

Université de Montréal

**Rôle de l'urée dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique
au cours de l'insuffisance rénale chronique**

Par
Elsa Nyam

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc)
en biochimie

Avril, 2016

© Elsa Nyam, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Rôle de l'urée dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de
l'insuffisance rénale chronique

Présenté par :
Elsa Nyam

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Nikolaus Heveker, président-rapporteur
Dr. Vincent Poitout, directeur de recherche
Dr. François Madore, membre du jury

Résumé

L'insuffisance rénale chronique (IRC) se définit par un défaut de filtration glomérulaire et est associée à plusieurs désordres. La perturbation de l'homéostasie glucidique en fait partie. L'homéostasie glucidique est contrôlée principalement par l'insuline, soit l'hormone sécrétée en réponse au glucose par les cellules bêta-pancréatiques contenues dans les îlots de Langerhans. La préservation de la fonction de la cellule bêta est essentielle au maintien de l'homéostasie glucidique. Il a été démontré que la sécrétion de l'insuline est altérée au cours de l'IRC, cependant les mécanismes demeurent peu connus. Au cours de l'IRC, l'accumulation chronique de toxines urémiques pourrait contribuer à la défaillance de la cellule bêta. L'urée est une toxine urémique majeure et sa toxicité a été récemment rapportée dans plusieurs tissus. Le but de ce mémoire était donc de vérifier le rôle de l'urée dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC. Nous avons démontré que l'exposition des îlots de souris à des concentrations pathologiques d'urée entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline via l'augmentation du stress oxydant et des O-glycosylations. Ce défaut est dû à une perturbation du métabolisme intracellulaire du glucose. Entre autres, nous avons observé une baisse de la glycolyse associée à la réduction de l'activité enzymatique de la phosphofructokinase-1. Ces résultats démontrent un effet toxique direct de l'urée sur la sécrétion d'insuline et permettent de mieux comprendre le mécanisme de dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC.

Mots clés : Insuffisance rénale chronique (IRC), homéostasie glucidique, cellule bêta-pancréatique, insuline, métabolisme du glucose.

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is defined as a glomerular filtration defect and is associated with many disorders. Impaired glucose homeostasis is one of them. Glucose homeostasis is maintained in part by insulin, which is the hormone secreted by the pancreatic beta cells from the islets of Langerhans in response to glucose. The preservation of beta cell function is essential to maintain glucose homeostasis. It has been demonstrated that insulin secretion is altered during CKD; however, the underlying mechanisms remain unknown. In CKD, chronic accumulation of uremic toxins could contribute to beta cell dysfunction. Urea is a major uremic toxin and its toxicity has been recently reported in many tissues. The purpose of this master project was to ascertain the role of urea in pancreatic beta cell dysfunction during CKD. We have demonstrated that exposure of mouse islets to pathological concentrations of urea leads to diminution of insulin secretion via an increase in oxidative stress and O-glycosylation. This defect is due to disturbed intracellular glucose metabolism. Among others, we have observed a reduction in glycolysis associated with a decrease in the activity of phosphofructokinase-1. These results demonstrate a direct toxic effect of urea on insulin secretion and contribute to a better understanding of mechanisms of pancreatic beta cell dysfunction during CKD.

Key words: Chronic kidney disease (CKD), glucose homeostasis, pancreatic beta cell, insulin, glucose metabolism.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	IX
CHAPITRE 1- INTRODUCTION	1
1.1 INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE	2
1.1.1 Généralités.....	2
1.1.2 Le rein : physiologie, fonctions et IRC	2
1.1.3 Les complications associées à l'IRC	6
1.1.4 L'IRC et la dérégulation de l'homéostasie glucidique	7
1.2 HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE	11
1.2.1 Généralités.....	11
1.2.2 Le pancréas et sa fonction endocrine	11
1.2.3 La métabolisme du glucose et la sécrétion de l'insuline dans la cellule bêta-pancréatique	14
1.2.4 L'action périphérique de l'insuline.....	17
1.2.5 La cellule bêta-pancréatique et le stress oxydant	19
1.2.6 La cellule bêta-pancréatique et la voie des hexosamines	21
1.2.7 Dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'urémie	24
1.3 L'URÉE, TOXINE URÉMIQUE MAJEURE	26
1.3.1 Généralités.....	26
1.3.2 Production et élimination de l'urée.....	26
1.3.3 L'urée, molécule inerte?.....	27
1.4 MISE EN CONTEXTE DE L'ARTICLE	30
1.4.1 Hypothèse et objectifs.....	30
1.4.2 Contribution des auteurs.....	31
CHAPITRE 2- RÉSULTATS	33
ARTICLE: « UREA IMPAIRS B-CELL GLYCOLYSIS AND INSULIN SECRETION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE »	34
Abstract.....	35
Introduction	36
Results	39
Discussion.....	47
Methods	55
Author contributions	65

<i>Acknowledgments</i>	65
<i>References</i>	67
<i>Figures</i>	79
CHAPITRE 3- DISCUSSION	95
<i>Retour sur les résultats</i>	96
<i>Le stress oxydant et l'O-glycosylation comme médiateurs de la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC</i>	97
<i>Modèles de perturbation de la fonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC</i>	99
<i>L'urée est une toxine urémique nocive</i>	103
<i>Forces et faiblesses</i>	106
<i>Conclusion et perspectives</i>	107
RÉFÉRENCES	109

Liste des tableaux

Table 2. 1 Biometry, organ weights and metabolic parameters in sham or87

Table 2. S 1. Biometry and metabolic parameters in sham or CKD mice with/without NAC treatment during 3 weeks93

Table 2. S 2 Biometry and metabolic parameters in sham or CKD mice with/without DON treatment during 3 weeks93

Table 2. S 3. Biometry and metabolic parameters in urea (25 g/L in drinking water) or vehicle treated mice94

Table 2. S 4. Islet donor characteristics.....94

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1: Schématisation de l'anatomie et de la vascularisation rénale	3
Figure 1.2: Le néphron	4
Figure 1.3: Anatomie du pancréas	12
Figure 1.4: Section d'un îlot de Langerhans chez l'homme	13
Figure 1.5: Mécanisme de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose dans la cellule bêta-pancréatique	16
Figure 1.6: Régulation de la glycémie par l'insuline	19
Figure 1.7: La voie des hexosamines	22

Chapitre 2

Figure 2. 1: CKD mice have defective glucose-stimulated insulin secretion <i>in vivo</i>	79
Figure 2. 2: Isolated islets from CKD mice have reduced insulin release in response to glucose and KCl.....	80
Figure 2. 3: CKD mice show an increase of O-GlcNAcylation in islets and oxidative stress markers.....	81
Figure 2. 4: Exposure to urea in drinking water increases circulating urea levels and inhibits insulin secretion.	82
Figure 2. 5: The insulin secretory defect resulting from exposure of normal mouse or human islets to urea is prevented by antioxidant treatment or GFAT inhibition.	83
Figure 2. 6: Cyanate inhibits insulin secretion in islets <i>ex vivo</i>	84
Figure 2. 7: Normal mouse islets exposed to urea and islets from CKD mice have impaired glucose metabolism.	85
Figure 2. 8: Inhibiting protein O-GlcNAcylation in islets restores glucose metabolism and PFK-1 activity.....	86
Figure 2.S 1: Body weight, food intake and metabolic parameters in sham and CKD mice. .	88
Figure 2.S 2: β -cell mass and protein content in islets from sham and CKD mice.	89
Figure 2.S 3: Insulin secretion in isolated islets from CKD mice at 6 weeks.	89
Figure 2.S 4: Fed glycemia, insulin content in islets in CKD and sham mice with/without NAC and DON.....	90
Figure 2.S 5: Body weight, food intake, metabolic parameters, insulin content in islets from normal mice with/without urea administration.	91
Figure 2.S 6: Insulin and proteins content in urea-treated islets.	92
Figure 2.S 7: Glucokinase activity and phosphofruktokinase-1 expression in islets after urea treatment and from CKD mice.....	92

Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
Canal K ⁺ ATP	Canal de potassium sensible à l'ATP
[Ca ²⁺] _i	Concentration de calcium intracellulaire
CMPF	3-carboxylic acid 4-methyl-5-propyl-2-furan propionic
DFG	Débit de filtration glomérulaire
GFAT	Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase
G-6-P	Glucose-6-phosphate
HbA1c	Hémoglobine glyquée
IRC	Insuffisance rénale chronique
IRS	Substrats intracellulaires du récepteur à l'insuline
OGT	O-GlcNAc transférase
PFK1	Phosphofructokinase-1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
ROS	Espèces réactives à l'oxygène, « reactive oxygen species »
UDP-GlcNAc	Uridine-5-diphosphate-N-acetylglucosamine
VDCC	Canal à calcium voltage-dépendant

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche à la maîtrise Vincent Poitout. Dès mon arrivée dans votre laboratoire en tant que stagiaire d'été, j'ai été bien accueillie et encadrée. Trois ans se sont passés et aujourd'hui je constate l'ampleur du chemin que j'ai fait. Sous votre aile, j'ai développé mon autonomie, mon sens critique, mon sens de l'analyse ainsi que mon éthique de travail. J'ai appris énormément dans votre laboratoire et je vous en suis très reconnaissante. Cette maîtrise aura été une formation très riche et j'en garderai que de bons souvenirs.

Je remercie également tous les membres du laboratoire Poitout qui m'ont aidée à travers cette maîtrise. Particulièrement, je souhaite remercier Laetitia qui m'a énormément guidée tout au long de ma maîtrise.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté de lire ce mémoire. C'est un privilège pour moi de me faire lire par des experts du domaine.

Enfin, je souhaite souligner le support de ma famille, en particulier celle de ma sœur Ellena qui a toujours cru en moi et en mes capacités. Ta confiance en moi est une source de motivation continuelle pour moi. Merci beaucoup pour tout!

Chapitre 1- Introduction

1.1 Insuffisance rénale chronique

1.1.1 Généralités

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est reconnue comme étant un fardeau majeur de santé publique (1-3). On estime qu'environ 8 à 16 % de la population mondiale, soit près d'un dixième, est touché par l'IRC, et cette prévalence se situe à 50 % dans les sous-populations à haut risque, telles les individus atteints du diabète et d'hypertension (1, 4). Que ce soit en stade modéré où les effets les plus néfastes de la maladie sont le résultat de complications cardiovasculaires, ou en stade avancée aboutissant à une défaillance quasi-totale de la capacité rénale, l'IRC est associée à un très mauvais pronostic (2, 3). L'hypertension artérielle et le diabète sont les causes principales d'IRC (4, 5). Cependant, la prévalence de cette maladie est également corrélée avec l'âge, l'obésité et le tabagisme (1, 6). L'IRC se caractérise par la perte graduelle et persistante de la fonction rénale et, à l'inverse de l'insuffisance rénale aiguë, l'IRC est un trouble irréversible.

1.1.2 Le rein : physiologie, fonctions et IRC

Situés dans la région lombaire, les reins sont logés dans le rétro-péritoine. Ils sont composés de deux parties : la partie périphérique (le cortex) et la partie centrale (la médullaire). Le rein est un organe extrêmement vascularisé; il est irrigué par une artère rénale qui provient de l'aorte abdominale et une veine rénale qui se jette dans la veine cave inférieure.

