön MR, Abumrad NA, Blüher M, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature*. 2012;484(7394):333.
199. Metukuri MR, Zhang P, Basantani MK, Chin C, Stamateris RE, Alonso LC, et al. ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. *Diabetes*. 2012;61(8):2004-15.
200. McDaniel ML, Marshall CA, Pappan KL, Kwon G. Metabolic and autocrine regulation of the mammalian target of rapamycin by pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*. 2002;51(10):2877-85.
201. Kwon G, Marshall CA, Pappan KL, Remedi MS, McDaniel ML. Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. *Diabetes*. 2004;53(suppl 3):S225-S32.
202. Liu H, Remedi MS, Pappan KL, Kwon G, Rohatgi N, Marshall CA, et al. Glycogen synthase kinase-3 and mammalian target of rapamycin pathways contribute to DNA synthesis, cell cycle progression, and proliferation in human islets. *Diabetes*. 2009;58(3):663-72.
203. Rachdi L, Balcazar N, Osorio-Duque F, Elghazi L, Weiss A, Gould A, et al. Disruption of Tsc2 in pancreatic  $\beta$  cells induces  $\beta$  cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(27):9250-5.
204. Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, Ozcan U, Stoffel M, Magnuson MA, et al. beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet*. 2002;31(1):111-5.
205. 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.
206. Stamateris RE, Sharma RB, Kong Y, Ebrahimpour P, Panday D, Ranganath P, et al. Glucose Induces Mouse beta-Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor. *Diabetes*. 2016;65(4):981-95.
207. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*. 2000;105(2):199-205.

208. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998;391(6670):900-4.
209. Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, et al. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1521-32.
210. Mohanty S, Spinass GA, Maedler K, Zuellig RA, Lehmann R, Donath MY, et al. Overexpression of IRS2 in isolated pancreatic islets causes proliferation and protects human beta-cells from hyperglycemia-induced apoptosis. *Exp Cell Res*. 2005;303(1):68-78.
211. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes*. 2000;49(11):1880-9.
212. Jones B, Bloom SR, Buenaventura T, Tomas A, Rutter GA. Control of insulin secretion by GLP-1. *Peptides*. 2018;100:75-84.
213. Lavine JA, Attie AD. Gastrointestinal hormones and the regulation of  $\beta$ -cell mass. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212(1):41-58.
214. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013;17(6):819-37.
215. Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, et al. Stimulation of pancreatic  $\beta$ -cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol*. 2006;188(3):481-92.
216. Tschen S-I, Georgia S, Dhawan S, Bhushan A. Skp2 is required for incretin hormone-mediated  $\beta$ -cell proliferation. *Mol Endocrinol*. 2011;25(12):2134-43.
217. Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes*. 2003;52(1):124-32.
218. Xie J, El Sayed NM, Qi C, Zhao X, Moore CE, Herbert TP. Exendin-4 stimulates islet cell replication via the IGF1 receptor activation of mTORC1/S6K1. *J Mol Endocrinol*. 2014;53(1):105-15.
219. Tian L, Gao J, Weng G, Yi H, Tian B, O'Brien TD, et al. Comparison of exendin-4 on beta-cell replication in mouse and human islet grafts. *Transpl Int*. 2011;24(8):856-64.
220. Shen W, Tremblay MS, Deshmukh VA, Wang W, Filippi CM, Harb G, et al. Small-molecule inducer of beta cell proliferation identified by high-throughput screening. *J Am Chem Soc*. 2013;135(5):1669-72.
221. Boerner BP, George NM, Mir SU, Sarvetnick NE. WS6 induces both alpha and beta cell proliferation without affecting differentiation or viability. *Endocr J*. 2015;62(4):379-86.