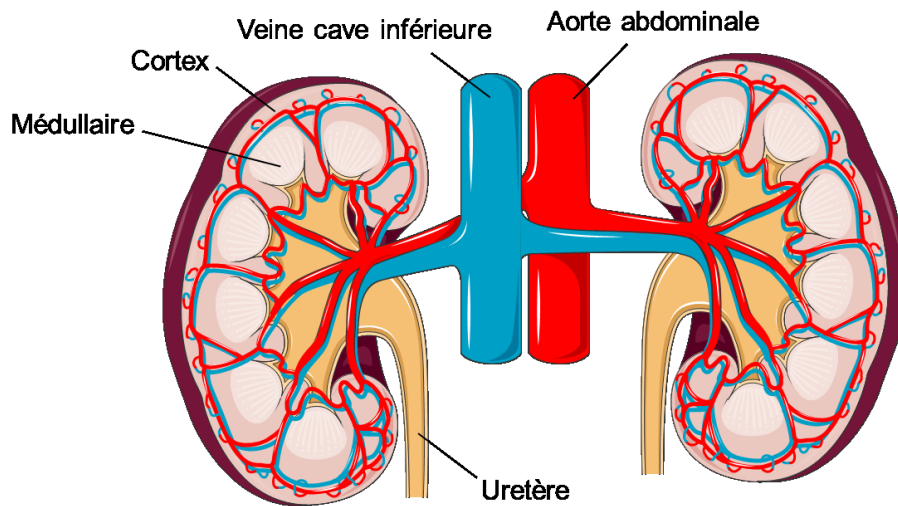


Figure 1.1: Schématisation de l'anatomie et de la vascularisation rénale

Coupe transversale démontrant les deux parties principales du rein (cortex et médullaire), le conduit urétéral qui transporte l'urine des bassinets vers la vessie, et le système de vascularisation rénale. Illustration réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Les reins sont perfusés par 20 % de l'apport cardiaque et traitent par jour près de 180 L de liquide dérivé du sang (7). Le rein doit son rôle d'épuration du sang à son unité fonctionnelle : le néphron. Chaque rein contient environ 1 million de néphrons (1). Le néphron est composé d'une unité de filtration appelée le glomérule suivi d'un long tube de segments différenciés composé par le tube contourné proximal, l'anse de Henlé et le tube contourné distal. Le processus de filtration dans le glomérule est sélectif selon la taille et la charge de la molécule, empêchant ainsi le passage de grosses molécules, en particulier celles chargées négativement (7).

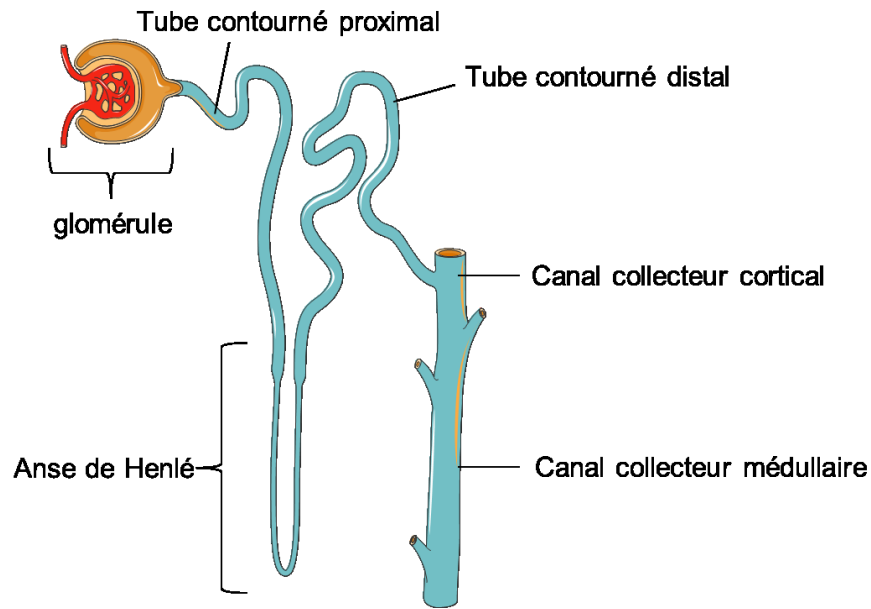


Figure 1.2: Le néphron

Schématisation des différentes parties d'un néphron. Illustration réalisée à l'aide de Servier Medical Art.

Seules les petites molécules solubles telles l'eau, les solutés et les protéines de taille inférieure à l'albumine vont traverser au-delà du glomérule (7). L'ultrafiltrat qui en résulte est ensuite profondément modifié durant le passage tubulaire, incluant des étapes de réabsorption et de sécrétion tubulaire. Ainsi, malgré les 180 L de plasma filtrés qu'ils traitent quotidiennement, les reins excrètent seulement entre 1 à 5 L d'urine par jour (1).

Au-delà de sa fonction excrétoire, le rein possède également une fonction métabolique et endocrine. En effet, le rein participe au métabolisme de formation de la vitamine D, à la sécrétion de l'érythropoïétine et à la sécrétion de la rénine (1). De plus, plusieurs protéines incluant les hormones, les protéines de transport et les

enzymes sont réabsorbées et métabolisées par les cellules du tube contourné proximal (7). En parallèle, le rein occupe un rôle au niveau de la balance hydro-électrolytique en régularisant la sécrétion du potassium et du sodium (1). Il joue également un rôle dans l'élimination des déchets (détoxification) (1). Enfin, le rein est impliqué dans plusieurs processus homéostatiques incluant la régulation de la pression artérielle, du rythme cardiaque, de la ventilation pulmonaire; de l'oxygénation tissulaire, de l'état acido-basique, ainsi que de la balance phospho-calcique (1).

L'IRC se distingue de l'insuffisance rénale aiguë principalement par sa durée et son évolution; elle survient lorsqu'il y a une atteinte progressive et irréversible au niveau de la structure et la fonction du rein (1). Ainsi, presque tous les troubles qui portent atteinte aux reins peuvent évoluer vers une IRC. Ceci inclut donc les infections chroniques du tissu fonctionnel du rein (telles la pyélonéphrite chronique), les maladies polykystiques des reins (telles la polykystose autosomique), la présence de calculs rénaux, les néphropathies glomérulaires et interstitielles, ainsi que l'insuffisance rénale aiguë qui peut se développer en une IRC (5, 8). Aussi, parce qu'il est un organe très vascularisé, des dommages au rein peuvent être une conséquence de n'importe quels désordres vasculaires chroniques, en particulier le diabète (menant à une néphropathie diabétique) et l'hypertension artérielle, soit les deux causes principales d'IRC (1). Alors que l'albuminurie (forte présence d'albumine dans l'urine) est souvent un signe qu'il y a eu un dommage au niveau de la structure du rein, la diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) indique qu'il y a un défaut fonctionnel au niveau du rein (5). Étant donné que le DFG joue un rôle

important dans la pathophysiologie de la maladie rénale, c'est la donnée utilisée en clinique pour classifier les différents stades d'IRC, allant du stade 1 (DFG de plus de 90 mL/min par 1.73 m²) au stade 5 (DFG de moins de 15 mL/min par 1.73 m²) (5).

1.1.3 Les complications associées à l'IRC

En raison du rôle central qu'occupe le rein dans plusieurs processus homéostatiques, une affection de celui-ci peut mener au développement d'une variété de troubles associés. Les principaux sont l'anémie, les complications osseuses, l'hypertension, et les complications cardiovasculaires liées à l'athérome (incluant les épisodes d'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque) (1, 6). À côté de ces troubles, on retrouve également le syndrome urémique. Par définition, le syndrome urémique se réfère à l'ensemble des effets néfastes que peuvent causer l'accumulation de toxines urémiques, celles-ci étant les composés issus du métabolisme normalement éliminés par le rein qui sont désormais en rétention dans la circulation systémique (9, 10). Cette conséquence secondaire de l'IRC contribue à la présence de plusieurs défauts observés chez les patients IRC dont le stress oxydant (11, 12), l'inflammation (13, 14), la résistance à l'insuline (12, 15) et la dyslipidémie (14, 16). L'IRC est donc une maladie très hétérogène, et les désordres associés sont souvent difficiles à contrôler (5).

Parmi tous les troubles associés à l'IRC, ce sont les complications cardiovasculaires qui sont les plus délétères et représentent la cause principale de décès dénotés en IRC (1, 6, 17, 18). Les patients atteints d'IRC ont un plus grand

risque de mourir de complications cardiovasculaires que de stade terminal d'insuffisance rénale (2, 3). De plus, les patients IRC souffrant de complications cardiovasculaires ont une diminution de la qualité de vie; une surmorbidity est fréquemment observée chez ces patients (3, 4). La présence de plusieurs désordres au cours de l'IRC peut favoriser le développement de complications cardiovasculaires. Les plus fréquemment dénotés sont l'hypertension, la rétention hydro-sodée, la dyslipidémie, les dérégulations hydro-électrolytes et acido-basiques (5, 6, 19) . Malgré les efforts thérapeutiques voulant cibler ces facteurs de risques cardiovasculaires, le nombre d'évènements de décès cardiovasculaires n'a pas diminué au sein de la population IRC, et la présence de ces facteurs ne peuvent expliquer à eux seuls la surmortalité et surmorbidity cardiovasculaire (20). D'autres facteurs doivent donc être pris en compte (3).

1.1.4 L'IRC et la dérégulation de l'homéostasie glucidique

Il y a de plus en plus d'évidences démontrant que les patients IRC sont susceptibles à une dérégulation de l'homéostasie glucidique (21, 22). Indépendamment des individus atteints de néphropathie diabétique, plus de 50 % des patients IRC démontrent une homéostasie glucidique perturbée, qui se présente entre autres par une intolérance au glucose, c'est-à-dire une incapacité à retrouver un niveau de glycémie normal suite à l'ingestion de glucose et/ou une hyperglycémie à jeun (21-24). Ces patients présentent donc un état de pré-diabète défini par un niveau anormalement élevé de la glycémie (sans pour autant être suffisamment

élevée pour satisfaire les critères du diagnostic du diabète) (22). Ce phénomène jouerait un rôle central dans le développement de complications cardiovasculaires réduisant ainsi leur longévité (25-27). En effet, une étude récente a démontré qu'une augmentation dans la valeur de l'hémoglobine glyquée (HbA1c), valeur clinique utilisée pour évaluer la concentration plasmatique du glucose sur une longue période de temps (6 à 8 semaines), a été corrélée négativement avec la survie des patients IRC (26). Cette hyperglycémie est souvent associée à une hyperinsulinémie et une dyslipidémie, soit deux caractéristiques retrouvées au cours du diabète de type 2 (forme du diabète la plus répandue à travers le monde) (21, 28). Cet état pré-diabétique retrouvé au sein de la population urémique indique donc que les mécanismes de régulation glucidique sont altérés (ces mécanismes qui impliquent une sécrétion adéquate et une action efficace de l'insuline seront discutés dans la section suivante) (21, 29). Il y a donc une perte dans la capacité à contrôler les niveaux glycémiques au cours de l'urémie. Une perturbation de l'homéostasie glucidique peut être due à une déficience et/ou à une résistance à l'insuline.

La résistance à l'insuline a été mise en évidence au cours de l'IRC il y a plus de 30 ans et permettait d'expliquer cette intolérance au glucose présente chez les patients urémiques (20, 30, 31). En effet, en 1981, DeFronzo et collègues (32) ont démontré pour la première fois à l'aide de la technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique (technique permettant d'évaluer la résistance à l'insuline *in vivo*) que les tissus périphériques présentent une baisse de sensibilité à l'insuline. Depuis, plusieurs autres études ont confirmé ces données (20, 33, 34). Les causes de cette résistance à l'insuline au cours de l'urémie sont multiples et sont associées à

plusieurs facteurs dont l'accumulation de toxines urémiques (20). Récemment, plusieurs équipes ont mis en évidence l'implication de différentes toxines urémiques dans la dérégulation glucidique liée à la résistance à l'insuline telles le p-cresyl sulfate, la pseudouridine et l'urée (12, 15, 35). Toutes ces études, de même que les données chez l'homme, ont montré que la résistance à l'insuline s'explique par un défaut intracellulaire dans la voie de signalisation de l'insuline (20, 21, 31).