222. Wang P, Alvarez-Perez JC, Felsenfeld DP, Liu H, Sivendran S, Bender A, et al. A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication. *Nat Med.* 2015;21(4):383-8.
223. Dirice E, Walpita D, Vetere A, Meier BC, Kahraman S, Hu J, et al. Inhibition of DYRK1A Stimulates Human beta-Cell Proliferation. *Diabetes.* 2016;65(6):1660-71.
224. Walpita D, Hasaka T, Spoonamore J, Vetere A, Takane KK, Fomina-Yadlin D, et al. A human islet cell culture system for high-throughput screening. *J Biomol Screen.* 2012;17(4):509-18.
225. Dhawan S, Dirice E, Kulkarni RN, Bhushan A. Inhibition of TGF-beta Signaling Promotes Human Pancreatic beta-Cell Replication. *Diabetes.* 2016;65(5):1208-18.
226. Wang P, Karakose E, Liu H, Swartz E, Ackeifi C, Zlatanic V, et al. Combined Inhibition of DYRK1A, SMAD, and Trithorax Pathways Synergizes to Induce Robust Replication in Adult Human Beta Cells. *Cell Metab.* 2019;29(3):638-52 e5.
227. El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, Hu J, Zhou JY, Shirakawa J, et al. SerpinB1 Promotes Pancreatic beta Cell Proliferation. *Cell Metab.* 2016;23(1):194-205.
228. Takebayashi K, Hara K, Terasawa T, Naruse R, Suetsugu M, Tsuchiya T, et al. Circulating SerpinB1 levels and clinical features in patients with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2016;4(1):e000274.
229. Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, et al. Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science.* 1993;259(5101):1604-7.
230. Huotari M-A, Palgi J, Otonkoski T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel  $\beta$ -cell mitogen. *Endocrinology.* 1998;139(4):1494-9.
231. Li L, Seno M, Yamada H, Kojima I. Promotion of  $\beta$ -cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology.* 2001;142(12):5379-85.
232. Tokui Y, Kozawa J, Yamagata K, Zhang J, Ohmoto H, Tochino Y, et al. Neogenesis and proliferation of  $\beta$ -cells induced by human betacellulin gene transduction via retrograde pancreatic duct injection of an adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350(4):987-93.
233. Oh YS, Shin S, Lee Y-J, Kim EH, Jun H-S. Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS One.* 2011;6(8):e23894.
234. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):505-16.
235. Miettinen P, Ormio P, Hakonen E, Banerjee M, Otonkoski T. EGF receptor in pancreatic beta-cell mass regulation. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 3):280-5.

236. Tomioka T, Toshkov I, Kazakoff K, Andren-Sandberg A, Takahashi T, Buchler M, et al. Cellular and subcellular localization of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in normal and diseased human and hamster pancreas. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1995;15(5):231-50.
237. Hakonen E, Ustinov J, Mathijs I, Palgi J, Bouwens L, Miettinen PJ, et al. Epidermal growth factor (EGF)-receptor signalling is needed for murine beta cell mass expansion in response to high-fat diet and pregnancy but not after pancreatic duct ligation. *Diabetologia*. 2011;54(7):1735-43.
238. Miettinen PJ, Ustinov J, Ormio P, Gao R, Palgi J, Hakonen E, et al. Downregulation of EGF receptor signaling in pancreatic islets causes diabetes due to impaired postnatal  $\beta$ -cell growth. *Diabetes*. 2006;55(12):3299-308.
239. Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, et al. Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development*. 2000;127(12):2617-27.
240. Nishi E, Klagsbrun M. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a mediator of multiple physiological and pathological pathways. *Growth Factors*. 2004;22(4):253-60.
241. Thompson SA, Higashiyama S, Wood K, Pollitt NS, Damm D, McEnroe G, et al. Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin. *J Biol Chem*. 1994;269(4):2541-9.
242. Harding PA, Brigstock DR, Shen L, Crissman-Combs MA, Besner GE. Characterization of the gene encoding murine heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *Gene*. 1996;169(2):291-2.
243. Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, et al. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- $\gamma$ /ADAM9 and PKC $\delta$  are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J*. 1998;17(24):7260-72.
244. Gechtman Z, Alonso JL, Raab G, Ingber DE, Klagsbrun M. The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28828-35.
245. Dao DT, Anez-Bustillos L, Adam RM, Puder M, Bielenberg DR. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor as a Critical Mediator of Tissue Repair and Regeneration. *Am J Pathol*. 2018;188(11):2446-56.
246. Zhou Z, Harding PA. Amino-terminal deletion of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor4-127 stimulates cell proliferation but lacks insulin-like activity. *Cell Prolif*. 2007;40(2):213-30.

247. Ito Y, Higashiyama S, Takeda T, Yamamoto Y, Wakasa KI, Matsuura N. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol.* 2001;29(1):47-52.
248. Jayne DG, Perry SL, Morrison E, Farmery SM, Guillou PJ. Activated mesothelial cells produce heparin-binding growth factors: implications for tumour metastases. *Br J Cancer.* 2000;82(6):1233-8.
249. Means AL, Ray KC, Singh AB, Washington MK, Whitehead RH, Harris RC, Jr., et al. Overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia. *Gastroenterology.* 2003;124(4):1020-36.
250. Ray KC, Blaine SA, Washington MK, Braun AH, Singh AB, Harris RC, et al. Transmembrane and soluble isoforms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor regulate distinct processes in the pancreas. *Gastroenterology.* 2009;137(5):1785-94.
251. Kozawa J, Tokui Y, Moriwaki M, Li M, Ohmoto H, Yuan M, et al. Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector. *Pancreas.* 2005;31(1):32-42.
252. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138(4):867-73.
253. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(3):1566-72.
254. Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.* 1996;109 ( Pt 1):143-53.
255. Dieckman LM, Freudenthal BD, Washington MT. PCNA structure and function: insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Subcell Biochem.* 2012;62:281-99.
256. Schonenberger F, Deutzmann A, Ferrando-May E, Merhof D. Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:180.
257. Sawicka A, Seiser C. Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie.* 2012;94(11):2193-201.
258. Hans F, Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene.* 2001;20(24):3021-7.
259. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2415-20.