Peu d'études se sont penchées sur la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'urémie, soit le second défaut qui pourrait expliquer cette intolérance au glucose observée au sein des patients IRC. Celles qui ont été dévoilées démontrent beaucoup de divergence. En effet, certaines études qui ont évalué la sécrétion de l'insuline lors de clamps hyperglycémiques ou de tests de tolérance au glucose ont démontré soit une hypersécrétion d'insuline (36), soit une diminution de la sécrétion d'insuline (37), ou enfin aucun changement quant à la capacité sécrétoire (30). Récemment, de Boer et collègues (38) ont montré que chez la plupart de leurs sujets IRC non diabétiques et présentant une baisse de sensibilité à l'insuline, la sécrétion d'insuline n'est pas suffisante pour maintenir une glycémie normale, indiquant que la capacité sécrétoire de la cellule bêta-pancréatique est également perturbée au cours de l'IRC. Enfin, certaines études utilisant des modèles de rats ou souris urémiques ont montré une perturbation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (39-41). Cependant, les mécanismes impliqués dans la défaillance de la cellule bêta-pancréatique sont pour l'instant inconnus.

On constate donc que la relation entre la fonction de la cellule bêta-pancréatique et l'urémie n'est pas totalement établie. Afin d'évaluer la capacité sécrétoire de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC, il est important de bien comprendre comment la cellule bêta répond aux différents stimuli en contexte physiologique et pathologique, et en quoi l'environnement urémique pourrait perturber sa fonction.

1.2 Homéostasie glucidique

1.2.1 Généralités

Le corps est doté d'un système de régulation robuste pour maintenir des niveaux normaux de glucose dans le sang (5.0-7.2 mmol/L) (42), autant en période de jeûne qu'en période postprandiale. Ceci assure un apport énergétique constant pour l'ensemble des organes; le glucose étant la source primaire d'énergie utilisée par les tissus. Le maintien de l'homéostasie glucidique est primordial pour le bon fonctionnement du corps et toute perturbation de cette homéostasie aura des répercussions physiologiques néfastes sur l'organisme (43, 44). Alors que la disposition du glucose à travers l'organisme peut se faire de manière indépendante de l'action de l'insuline (45), la grande majorité des organes clés impliqués dans le système de régulation de l'homéostasie glucidique répondent à l'insuline (46). Ainsi, cette régulation glucidique qui implique plusieurs organes est centralisée vers le pancréas endocrine (44).

1.2.2 Le pancréas et sa fonction endocrine

Le pancréas est un organe glandulaire localisé dans la cavité abdominale. On peut le diviser en 3 parties : la tête qui se repose à l'intérieur de la concavité du duodénum, le corps qui se trouve derrière l'estomac, et la queue qui tend vers la rate. Cet organe fait partie du système digestif. Par le conduit pancréatique principal dont le trajet débute au niveau de la queue pour se diriger vers la tête et s'unir avec

l'extrémité inférieure du conduit cholédoque (formant l'ampoule hépatopancréatique), le pancréas déverse ses enzymes digestives pancréatiques dans la lumière du duodénum lors du processus de digestion.

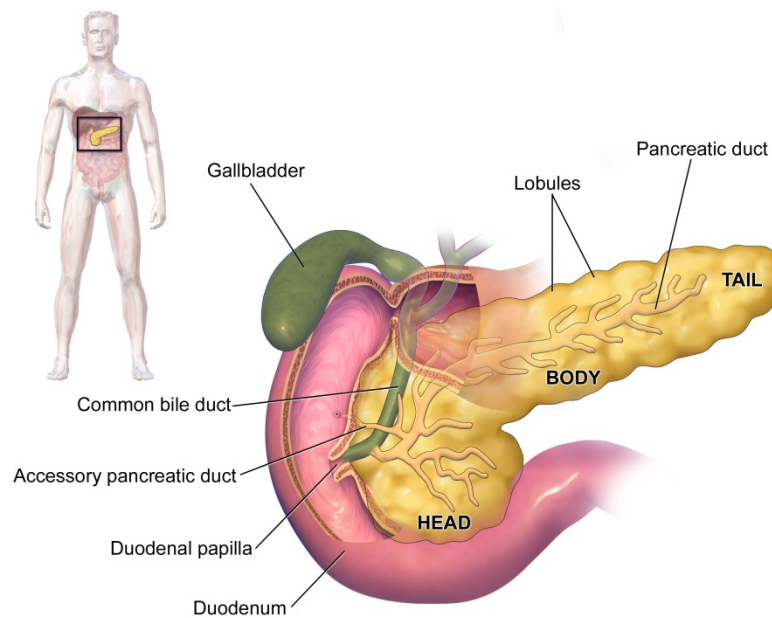


Figure 1.3: Anatomie du pancréas

Illustration du pancréas à l'intérieur du système digestif. Image soustrée de Blausen Medical Gallery 2014

Le pancréas est composé majoritairement des cellules acinaires et ductales qui lui confèrent sa fonction exocrine (47). À côté de cette fonction, le pancréas contient également une fonction endocrine qui joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie. Les cellules endocrines du pancréas sont regroupées en amas dans des structures bien organisées appelées îlots de Langerhans. Les cellules formant l'îlot sont les cellules alpha, bêta, delta, PP et epsilon (44). Elles sécrètent respectivement les hormones suivantes : le glucagon, l'insuline, la somatostatine, le

polypeptide pancréatique et la ghréline. L'insuline est l'hormone qui provoque la diminution de la glycémie lorsque celle-ci est élevée. À l'inverse, lorsque la glycémie est trop basse, le glucagon sera relâché dans la circulation sanguine par les cellules alpha afin de ramener à un niveau normal la glycémie, évitant ainsi un état d'hypoglycémie lors de périodes de privation de nutriments (44). Les trois autres hormones de l'îlot jouent principalement un rôle de régulation à l'intérieur de l'îlot (effet paracrine) (44). Les îlots sont très vascularisés par un réseau endothélial étendu; ils sont également innervés par des nerfs sensitifs du système sympathique et parasymphatique (47).

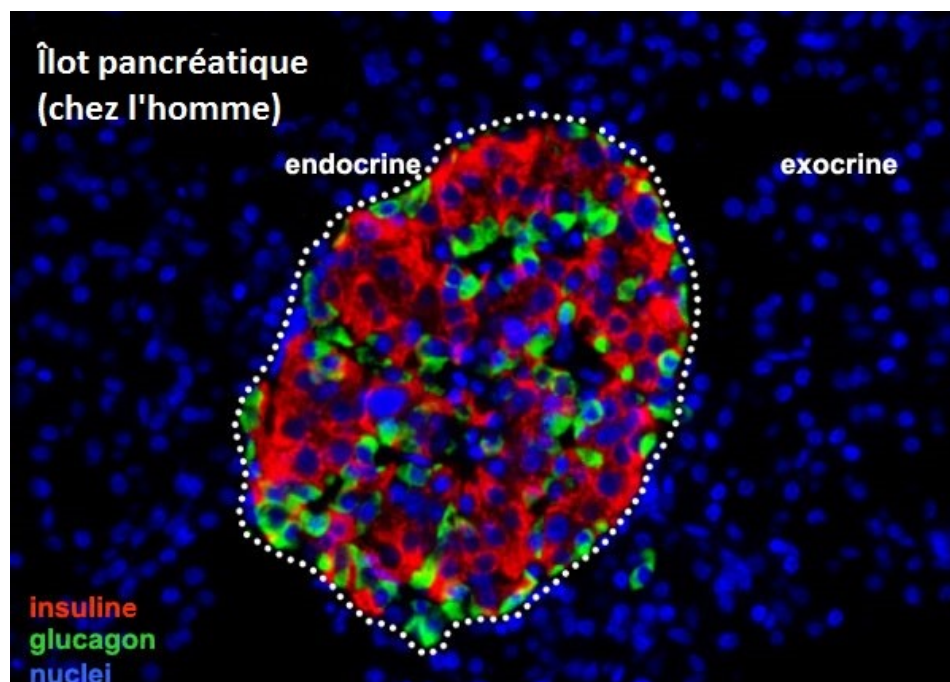


Figure 1.4: Section d'un îlot de Langerhans chez l'homme

Marquage par immunohistochimie de l'insuline (rouge), du glucagon (vert) et des noyaux (bleu) sur une coupe d'îlot pancréatique humain. L'insuline représente plus de 50 % de l'îlot. Adaptée de (48).

Les cellules bêta sont les cellules les plus abondantes de l'îlot; chez l'humain, elles représentent plus de 50% des cellules de l'îlot (44). En raison de ses actions anabolisantes sur ses tissus cibles qui permettent entre autres une utilisation adéquate des substrats énergétiques, l'insuline joue un rôle primordial dans la régulation hormonale de l'homéostasie glucidique. Ainsi, les besoins énergétiques de l'organisme dépendent d'une production adéquate d'insuline. La cellule bêta est équipée pour détecter l'état nutritionnel de l'organisme afin de sécréter, d'une manière finement régulée, l'insuline.

1.2.3 La métabolisme du glucose et la sécrétion de l'insuline dans la cellule bêta-pancréatique

Plusieurs facteurs vont promouvoir la relâche de l'insuline par la cellule bêta-pancréatique lorsque celle-ci est stimulée. Le glucose est le principal sécrétagogue de cette cellule et son métabolisme est primordial au mécanisme de sécrétion d'insuline (49). Le glucose pénètre la cellule par le transporteur à glucose GLUT2 chez les rongeurs (ou GLUT1 chez l'homme) (44, 49). Le transport du glucose dépend uniquement de la concentration extracellulaire de glucose. En effet, GLUT2 a un Km très élevé, indiquant qu'il est actif seulement lorsque les concentrations extracellulaires de glucose sont élevées telles qu'observées en état postprandiale (44, 49). Dans ce contexte, GLUT2 va favoriser l'entrée du glucose afin d'équilibrer les concentrations extra- et intracellulaire de glucose. L'entrée du glucose va aboutir à sa dégradation glycolytique en pyruvate. Ce flux vers la glycolyse est maintenu à

grandes concentrations de glucose grâce à la glucokinase (isoenzyme de l'hexokinase) qui catalyse l'étape limitante de la conversion du glucose en glucose-6-phosphate (G-6-P), soit la première étape de la glycolyse. Et, contrairement aux autres hexokinases, la glucokinase n'est pas inhibée par son produit (le G-6-P) ce qui favorise le maintien d'un flux élevé à travers la glycolyse (44, 49).

La voie classique de la sécrétion d'insuline passe par le métabolisme oxydatif du glucose. Ainsi, le pyruvate métabolisé en acetyl CoA dans les mitochondries entre dans le cycle de l'acide citrique. Ce cycle génère la production d'équivalents réducteurs utilisés au cours de la chaîne respiratoire mitochondriale. La phosphorylation oxydative qui s'en suit mène à la production d'adénosine triphosphate (ATP). L'utilisation et l'oxydation du glucose qui aboutit à cette élévation d'ATP est centrale pour induire la sécrétion d'insuline dans la cellule bêta (44). Une augmentation du niveau d'ATP ou plus précisément du ratio ATP/adénosine diphosphate va provoquer la fermeture du canal de potassium sensible à l'ATP (canal K^+ATP), canal qui est le déterminant principal du potentiel membranaire de la cellule bêta (50). La dépolarisation de la membrane causée par la fermeture du canal K^+ATP va induire l'ouverture du canal à calcium voltage-dépendant (VDCC) (50). Il y aura ainsi un influx de calcium dans la cellule, provoquant une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). Enfin, cette augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ va ultimement favoriser la libération de l'insuline préalablement emmagasinée dans des granules sécrétoires localisées près de la membrane (50).

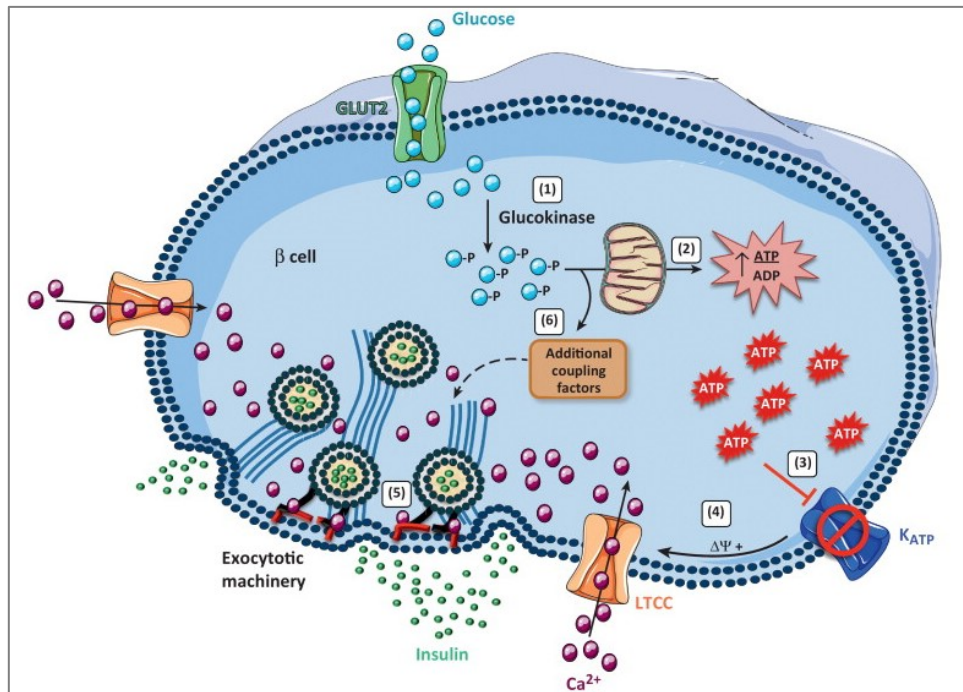


Figure 1.5: Mécanisme de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose dans la cellule bêta-pancréatique

Le mécanisme de la sécrétion d'insuline implique plusieurs étapes clés : soit l'utilisation du glucose à travers la glycolyse (1), l'oxydation du glucose menant à la génération d'ATP (2); la fermeture du canal K^+ATP (3), la dépolarisation membranaire (4) et l'influx calcique provoquant l'exocytose de l'insuline (5). D'autres facteurs additionnels provenant du métabolisme du glucose vont amplifier le signal de sécrétion d'insuline (6). Adaptée de (51).

La cellule bêta répond à d'autres nutriments que le glucose (tels les acides aminés, les acides gras libres, et les corps de cétones) et est très sensible aux stimuli neurohormonaux (incluant l'action de l'acétylcholine et du « glucagon-like peptide-1 ») (44, 49). En synergie avec l'effet du glucose, ces différents sécrétagogues jouent un rôle important dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline (49, 50). Leur métabolisme ou la voie de signalisation intracellulaire qu'ils

vont enclencher module la sécrétion d'insuline à différents niveaux (49). Ainsi, le métabolisme du glucose est nécessaire à la sécrétion d'insuline, mais d'autres facteurs qui sont des molécules intermédiaires ou cofacteurs impliqués dans les différentes étapes du métabolisme des acides aminés ou des lipides par exemple sont requis pour l'amplification du signal. Ces métabolites appelés *facteurs de couplage métabolique* exercent leur effets sur différentes cibles afin d'influencer la biosynthèse et la sécrétion d'insuline à différentes étapes (49, 50, 52). Sans tous les nommer, on retrouve le citrate, le NADH/NAD⁺ et le diacylglycérol parmi les candidats de facteurs de couplage qui jouent un rôle métabolique dans la sécrétion d'insuline (49). On constate donc l'implication de plusieurs acteurs qui promeuvent une relâche d'insuline bien orchestrée par la cellule bêta selon l'état nutritif de l'organisme.

1.2.4 L'action périphérique de l'insuline

Composée de 51 acides aminés, l'insuline est une hormone clé dans la régulation de l'homéostasie glucidique; c'est la seule hormone hypoglycémiant de l'organisme (47). Lorsqu'elle est dans la circulation sanguine, elle a un effet anabolisant sur ses tissus cibles et favorise l'utilisation du glucose circulant. Les principaux tissus qui répondent à l'insuline sont le foie, le muscle et le tissu adipeux (53). L'action de l'insuline passe principalement par la voie de signalisation PI3K/AKT (54). La liaison de l'insuline sur son récepteur, récepteur de type tyrosine kinase, stimule l'activité intrinsèque de tyrosine kinase du récepteur, phosphorylant ainsi des

protéines cibles telles les substrats intracellulaires du récepteur à l'insuline (IRS) (54). Les IRS phosphorylés induisent le recrutement et l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (54). La PI3K se lie par la suite à l'enzyme AKT et participe à son activation en la phosphorylant (54). Une fois AKT activé, plusieurs voies d'intégration sont déclenchées. Alors que l'activation d'AKT par l'insuline sur le muscle et le tissu adipeux permet respectivement la synthèse du glycogène et des triglycérides, dans le foie l'insuline provoque l'inhibition de la néoglucogénèse (53, 54). De plus, l'activation d'AKT promeut la translocation membranaire du transporteur à glucose GLUT4 pour permettre l'entrée du glucose utilisé comme source d'énergie dans le muscle et le tissu adipeux (53). L'insuline a également comme effet de restreindre la dégradation des lipides dans le tissu adipeux (53). On constate donc que la régulation du métabolisme du glucose dépend autant de la sécrétion que de l'action de l'insuline. Étant donné que l'insuline est produite exclusivement par la cellule bêta-pancréatique, le maintien de l'intégrité de cette cellule est primordial pour la conservation de l'homéostasie glucidique.

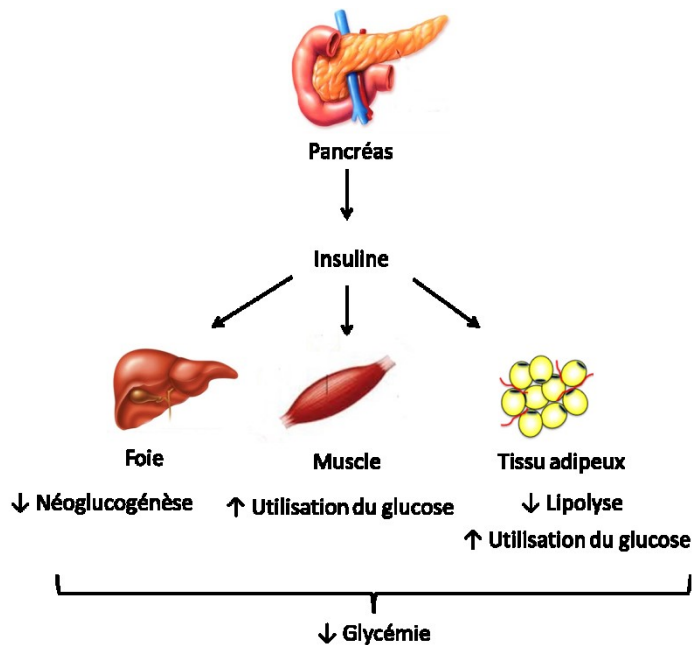


Figure 1.6: Régulation de la glycémie par l'insuline

La cellule bêta-pancréatique sécrète l'insuline lorsque la glycémie est élevée. L'action de l'insuline sur les principaux tissus périphériques provoque la baisse de la glycémie.

1.2.5 La cellule bêta-pancréatique et le stress oxydant

Afin de maintenir l'homéostasie glucidique, la cellule bêta-pancréatique module constamment sa sécrétion d'insuline en réponse aux divers signaux énergétiques et hormonaux, et lorsque la demande est élevée (par exemple en contexte d'excès chronique de nutriments), la cellule bêta va répondre en conséquence, toujours proportionnellement à la demande (52). Ainsi, contrairement à la grande majorité des cellules qui, dans un contexte similaire, utilisent des mécanismes de protection (la résistance à l'insuline en ferait partie (52)) afin d'éviter une dysfonction cellulaire que peut engendrer une surcharge de nutriments

énergétiques, la cellule bêta reste alerte et sensible aux stimuli externes. Dans son rôle de *senseur* de l'état nutritif de l'organisme, la cellule bêta est vulnérable à la toxicité que peut provoquer une mise en marche constante de ses mécanismes et voies de signalisations (52). Une élévation dans le métabolisme intracellulaire du glucose peut induire une augmentation du stress oxydant. Le stress oxydant a lieu lorsqu'il y a une surproduction ou une élimination non adéquate d'espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species », ROS) ou d'espèces réactives de l'azote (55). Une production constante d'ATP (dû à un état d'hyperglycémie par exemple) favorise la génération de ROS qui s'échappent de la chaîne respiratoire mitochondriale (55). Les ROS sont également produites par les enzymes NADPH oxydase (55, 56). La cellule bêta est particulièrement vulnérable à la toxicité liée au stress oxydant (57). D'une part, la cellule bêta exprime un faible niveau d'enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase et glutathione peroxidase) (52, 57). La détoxification des ROS dans la cellule bêta est donc moins efficace dans un contexte d'excès chronique de nutriments. D'autre part, la présence excessive de ROS a un impact néfaste sur des voies métaboliques dans la cellule bêta. Par exemple, il a été démontré que l'enzyme GAPDH (voie de la glycolyse) peut être inhibé partiellement par les ROS, ce qui résulte en une accumulation de plusieurs métabolites tels le glucose, le G-6-P, et le glycéraldéhyde-3-phosphate, qui se trouvent en amont dans la voie (43). Des dommages hyperglycémiques sont donc causés en raison de l'accumulation de ces métabolites. Par ailleurs, une augmentation de ROS due à l'hyperglycémie peut provoquer une réduction dans la transcription du gène de l'insuline (55). Il a été démontré en effet qu'une surcharge

de ROS diminue la liaison des facteurs de transcription PDX-1 et MafA avec le promoteur du gène à l'insuline (58); et l'ajout d'antioxydants prévient cette diminution de l'expression de l'insuline causée par l'hyperglycémie (59, 60). On constate donc que le stress oxydant a un impact néfaste sur l'intégrité de la cellule bêta-pancréatique. D'ailleurs, le stress oxydant joue un rôle significatif dans la pathogénèse du diabète, en particulier le diabète de type 2 (43, 57, 61). Ainsi, une activation chronique et prolongée de ROS est délétère pour la cellule bêta.

1.2.6 La cellule bêta-pancréatique et la voie des hexosamines

Bien que les voies alternatives du métabolisme du glucose comme la voie des pentoses phosphates ou la voie de synthèse du glycogène soient très limitées dans la cellule bêta (49, 62), la voie des hexosamines est utilisée. Entre 2 à 3 % du glucose qui pénètre dans la cellule sera déviée vers la voie des hexosamines (63). La glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), soit l'enzyme limitante de cette voie, catalyse la première réaction et utilise le fructose-6-phosphate (produit lors de la deuxième étape de la glycolyse) comme substrat. Cette voie aboutit à la formation de l'uridine-5-diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), soit le substrat glucidique utilisé pour les réactions de glycosylation (63). Les réactions de glycosylation sont des réactions de modifications post-traductionnelles de protéines. Lorsque l'ajout du substrat glucidique a lieu sur un groupement hydroxyle de résidus sérine ou thréonine, on utilise le terme *O-glycosylation* (64). L'enzyme O-GlcNAc transferase (OGT) catalyse les réactions d'O-glycosylation.