260. Sharma RB, Darko C, Zheng X, Gablaski B, Alonso LC. DNA Damage Does Not Cause BrdU Labeling of Mouse or Human beta-Cells. *Diabetes*. 2019;68(5):975-87.
261. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004;429(6987):41-6.
262. Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell*. 2007;12(5):817-26.
263. Song Z, Fusco J, Zimmerman R, Fischbach S, Chen C, Ricks DM, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Regulates beta Cell Proliferation in Adult Mice. *J Biol Chem*. 2016;291(43):22630-7.
264. Kaneto H, Miyagawa J, Kajimoto Y, Yamamoto K, Watada H, Umayahara Y, et al. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor during pancreas development. A potential role of PDX-1 in transcriptional activation. *J Biol Chem*. 1997;272(46):29137-43.
265. Ongusaha PP, Kwak JC, Zwible AJ, Macip S, Higashiyama S, Taniguchi N, et al. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(15):5283-90.
266. Tokui Y, Kozawa J, Yamagata K, Zhang J, Ohmoto H, Tochino Y, et al. Neogenesis and proliferation of beta-cells induced by human betacellulin gene transduction via retrograde pancreatic duct injection of an adenovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(4):987-93.
267. Brand SJ, Tagerud S, Lambert P, Magil SG, Tatarkiewicz K, Doiron K, et al. Pharmacological treatment of chronic diabetes by stimulating pancreatic beta-cell regeneration with systemic co-administration of EGF and gastrin. *Pharmacol Toxicol*. 2002;91(6):414-20.
268. Castillo GM, Nishimoto-Ashfield A, Banerjee AA, Landolfi JA, Lyubimov AV, Bolotin EM. Omeprazole and PGC-formulated heparin binding epidermal growth factor normalizes fasting blood glucose and suppresses insulinitis in multiple low dose streptozotocin diabetes model. *Pharm Res*. 2013;30(11):2843-54.
269. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, et al. Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab*. 2016;5(7):449-58.
270. Means AL, Meszoely IM, Suzuki K, Miyamoto Y, Rustgi AK, Coffey RJ, Jr., et al. Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development*. 2005;132(16):3767-76.
271. Minami K, Okuno M, Miyawaki K, Okumachi A, Ishizaki K, Oyama K, et al. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(42):15116-21.



272. Metukuri MR, Zhang P, Basantani MK, Chin C, Stamateris RE, Alonso LC, et al. ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*. 2012;61(8):2004-15.
273. Zhang P, Kumar A, Katz LS, Li L, Paulynice M, Herman MA, et al. Induction of the ChREBPbeta Isoform Is Essential for Glucose-Stimulated beta-Cell Proliferation. *Diabetes*. 2015;64(12):4158-70.
274. Sae-Lee C, Moolsuwan K, Chan L, Pongvarin N. ChREBP Regulates Itself and Metabolic Genes Implicated in Lipid Accumulation in beta-Cell Line. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147411.
275. Matsumoto S, Kishida K, Shimomura I, Maeda N, Nagaretani H, Matsuda M, et al. Increased plasma HB-EGF associated with obesity and coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(3):781-6.
276. Taniguchi K, Xia L, Goldberg HJ, Lee KW, Shah A, Stavar L, et al. Inhibition of Src kinase blocks high glucose-induced EGFR transactivation and collagen synthesis in mesangial cells and prevents diabetic nephropathy in mice. *Diabetes*. 2013;62(11):3874-86.
277. Yoder SM, Dineen SL, Wang Z, Thurmond DC. YES, a Src family kinase, is a proximal glucose-specific activator of cell division cycle control protein 42 (Cdc42) in pancreatic islet beta cells. *J Biol Chem*. 2014;289(16):11476-87.
278. Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, Gould A, Weiss A, Shiojima I, et al. mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem*. 2009;284(12):7832-42.
279. Oh YS, Shin S, Lee YJ, Kim EH, Jun HS. Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS One*. 2011;6(8):e23894.
280. Miyagawa J, Hanafusa O, Sasada R, Yamamoto K, Igarashi K, Yamamori K, et al. Immunohistochemical localization of betacellulin, a new member of the EGF family, in normal human pancreas and islet tumor cells. *Endocr J*. 1999;46(6):755-64.
281. Rescan C, Le Bras S, Lefebvre VH, Frandsen U, Klein T, Foschi M, et al. EGF-induced proliferation of adult human pancreatic duct cells is mediated by the MEK/ERK cascade. *Lab Invest*. 2005;85(1):65-74.
282. Dirice E, De Jesus DF, Kahraman S, Basile G, Ng RW, El Ouaamari A, et al. Human duct cells contribute to beta cell compensation in insulin resistance. *JCI Insight*. 2019;4(8).
283. Shen W, Taylor B, Jin Q, Nguyen-Tran V, Meeusen S, Zhang YQ, et al. Inhibition of DYRK1A and GSK3B induces human beta-cell proliferation. *Nat Commun*. 2015;6:8372.