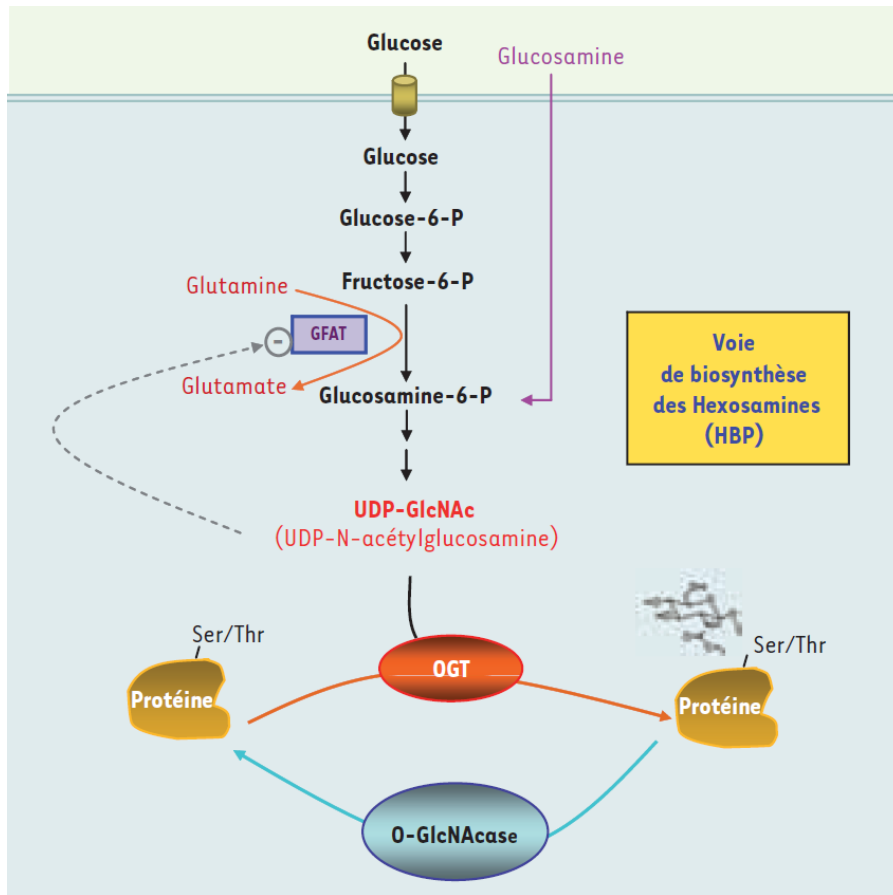


Figure 1.7: La voie des hexosamines

Le fructose-6-P est dérivé de la glycolyse vers la voie des hexosamines. La voie des hexosamines aboutit à la formation du substrat UDP-GlcNAc utilisée lors des réactions d'O-glycosylation. Adaptée de (65).

Similaire aux réactions de phosphorylation, les modifications post-traductionnelles d'O-glycosylation affectent les protéines au niveau de leur stabilité, leur localisation, leur activité et leurs interactions protéiques (63). Les réactions d'O-glycosylation sont importantes pour l'activité fonctionnelle du pancréas endocrine. En effet, lorsque les facteurs de transcription PDX-1 et MafA sont O-glycosylés, ceci

augmente leur activité de liaison à l'ADN sur le promoteur du gène de l'insuline (66, 67). Cependant, en contexte de stress physiologique (stress nutritif, stress oxydant, hypoxie), le niveau basal d'O-glycosylation est augmenté et ceci peut provoquer des effets néfastes (68).

Tout comme le stress oxydant, l'O-glycosylation est impliquée dans la pathogénèse des complications du diabète (68, 69). En effet, provoqué principalement par l'hyperglycémie (70), l'O-glycosylation de protéines (comme Sp1 et Munc18c) est observés dans différents types cellulaires (respectivement les cellules endothéliales et adipocytes) et est associée à plusieurs effets délétères observés au cours du diabète, principalement liés à la résistance à l'insuline (71, 72). Dans la cellule bêta, une augmentation de l'O-glycosylation des protéines est présente en condition d'hyperglycémie (68). Cette augmentation est associée d'une part, à la perturbation de la sécrétion de l'insuline (73) et, d'autre part, à l'apoptose (74, 75). De plus, dans des îlots isolés de souris transgéniques qui surexpriment GFAT spécifiquement dans la cellule bêta, le métabolisme du glucose est altéré (diminution de l'oxydation du glucose), aboutissant à une réduction de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (76). Ainsi, une augmentation chronique du niveau d'O-glycosylation est néfaste pour le maintien de l'intégrité de la cellule bêta-pancréatique.

1.2.7 Dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'urémie

Certaines équipes ont étudié l'effet de l'environnement urémique sur la fonction de la cellule bêta-pancréatique. L'équipe de Massry (39) fut l'une des premières à observer une dysfonction de la cellule bêta en contexte urémique. Au cours de leurs études, ils ont utilisé un modèle de rats urémiques (néphrectomie des 5/6^{ème}, soit un modèle chirurgical qui consiste à l'électrocoagulation des extrémités des pôles du rein droit suivie de l'ablation complète du rein gauche). L'équipe de Massry a observé chez ces rats une accumulation anormale de calcium à l'intérieur de l'îlot en raison de la forte présence de la parathormone dans le milieu urémique. Cette élévation basale de calcium interfère avec le processus normal de sécrétion d'insuline menant, par conséquent, à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ils ont également observé une réduction de l'activité de l'enzyme phosphofructokinase-1 (PFK1, seconde enzyme limitante de la glycolyse), une baisse en contenu d'ATP, et une perturbation de l'activité mitochondriale. Une autre équipe a étudié la fonction de la cellule bêta au cours de l'IRC en utilisant un autre modèle de rats IRC (rats uninephrectomisés) (41). Dans ce modèle, les rats ont également démontré une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Celle-ci était cependant associée à un déficit de cellules bêta (perte de masse), indépendamment du mécanisme intracellulaire de sécrétion d'insuline. En effet, les auteurs ont expliqué que l'activation du système rénine-angiotensine non contrôlée au cours de l'IRC provoque l'activation du facteur TGF- β 1. Et ce facteur cause la fibrose des îlots, induisant ainsi une perte de cellules endocrines.

Récemment, l'effet de la toxine urémique CMPF (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid) sur la cellule bêta a été étudié (77). Cette étude fut l'une des premières à vérifier l'effet direct d'une toxine urémique sur la fonction de la cellule bêta-pancréatique. Prentice et al. ont démontré que lorsqu'on administre cette toxine en concentrations pathologiques retrouvées au cours de l'IRC à des souris ayant une fonction rénale normale, celles-ci présentent une intolérance au glucose, une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ainsi qu'une baisse de l'utilisation du glucose. Ils ont également démontré que le CMPF affecte directement la cellule bêta-pancréatique en provoquant une perturbation de la fonction mitochondriale, une diminution de la production d'ATP en réponse au glucose, et induit un stress oxydatif. Les auteurs proposent un mécanisme dans lequel les facteurs de transcriptions clés sont dérégulés dans un tel contexte, menant ultimement à une baisse de biosynthèse d'insuline. Cette baisse de synthèse explique donc la diminution de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ces études démontrent ainsi que la cellule bêta-pancréatique est vulnérable aux composantes du milieu urémique, et que les toxines urémiques peuvent avoir un impact directe sur la fonction de la cellule bêta.

1.3 L'urée, toxine urémique majeure

1.3.1 Généralités

Les composantes du milieu urémique sont appelés *toxines* car elles peuvent nuire au bon fonctionnement de différents processus biologiques lorsqu'elles sont en rétention dans la circulation systémique (14). Plusieurs d'entre elles ont démontré leur effet toxique entre autres au niveau des tissus cardiaque, musculaire, et de l'endothélium (9). Le European Uremic Toxin Work Group a publié en 2003 une liste des 90 composés retrouvés au cours de l'IRC, et depuis, d'autres toxines urémiques ont été rajoutées à cette liste (78). Les toxines urémiques sont classifiées selon leurs propriétés physicochimiques qui influencent leur élimination par dialyse. La première classe est celle des petites molécules solubles dans l'eau, et l'urée en est le prototype (14). Puisque la dialyse n'est mise en place que lorsque la fonction rénale est inférieure à 10 % (en stade terminal de la maladie rénale) (79), en règle général, l'urée reste constamment dans le milieu urémique au cours de l'IRC, faisant de cette molécule l'une des toxines majeures en rétention.

1.3.2 Production et élimination de l'urée

L'urée est une petite molécule ($\text{O}=\text{C}(\text{-NH}_2)_2$) polaire (80). Elle est synthétisée dans le foie lors du processus de détoxification de l'ammoniac (cycle de l'urée); elle est donc un produit dérivé de la dégradation des protéines. Lorsqu'elle est en circulation à long terme dans l'organisme, l'urée peut diffuser passivement à travers

la membrane des cellules afin d'atteindre un état d'équilibre. Le principal destin de l'urée est cependant son élimination par les reins.

Le néphron est doté de transporteurs à urée pour faciliter son transport (80, 81). Le transport de l'urée à travers les différentes parties du néphron est important pour le processus de concentration des urines (81, 82). Au cours de ce processus, un gradient d'urée à haute osmolarité est créé ce qui provoque la réabsorption de l'eau à travers le néphron. La physiologie rénale nécessite donc l'élimination de l'urée lors du processus de concentration des urines afin de maintenir une osmolarité plasmatique constante (82).

1.3.3 L'urée, molécule inerte?

L'urée a longtemps été considérée comme étant une molécule qui n'avait aucun impact biologique ou biochimique significatif dans l'organisme, aux concentrations retrouvées au cours de l'IRC. Dans une étude du Mayo Clinic menée par Johnson et collègues (83) en 1972, de l'urée était ajoutée dans le dialysat de patients en stade avancée d'IRC pendant trois mois consécutifs atteignant des concentrations plus élevées que celles observées en pré-dialyse. Malgré cette élévation d'urée plasmatique, les symptômes urémiques n'étaient pas modifiés. Par ailleurs, l'étude HEMO parue en 2002 a montré qu'une augmentation au niveau de l'intensité de la dialyse (permettant entre autres de réduire de 66 à 75 % la concentration plasmatique d'urée) ne modifiait pas significativement la survie de ces patients (84). Étant donné que ni l'ajout, ni le retrait de l'urée n'avait un impact sur la

pathophysiologie des patients IRC, ces deux études ont su convaincre la communauté de néphrologues de la *non-toxicité* de l'urée au cours de l'IRC. Cependant, des données récentes de la littérature viennent confronter ce dogme.

De nouvelles études cliniques ont dévoilé que la dialyse prescrite quotidiennement ou l'utilisation de l'hémodiafiltration, soit deux méthodes reconnues pour favoriser davantage l'élimination de plusieurs toxines dont l'urée est un marqueur, améliore en effet la survie des patients qui souffrent d'IRC en stade avancé (85). Différentes études *in vitro* et *in vivo* ont par ailleurs appuyé ces données en affirmant l'effet néfaste de l'urée à des concentrations retrouvées au cours de l'IRC. Vaziri et al. (86) ont su démontrer que l'urée peut causer des ruptures au niveau des jonctions cellulaires intestinales, ce qui permet d'expliquer en partie la présence d'une dysfonction de la barrière intestinale que l'on retrouve chez les patients urémiques en stade avancé de maladie rénale. De plus, dans des cellules musculaires lisses, l'apoptose est déclenchée suite à une exposition chronique à l'urée (87). Par ailleurs, l'effet toxique de l'urée peut être lié à sa dégradation en cyanate, soit une molécule très instable qui peut interagir avec d'autres molécules en induisant des carbamylations (88). Le cyanate est d'ailleurs connu pour jouer un rôle dans l'accélération de la progression de l'athérosclérose au cours de l'IRC en induisant une dysfonction vasculaire via la carbamylation de protéines (89).

La capacité de l'urée à induire un stress oxydant a été reportée plusieurs fois (12, 90, 91). D'une part, Zhang et al. (92) ont démontré que l'urée provoque la carbonylation de protéines, soit un marqueur général de dommage protéique oxydatif

sévère. Ils ont aussi montré que l'urée provoque des lésions de type 8-oxoguanosine dans l'ADN résultant de l'oxydation de la guanine. D'autre part, lorsque l'urée se décompose en cyanate, ce dernier composé peut inhiber l'activité antioxydante et cytoprotective de différentes molécules incluant le sulfate d'hydrogène et la cystéine (93, 94). Également, l'urée provoque la dysfonction endothéliale au cours de l'IRC par l'induction de ROS (95). Enfin, dans un contexte de dérégulation glucidique, une exposition chronique du tissu adipeux à l'urée favorise la production excessive de ROS associée à la résistance à l'insuline retrouvée au sein de souris urémiques (12). Les auteurs ont démontré que ce stress oxydant provoque une augmentation des O-glycosylations des protéines incluant IRS-1, perturbant ainsi la voie de signalisation de l'insuline. Toutes ces nouvelles données illustrent le potentiel toxique de l'urée, et son rôle dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique reste à être vérifié.

1.4 Mise en contexte de l'article

1.4.1 Hypothèse et objectifs

L'IRC touche près d'un dixième de la population mondiale et est considérée comme un problème majeur de santé publique. Elle est associée à une forte mortalité et morbidité cardiovasculaire, et la présence d'une dérégulation glucidique participerait à cette surmortalité. Plus de 50 % des patients souffrant d'IRC présentent un défaut du métabolisme glucidique. L'homéostasie glucidique dépend de la production suffisante d'insuline par la cellule bêta-pancréatique et de l'action adéquate de l'insuline sur les tissus périphériques. Alors que l'insulino-résistance est bien caractérisée au cours de l'urémie, on en connaît très peu sur les mécanismes de la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique. Dans notre laboratoire, nous avons utilisé des souris C57Bl/6N qui ont subi une néphrectomie des 5/6^{ième} afin d'étudier la fonction de la cellule bêta en contexte urémique. Contrairement aux souris C57Bl/6J, les souris C57Bl/6N ne possèdent pas de mutation au niveau du gène de la nicotinamide nucleotide transhydrogenase, soit une enzyme impliquée dans la détoxification de ROS (96, 97). Conséquemment, les souris C57Bl/6J sont plus susceptibles au stress oxydant que les souris C57Bl/6N (98). De plus, il est connu que les souris C57Bl/6J ont une capacité de sécrétion d'insuline plus faible que les souris C57Bl/6N (96). Ainsi, afin d'éviter ces biais, nous avons donc décidé d'utiliser les souris C57Bl/6N lors de nos études. Suite à l'induction de l'IRC par néphrectomie, nous avons observé chez ces souris une diminution de la sécrétion

d'insuline *in vivo* et *ex vivo* en réponse au glucose. De plus, le niveau d'O-glycosylation des protéines provenant d'îlots isolés de ces souris est augmenté. L'urée est l'une des toxines majeures accumulées au cours de l'IRC et sa capacité à interférer avec le bon fonctionnement de divers processus biologiques a été démontré récemment. Entre autres, dans le tissu adipeux, l'urée provoque une augmentation du stress oxydant et des O-glycosylations, perturbant ainsi la voie de signalisation de l'insuline. Mon projet de maîtrise avait donc pour but d'étudier le rôle de l'urée dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC. Basé sur nos données chez les souris IRC et les données de la littérature, nous émettons l'hypothèse selon laquelle l'urée est l'une des toxines urémiques qui provoque la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC, via un mécanisme d'augmentation du stress oxydant et de l'O-glycosylation des protéines impliquées dans le mécanisme de sécrétion d'insuline. Les objectifs de ce mémoire étaient 1- de déterminer si des concentrations pathologiques d'urée altèrent la sécrétion d'insuline, 2-d'évaluer le rôle du stress oxydant et des O-Glycosylations, et 3- de déterminer par quel mécanisme la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est perturbée.

1.4.2 Contribution des auteurs

Dr Laetitia Koppe a fait la conception du projet et a écrit le manuscrit. Elle a effectué la grande majorité des expériences *in vivo* (avec le modèle de souris IRC). Elle a donc réalisé la Figure 2.1; Figure 2.2; Figure 2.3 B, D, G, H; Figure 2.6; Figure 2.7 C

et Figure 2.8 A, B. Avec Elsa Nyam, elle a fait la Figure 2.4, Figure 2.7 A, B, D, E et Figure 2.8 C, D, F. Elle a également effectué l'ensemble de l'analyse des résultats.

Elsa Nyam a effectué la grande majorité des expériences *ex vivo* avec l'urée ainsi que l'ensemble des expériences de Western blot et d'immunohistochimie. Elle a donc réalisé la Figure 2.3 A, C, E, F; Figure 2.5; Figure 2.7 C et Figure 2.8 A, B, E. Elle a également participé à la Figure 2.4, Figure 2.7 A, B, D, E, F et Figure 2.8 C, D, F avec Laetitia Koppe. Enfin, elle a contribué à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Jocelyn E. Manning Fox et Xiao-Qing Dao ont réalisé l'expérience du patch-clamp (Figure 2.7 G)

Dr Camille Attané a aidé avec les expériences d'utilisation et d'oxydation du glucose (Figure 2.7 A, B, D, E).

Dr Valentine S. Moullé a aidé lors des sacrifices de souris (prélèvements de tissus) et à l'analyse des résultats.

Dr Patrick E. MacDonald a supervisé les expériences du patch-clamp (dans son laboratoire en Alberta) et a aidé à la révision du manuscrit.

Dr Julien Ghislain a aidé avec l'interprétation des résultats et a révisé le manuscrit.

Dr Vincent Poitout a aidé à la conception du projet et a supervisé les expériences. Il a analysé et interprété les résultats et écrit le manuscrit avec Laetitia Koppe.

Chapitre 2- Résultats

Article: « Urea impairs β -cell glycolysis and insulin secretion in chronic kidney disease »

Laetitia Koppe¹, Elsa Nyam^{1,2}, Jocelyn E. Manning Fox⁴, Xiao-Qing Dai⁴, Camille Attané¹, Valentine S. Moullé¹, Patrick E. MacDonald⁴, Julien Ghislain^{1,2}, Vincent Poitout^{1,2,3}

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

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

³Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

⁴Department of Pharmacology and Alberta Diabetes Institute, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

Corresponding author:

Vincent POITOUT, DVM, PhD

CRCHUM

900 Saint-Denis Street, Montréal, QC H2X 0A9 – Canada

Tel: +1 (514) 890-8044

Fax: +1 (514) 412-7648

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Disorders of glucose homeostasis are common in chronic kidney disease (CKD) and are associated with increased mortality. However, the mechanisms of impaired insulin secretion in CKD remain unclear. Here we tested the hypothesis that defective insulin secretion in CKD is caused by a direct effect of urea on pancreatic β -cells. In a CKD mouse model induced by 5/6th nephrectomy we observed a defect in insulin secretion *in vivo* by hyperglycemic clamps and *ex vivo* in isolated islets. A similar impairment in insulin secretion was observed in normal mouse and human islets chronically exposed to disease-relevant concentrations of urea, and in islets from mice treated orally with urea for 3 weeks. In both CKD mouse islets and normal islets exposed to urea, we observed an increase in oxidative stress and protein O-GlcNAcylation. In both models, pharmacological blockade of O-GlcNAcylation with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) restored insulin secretion. Impairment of insulin secretion was associated with reduced glucose utilization and decreased activity of phosphofructokinase 1 in islets, both of which were restored by DON treatment. We conclude that CKD is associated with an insulin secretory defect due to elevated circulating levels of urea via increased islet protein O-GlcNAcylation and impaired glycolysis.

Introduction

Disorders of glucose homeostasis affect approximately 50 % of patients suffering from chronic kidney disease (CKD) (1-4) and play a major role in the mortality of CKD patients (5, 6). Glucose homeostasis relies on sufficient production of insulin from pancreatic β -cells and adequate action of insulin on peripheral tissues. Although several mechanisms involved in insulin resistance in CKD have been identified (7), few studies have considered the contribution of β -cell dysfunction and its underlying mechanisms.

CKD is characterized by the progressive retention of metabolites normally excreted by the kidney, collectively termed "uremic toxins", many of which have adverse effects on numerous organs (8, 9). The major uremic metabolite, urea, is usually considered to have negligible toxicity. Addition of urea to the dialysate following conventional dialysis is well tolerated (10), and an increase in urea reduction rate from 66 % to 75 % had no impact on patient survival (11). However, the view that urea is simply an "innocent bystander" was recently challenged by the observation that daily dialysis (12) and hemo-diafiltration (13), which improve the removal of uremic toxins including urea, improve survival in CKD patients. Furthermore, mechanisms underlying urea toxicity are beginning to emerge. Urea was shown to affect cellular functions indirectly, by modifying serum or tissue compounds, and directly through increased oxidative stress (14) which impairs glucose uptake in adipocytes (15), decreases tight junctions in intestinal cells (16) and induces endothelial dysfunction (17). Recently, urea was shown to induce post-

translational modifications (PTMs) that compromise protein function. Urea increases O-GlcNAc modification of insulin signaling proteins in adipocytes and endothelial cells (15, 17) and increases protein carbamylation indirectly via its degradation into the reactive compound cyanate (18). Despite the expanding data on its pathophysiological effects, to our knowledge urea has never been linked to β -cell dysfunction.

Insulin secretion is tightly regulated to maintain blood glucose levels within a narrow range. Rising blood glucose levels stimulate insulin secretion from β -cells. This involves β -cell glucose transporters (GLUT2 in rodents and GLUT1 in humans) that equilibrate the extracellular and intracellular glucose concentrations (19). Glucose metabolism, the key signal for insulin secretion, is controlled by the glycolytic enzyme glucokinase (GK), generating glucose-6-phosphate (G6P), and by phosphofructokinase-1 (PFK-1), which converts fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate. Subsequent steps of glycolysis lead to an increase in cytosolic ATP which induces closure of ATP-sensitive potassium channels (K^+ ATP channels) resulting in membrane depolarization, opening of voltage-gated calcium channels and Ca^{2+} influx. The resulting increase in $[Ca^{2+}]$ triggers fusion and exocytosis of insulin-containing granules.

Oxidative stress is common in CKD patients and reduction of oxidative stress results in a number of beneficial effects (20, 21). In the β -cell, reactive oxygen species (ROS) act as second messengers in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (22) but persistent oxidative stress is a major cause for β -cell dysfunction and

apoptosis (23). The extreme sensitivity of β -cells to overproduction of ROS may be explained by their relatively low levels of antioxidant enzymes (24). ROS-dependent glucose metabolism through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) has been implicated in many of the adverse effects of chronic hyperglycemia (25). Between 1 and 3 % of the glucose that enters the cell is converted by the HBP to UDP-GlcNAc, the substrate for protein O-GlcNAcylation, a reversible PTM that consists of the addition of carbohydrates (O-GlcNAc) on serine and threonine residues (26, 27). Prolonged activation of the HBP and O-GlcNAcylation impairs insulin secretion (28–30).

Here we tested the hypothesis that CKD is associated with defective insulin secretion due to the direct action of urea on β -cells to increase oxidative stress and protein O-GlcNAcylation. Specifically we asked the following questions: 1) Is β -cell function impaired in a CKD mouse model, in uremic mice, and urea-treated islets ex vivo? 2) What are the roles of ROS and O-GlcNAcylation in the insulin secretory defect? and 3) What are the targets of ROS and O-GlcNAcylation in the stimulus-secretion coupling pathway?

Results

CKD is associated with defective insulin secretion in mice.