284. Aamodt KI, Aramandla R, Brown JJ, Fiaschi-Taesch N, Wang P, Stewart AF, et al. Development of a reliable automated screening system to identify small molecules and biologics that promote human beta-cell regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(5):E859-E68.
285. Wang YJ, Golson ML, Schug J, Traum D, Liu C, Vivek K, et al. Single-Cell Mass Cytometry Analysis of the Human Endocrine Pancreas. *Cell Metab.* 2016;24(4):616-26.
286. Aamodt KI, Powers AC. Signals in the pancreatic islet microenvironment influence beta-cell proliferation. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19 Suppl 1:124-36.
287. Thorn P, Gaisano HY. Cell-to-Cell Communication and the Regulation of Pancreatic Function. *Pancreas.* 2015;44(8):1174-5.
288. Gan WJ, Do OH, Cottle L, Ma W, Kosobrodova E, Cooper-White J, et al. Local Integrin Activation in Pancreatic beta Cells Targets Insulin Secretion to the Vasculature. *Cell Rep.* 2018;24(11):2819-26 e3.
289. Mamidi A, Prawiro C, Seymour PA, de Lichtenberg KH, Jackson A, Serup P, et al. Mechanosignalling via integrins directs fate decisions of pancreatic progenitors. *Nature.* 2018;564(7734):114-8.
290. Nikolova G, Strilic B, Lammert E. The vascular niche and its basement membrane. *Trends Cell Biol.* 2007;17(1):19-25.
291. Meda P. Gap junction proteins are key drivers of endocrine function. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(1):124-40.
292. Criscimanna A, Coudriet GM, Gittes GK, Piganelli JD, Esni F. Activated macrophages create lineage-specific microenvironments for pancreatic acinar- and beta-cell regeneration in mice. *Gastroenterology.* 2014;147(5):1106-18 e11.
293. Xiao X, Gaffar I, Guo P, Wiersch J, Fischbach S, Peirish L, et al. M2 macrophages promote beta-cell proliferation by up-regulation of SMAD7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(13):E1211-20.
294. Dissanayake WC, Sorrenson B, Shepherd PR. The role of adherens junction proteins in the regulation of insulin secretion. *Biosci Rep.* 2018;38(2).
295. Eberhard D, Lammert E. The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(5):469-75.
296. Lakshmi pathi J, Alvarez-Perez JC, Rosselot C, Casinelli GP, Stamateris RE, Rausell-Palamos F, et al. PKC $\zeta$  Is Essential for Pancreatic  $\beta$ -Cell Replication During Insulin Resistance by Regulating mTOR and Cyclin-D2. *Diabetes.* 2016;65(5):1283-96.
297. Kumar A, Katz LS, Schulz AM, Kim M, Honig LB, Li L, et al. Activation of Nrf2 Is Required for Normal and ChREBP $\alpha$ -Augmented Glucose-Stimulated beta-Cell Proliferation. *Diabetes.* 2018;67(8):1561-75.

298. Sharma RB, O'Donnell AC, Stamateris RE, Ha B, McCloskey KM, Reynolds PR, et al. Insulin demand regulates beta cell number via the unfolded protein response. *J Clin Invest.* 2015;125(10):3831-46.
299. Levitt HE, Cyphert TJ, Pascoe JL, Hollern DA, Abraham N, Lundell RJ, et al. Glucose stimulates human beta cell replication in vivo in islets transplanted into NOD-severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Diabetologia.* 2011;54(3):572-82.
300. Diiorio P, Jurczyk A, Yang C, Racki WJ, Brehm MA, Atkinson MA, et al. Hyperglycemia-induced proliferation of adult human beta cells engrafted into spontaneously diabetic immunodeficient NOD-Rag1null IL2rgammanull Ins2Akita mice. *Pancreas.* 2011;40(7):1147-9.
301. Dai C, Kayton NS, Shostak A, Poffenberger G, Cyphert HA, Aramandla R, et al. Stress-impaired transcription factor expression and insulin secretion in transplanted human islets. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1857-70.