To determine if CKD is associated with impaired insulin secretion, we first examined β -cell function in a CKD mouse model generated by 5/6 nephrectomy performed in two surgical steps (31) and compared to sham-operated controls. Three weeks after the last surgery, circulating urea and creatinine levels were in the same range as those observed in moderate CKD patients (Table 1). Body weight was slightly but not significantly lower in CKD mice and food intake was not different between both groups (Figure S1A-B). Fat mass was decreased in CKD mice without changes in muscle mass (Table 1). Fed blood glucose levels increased in the first week after surgery and remained high for up to 3 weeks (Figure S1C), which was associated with hypoinsulinemia (Figure S1D). Five-h fasted glucose levels were similar in CKD and sham mice, however, fasted insulinemia gradually decreased to approximately 50% of sham-operated levels by 3 weeks (Table 1 and Figure S1D). Subsequent experiments on CKD and sham mice were performed at 3 weeks post-surgery. Intra-peritoneal glucose tolerance tests (IPGTT) revealed glucose intolerance (Figure 1A-B) and lower plasma insulin levels during glucose challenge (Figure 1C) in CKD mice. In hyperglycemic clamps (HGC), CKD mice had significantly lower insulin secretion in response to glucose with a trend for reduced insulin response to arginine (Figure 1D-G). Although C-peptide levels are frequently used to assess endogenous β -cell secretion, comparison of circulating C-peptide between CKD and sham mice is not informative as the kidney is the major site of C-

peptide catabolism, contrary to insulin which is mostly degraded in the liver (32). Consistent with renal dysfunction, C-peptide levels during the HCG were increased in CKD mice (Figure 1H). The glucose infusion rate (GIR; Figure 1I) and M/I index of insulin sensitivity (Figure S1E) during the clamp were not significantly different between CKD and sham mice suggesting no major defect in insulin sensitivity. Nevertheless, the plasma glucose disappearance rate (kITT) derived from the insulin tolerance tests (33) revealed a slight decrease in insulin sensitivity in CKD mice as observed in different CKD models and patients (7) (Figure 1J-K). β -cell mass was unaffected in CKD mice (Figure S2A-B). Taken together, these data suggest that CKD causes glucose intolerance at least in part by impairing insulin secretion.

Insulin secretion is compromised in CKD mouse islets *ex vivo*.

To confirm that the reduced insulin secretory response observed in CKD mice is due to β -cell dysfunction, islets were isolated from CKD mice and insulin secretion was measured in 1-hour static incubations. Three weeks after surgery, insulin secretion in response to 16.8 mM glucose or 35 mM KCl was reduced in islets from CKD mice compared to sham-operated mice (Figure 2A-B), without changes in insulin content (Figure 2C), protein content (Figure S2C), or in the levels of the transcription factor Pdx-1 (Figure S2D). Six weeks post-surgery, the decrease in insulin secretion in response to glucose was maintained and insulin content was also reduced (Figure S3A-B). These data indicate that in CKD mouse islets, a cell-

autonomous defect in insulin secretion appears prior to any significant decrease in intracellular insulin stores.

Increased oxidative stress and protein O-GlcNAcylation in CKD mouse islets.

To begin to understand the underlying mechanisms, we examined whether ROS and protein O-GlcNAcylation were increased in islets from CKD mice. ROS-dependent formation of the RNA damage biomarker 8-Hydroxyguanosine (8-OHG), used to evaluate oxidative stress (34, 35), was assessed by immunohistochemistry in pancreatic sections. Whereas islets from sham-operated mice were only weakly stained compared to the adjacent exocrine tissue, CKD islets exhibited stronger 8-OHG staining, indicative of increased oxidative stress (Figure 3A). To investigate the contribution of ROS to β -cell dysfunction, CKD mice were treated with the antioxidant, N-acetyl cysteine (NAC), and insulin secretion was determined in islets *ex vivo*. Whereas islets from vehicle-treated CKD mice had defective insulin secretion as shown in Figure 2, NAC completely restored insulin secretion to control levels (Figure 3B) without affecting insulin content (Figure S4A). Furthermore, NAC treatment of CKD mice restored fed glycaemia and insulinemia (Table S1 and Figure S4B). The improvement of insulin secretion was not due to a reduction in plasma urea levels during NAC treatment (Table S1). Protein O-GlcNAcylation was then assessed in CKD islets by Western blotting and immunohistochemistry of pancreatic sections. O-GlcNAcylation of proteins was increased in islets from CKD mice compared to controls (Figure 3C-E). Interestingly, treatment of CKD mice with NAC

completely prevented the increase in islet protein O-GlcNAcylation, indicating that oxidative stress is upstream of O-GlcNAcylation in this context (Figure 3F-G). To determine whether O-GlcNAcylation in CKD affects β -cell function, we inhibited the HBP with the glutamine analog 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), an inhibitor of L-glutamine D-fructose 6-phosphate aminotransferase (GFAT), the rate-limiting enzyme that metabolizes fructose-6-phosphate to glucosamine-6-phosphate (36). As expected, treatment of CKD mice with DON restored islet protein O-GlcNAcylation to control levels (data not shown). Importantly, DON treatment restored insulin secretion in CKD islets *ex vivo* (Figure 3H), without affecting insulin content (Figure S4C), and normalized fed glucose levels in CKD mice (Table S2 and Figure S4D). Taken together, these data suggest oxidative stress impairs insulin secretion in CKD by increasing flux through the HBP and consequently O-GlcNAcylation of islet proteins.

Chronic administration of urea impairs glucose tolerance and insulin secretion in mice.

To determine whether β -cell dysfunction in CKD mice is due to chronic hyperuremia, we supplemented drinking water with 25 g/L urea to raise plasma urea concentrations in normal mice. Circulating urea levels were increased after 1 week and remained elevated after 3 weeks (Figure 4A). Urea-treated mice gained less weight, although food intake was not different (Figure S5A-B). Fed blood glucose levels were higher and fed insulin levels were lower in urea-treated mice compared to controls (Table S3 and Figure S5C-D). IPGTT performed after 3 weeks of urea

administration revealed a trend towards glucose intolerance without reaching statistical significance (Figure 4B&D). Insulin levels during the glucose challenge were, however, significantly lower (Figure 4C), suggestive of an insulin secretory defect. Consistent with this, islets isolated after 3 weeks of urea administration secreted significantly less insulin in response to 16.8 mM glucose or 35 mM KCl (Figure 4E-F), whereas insulin content was not affected (Figure S5E). Interestingly, similar to CKD islets, protein O-GlcNAcylation was also increased in islets from urea-treated mice (Figure 4G-H). Taken together, these data reveal that administration of urea mimics the insulin secretory defect observed in CKD mice.

Urea impairs insulin secretion by increasing ROS production and protein O-GlcNAcylation in islets.

To rule out the possibility that the insulin secretory defect observed in CKD and urea-fed mouse islets is indirectly due to hyperglycemia, we exposed normal mouse islets to increasing concentrations of urea for 24 h. Exposure to 10 mM urea, comparable to levels in sham mice and healthy patients, was inconsequential. In contrast, exposure to concentration of urea \geq 20 mM, comparable to levels in CKD mice and humans, inhibited glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) relative to the osmotic control mannitol (Figure 5A). Insulin content was not affected in the presence of 20 mM urea but decreased at higher concentrations (50 and 100 mM) (Figure S6A). To specifically examine insulin secretion without the confounding effects of reduced insulin or protein content (Figure S6A-B), subsequent experiments

were performed with 20 mM urea which is also similar to the concentration found in CKD mouse plasma (Table 1). Urea treatment of islets resulted in a 1.5-fold increase in ROS (Figure 5B), whereas in the presence of NAC, levels of ROS and GSIS were restored to control levels (Figure 5B-C). Urea treatment also increased O-GlcNAcylation of islet proteins, which was prevented by NAC (Fig 5D-E) confirming the relationship between ROS and O-GlcNAcylation observed in CKD islets. Inhibition of the HBP by DON prevented the urea-induced decrease in insulin secretion (Figure 5C). Similar to mouse islets, the insulin secretory response to glucose of normal human islets (donor information in Table S4) treated with 20 mM urea for 24 hours was strongly reduced compared to mannitol-treated controls, whereas insulin content was not affected (Figure 5F-G). Furthermore, urea treatment increased protein O-GlcNAcylation of human islets (Figure 5H-I). Taken together, these data indicate that levels of urea found in CKD impair GSIS by increasing ROS and protein O-GlcNAcylation in both rodent and human islets.

Urea is in equilibrium with the electrophilic species cyanate which can alter protein function by reacting with the amino group of lysine residues resulting in generation of ϵ -amino-carbonyl-lysine (37). Under physiological conditions, 0.8 % of the molar concentration of urea is converted to cyanate. To determine whether urea affects the β -cell via its degradation product cyanate, mouse islets were exposed for 24 hours to concentrations of cyanate (0.2 and 1 mM) corresponding to 20 mM urea and CKD patients, respectively (18, 37). Cyanate dose-dependently decreased GSIS, without affecting insulin content, and addition of the antioxidant NAC restored insulin secretion (Figure 6A&C). However, in contrast to urea, cyanate did not induce an

increase in protein O-GlcNAcylation (data not shown) nor was impaired GSIS restored by addition of DON (Figure 6C). These data suggest that the increase of O-GlcNAcylation and consequential decrease in insulin secretion in CKD and urea-treated islets is directly attributable to urea rather than via cyanate.

Increased protein O-GlcNAcylation alters glucose metabolism in CKD and urea-treated islets.

To identify which step of the stimulus-secretion coupling pathway is defective in CKD mouse islets and urea-treated islets, glucose metabolism, mitochondrial function, and insulin exocytosis were assessed. Glucose utilization was measured by the conversion of 5-³H-glucose to ³H₂O, which is catalyzed by enolase in the penultimate step of glycolysis. In both urea-treated islets and islets from CKD mice, glucose utilization (Figure 7A&D), glucose oxidation (Figure 7B&E) and ATP production (Figure 7C&F) were reduced. Depolarization-induced exocytosis under basal glucose conditions (2.8 mM) was unaffected by urea treatment in mouse islets (Figure 7G), whereas the ability of stimulatory glucose (16.7 mM) to amplify the exocytotic response was impaired (Figure 7G). These results suggest the regulation of carbon flow through the glycolytic pathway is altered in CKD and urea-treated islets.

We then measured the activity of rate limiting glycolytic enzymes upstream of enolase. Whereas GK was unaffected (Figure S7A-B), PFK-1 activity was significantly reduced in urea-treated and CKD mouse islets (Figure 8A-B). The

decrease in PFK-1 activity was not due to reduced PFK-1 protein expression (Figure S7C-D). To investigate a causal relationship between protein O-GlcNAcylation and altered glucose metabolism, we measured glucose utilization and oxidation in islets exposed to urea and treated with DON. Whereas urea treatment alone reduced glucose metabolism, addition of DON restored glucose utilization and oxidation (Figure 8C-D). Since PFK-1 activity can be inhibited by O-GlcNAcylation (38), we asked whether blocking O-GlcNAcylation restores PFK-1 activity in urea-treated islets. Indeed, addition of DON prevented the inhibitory effect of urea on PFK-1 activity (Figure 8E). Overall, our data suggest that chronic accumulation of urea in CKD leads to an increase in islet protein O-GlcNAcylation which inhibits PFK-1 activity, reduces glucose flux and consequently impairs insulin secretion.

Discussion

This study aimed to determine whether perturbations in glucose homeostasis in CKD can be explained, in part, by a defect in insulin secretion and whether chronic accumulation of urea, a major uremic toxin, is the underlying cause of β -cell dysfunction in CKD. Glucose tolerance tests, hyperglycemic clamps and *ex vivo* islet studies in a CKD mouse model revealed impaired insulin secretion as early as 3 weeks post-surgery (Figure 1 and 2), whereas insulin content and β -cell mass were unaffected. Mechanistically, increased oxidative stress and protein O-GlcNAcylation in islets were shown to underlie the insulin secretory defect (Figure 3). Administration of urea in mice compromised insulin secretion and increased protein O-GlcNAcylation in islets, mimicking islet dysfunction in CKD (Figure 4). Furthermore, exposure of mouse and human islets *ex vivo* to urea impaired insulin secretion, and similarly involved an increase in oxidative stress and protein O-GlcNAcylation (Figure 5). Finally, increased protein O-GlcNAcylation in both CKD and urea treated islets impaired GSIS by inhibiting PFK-1 activity and hence glycolysis (Figure 7 & 8). Overall, we conclude that elevated levels of circulating urea in CKD alter glucose homeostasis by increasing ROS and protein O-GlcNAcylation in islets, inhibiting glycolysis and consequently insulin secretion.

The observed defect in insulin secretion in a CKD mouse model supports the notion that β -cell dysfunction is an important contributing factor to the perturbation of glucose homeostasis in CKD. Insulin resistance in uremic patients was demonstrated by deFronzo et al. (39) and is widely accepted as an underlying cause of altered

glucose homeostasis in CKD (4). However, type 2 diabetes arises from an imbalance between insulin sensitivity and secretion (40). The possibility that β -cell dysfunction may play a role in CKD is supported by several studies describing a pre-diabetic state in uremia that is characterized by both increased insulin resistance and defective insulin secretion (41–46). In light of the fact that insulin sensitivity is altered in patient with incipient renal disease (47), we speculate that chronic accumulation of uremic toxins leads to β -cell dysfunction in advanced CKD patients.

Although urea and its breakdown products cyanate have emerged as important uremic toxins in recent years (48), their effect on islet function have not been addressed. Herein, we provide evidence that defective insulin secretion associated with CKD is in large part mediated by urea. Indeed, urea administration in mice was sufficient to mimic CKD-induced β -cell dysfunction. In adipose, endothelial, and renal cells urea affects protein function by inducing ROS production (14, 49) and O-GlcNAcylation (15, 17). Accordingly, we found urea to adversely affect insulin secretion by increasing ROS and protein O-GlcNAcylation in islets. In addition to the direct effect of urea identified here, evidence in support of other uremic toxins disrupting β -cell function is emerging. Recently, uric acid was shown to affect insulin secretion by increasing oxidative stress in β -cells (50). In addition, the furan fatty acid metabolite 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), at concentrations found in CKD patients, impairs insulin secretion by inducing mitochondrial dysfunction and inhibition of insulin biosynthesis in β -cells (51). Furthermore, metabolic abnormalities associated with CKD including hyperglycemia

and dyslipidemia, as well as metabolic acidosis (43), low vitamin D levels (42), and hyperparathyroidism (46) may aggravate β -cell dysfunction in CKD.

Circulating levels of urea in CKD can alter cellular functions via the breakdown product cyanate, which irreversibly forms carbamylated proteins by reacting with amino groups (18). The involvement of carbamylated proteins in mortality (52) and degenerative complications linked to CKD, such as atherosclerosis and insulin resistance (18, 53) has been highlighted in several studies. We found that cyanate levels, within the range present in CKD mice and humans (18, 37), attenuate insulin secretion in normal mouse islets *ex vivo* and that this was prevented by the antioxidant NAC. However, in contrast to the effects of urea, cyanate did not increase protein O-GlcNAcylation and DON did not restore insulin secretion in the presence of cyanate. The divergence between the mechanisms underlying β -cell dysfunction following exposure to urea and cyanate imply that in this context, the effect of urea to increase O-GlcNAcylation is not mediated by its degradation product.

Increased levels of several plasmatic oxidative markers have been demonstrated in CKD (21, 54, 55), and CKD patients have defects in the antioxidant defense system (56). Moreover, several clinical studies suggest that antioxidant therapy in CKD patients may prevent the progression to end-stage renal disease and reduce CV mortality (57). Oxidative stress also contributes to insulin resistance in CKD (15). In the β -cell, ROS derived from glucose metabolism, such as H_2O_2 , act as metabolic signaling molecules for GSIS (22) but persistent oxidative stress is a cause of β -cell failure (23). The observed increase in oxidative stress despite reduced

glycolytic flux suggests a non-mitochondrial source of ROS such as NADPH oxidase (58). In endothelial cells NADPH oxidase activity increases upon urea exposure, suggesting a role for this enzyme in ROS production during uremia (17). However, whether NADPH oxidase is implicated in ROS production in uremic islets remains to be examined.

A link between increased protein O-GlcNAcylation and β -cell dysfunction in the context of uremia was demonstrated by the improvement in insulin secretion following exposure of CKD mice or urea-treated islets to the GFAT inhibitor DON. Protein O-GlcNAcylation is involved in both physiological regulation of protein function and pathological phenomena (27). In islets, although O-GlcNAcylation of specific β -cell proteins such as PDX-1 and FOXO1 is essential for glucose regulation of gene expression (36) and insulin secretion (59), excessive protein O-GlcNAcylation by overexpression of GFAT or inhibition of O-GlcNAcase reduces insulin secretion (28–30, 60) and increases β -cell apoptosis (61). Interestingly, protein O-GlcNAcylation in CKD mouse islets and in urea-treated islets was normalized by antioxidant treatment, implying that in the uremic context increased ROS promote O-GlcNAcylation. Of note, defective insulin secretion in rat islets induced by overexpression of GFAT is mediated by elevated ROS (60), suggesting that β -cell dysfunction in CKD may involve a positive feedback loop that exacerbates the deregulation of ROS and HBP. An alternative possibility to our conclusion that urea directly leads to an increase in ROS and O-GlcNAcylation of islet protein is that its effect in CKD and urea-fed mice is indirectly mediated by chronic hyperglycemia, a known cause of oxidative stress and increased flux through the HBP. However, this

possibility is not supported by our observation that exposure of isolated islets to urea also induces protein O-GlcNAcylation which is preventable by NAC. In support of this, experimental evidence for ROS activation of HBP in the absence of hyperglycemia was provided by d'Apolito et al. (15) who showed that urea can directly increase O-GlcNAcylation via ROS production in adipose tissue, and by Jones et al. (62) who demonstrated an increase in O-GlcNAcylation levels following short-term hydrogen peroxide exposure in isolated cardiac myocytes. Together, these studies and our findings support our conclusion that urea increases O-GlcNAcylation of islet proteins via ROS production.

Glucose utilization and oxidation were reduced in CKD mouse islets and in islets exposed *ex vivo* to urea. This is consistent with defective glucose metabolism observed in a rat CKD model (46). Both GK (63) and PFK-1 (64) are major rate-controlling enzymes of glycolysis and β -cell specific inactivation of either one impairs insulin secretion. Here we found that PFK-1 activity was reduced in CKD islets as previously reported (46) and following exposure of islets to urea, while GK activity was not affected. PFK-1 activity is known to be inhibited by oxidative stress (65), lipid metabolites (66) and O-GlcNAcylation (38). Glycosylation of PFK-1 at Ser529 inhibits its activity (38). That urea-induced O-GlcNAcylation of PFK-1 may account for reduced glucose sensing in CKD is supported by the restoration of both PFK-1 activity and glucose utilization following the addition of DON to urea-treated islets. Reduced glucose metabolism compromises insulin secretion, however, decreased PFK-1 activity also leads to the diversion of glucose flux from the glycolytic pathway to the pentose phosphate (PPP) or glycogen synthesis pathways. Physiologically, the

use of glucose-6-phosphate by these pathways is very limited in β -cells (67) yet under pathophysiological conditions PPP contributes to the inhibition of β -cell function (68) and, hence, could be a contributing factor to defective insulin secretion in CKD. Given that most enzymes in the glycolytic pathway are potentially O-GlcNAcylated (38, 69), it is possible that other enzymes are deregulated in addition to PFK-1. Further studies will be required to determine the contribution of these additional mechanisms to defective insulin secretion in CKD.

Stimulus-secretion coupling in the β -cell involves a so-called “triggering pathway”, whereby a glucose-dependent increase in ATP/ADP ratio inhibits KATP channels, induces membrane depolarization and opens voltage-gated calcium channels. The subsequent rise in $[Ca^{2+}]_i$ promotes insulin granule membrane fusion and exocytosis. In CKD rat islets, chronically elevated $[Ca^{2+}]_i$ alters insulin secretion (70) by reducing basal and glucose-induced ATP levels (46). In our models, resting ATP levels were unaffected but the glucose-dependent rise in ATP was impaired, suggesting that the major defect lies at the level of glucose metabolism, likely as a consequence of reduced glycolysis. This was similarly reflected downstream where an attenuated rise in $[Ca^{2+}]_i$ in response to glucose was observed in urea treated islets (data not shown). In addition to the triggering pathway, coupling factors generated by glucose and/or lipid metabolism amplify insulin secretion (71, 72). While no difference in membrane capacitance responses were detected in urea-treated islets by patch clamp at basal glucose levels, in the presence of high glucose concentrations a decrease in depolarization-induced exocytosis was observed. This impairment of the glucose-dependent amplification of exocytosis is consistent with

the major effect in glycolysis observed in CKD and urea-treated islets, and with the notion that the triggering and amplifying pathways of insulin secretion are interdependent (73).

Rodent models of CKD have provided important insights into the mechanism underlying perturbations in glucose homeostasis (15, 46, 74, 75). In support of our data, defective insulin secretion was described in CKD rat models (46, 74). In contrast to our observations however, d'Apolito et al. (15) reported insulin resistance in a CKD mouse model. The differences between our results may be related to the genetic background of the mice (C57Bl/6J versus C57Bl/6N used in this study) and/or the prevention of acidosis in our study. C57Bl/6J mice carry a mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase, a mitochondrial enzyme involved in NADPH production, and have reduced insulin secretion relative to the C57Bl/6N strain without changes in insulin sensitivity (76). Furthermore, overproduction of H₂O₂, indicative of alterations in NADPH-dependent oxidases, plays a critical role in urea-induced insulin resistance in adipocytes (15). Consequently, C57Bl/6J mice may be vulnerable to urea-induced ROS generation and insulin resistance (15). Also, in our model, mice had access to drinking water containing 80 mM sodium bicarbonate preventing acidosis and hyperkalemia, known contributors to insulin resistance in CKD (77). Notwithstanding these differences, our model enabled us to study the impact of CKD on β -cell function without the confounding effect of insulin resistance.

In summary, our study provided key information regarding the mechanisms of β -cell dysfunction in CKD using 3 complementary models with remarkably consistent

functional defects. First, we uniquely demonstrated that urea, a major uremic toxin usually considered as an innocent bystander, directly impairs insulin secretion. Second, we identified an underlying mechanism that involves ROS production, islet protein O-GlcNAcylation, decreased PFK1 activity, and impaired glycolysis that results in reduced glucose oxidation, ATP production, exocytosis, and insulin secretion (Figure 8F). Third, these deleterious effects of urea were also observed in human islets, indicating the relevance of the findings to human β -cells. Finally, the central role of ROS and O-GlcNAcylation in β -cell dysfunction suggests that decreasing ROS levels by clinically feasible interventions, such as anti-oxidant treatment, might represent a therapeutic approach to decrease metabolic complications associated with CKD.

Methods

Reagents and Solutions

RPMI-1640 and FBS were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Fatty acid free bovine serum albumin (BSA) was from Equitech-Bio (Kerrville, TX, USA). Dextrose solution was from Baxter (Mississauga, ON, Canada). Urea was from JT Baker (Center Valley, PA, USA). All other reagents were from Sigma unless otherwise noted.

Animal models

C57BL/6N male mice were purchased from Charles River SA (Saint-Constant, QC, Canada) and housed in an air-conditioned room with a controlled environment of $21 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and 60-70% humidity, under a 12h light/dark cycle with free access to food (13.0 kJ/g, 58% carbohydrates, 18% fat, 24% proteins (w/w); Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan, Montreal, QC, Canada) and water. Mice were housed individually, and body weight and food intake were determined bi-weekly. Moderate CKD was induced by 5/6 nephrectomy with a 2-step surgical procedure in 6-week-old mice (31). Mice were anesthetized with 1 % isoflurane. In brief, the upper and lower poles of the right kidney were resected by electro-coagulation. One week later, the left kidney was removed after ligation of the renal blood vessels and the ureter. Special care was taken to avoid damage to the adrenals. Control mice were subjected to a sham operation. All mice were given buprenorphine (0.05 mg/kg i.p.,

3-times a day) for 2 days to prevent post-surgical pain. NaHCO₃ (80 mM) was added to the drinking water of CKD mice to prevent metabolic acidosis. N-acetyl cystein (NAC) was dissolved in distilled water and administered daily by oral gavage at a dose of 200 mg/kg/day for 3 weeks (78), beginning 2 days after the 1st surgery. Control animals received distilled water only. 6-diazo-5-oxo norleucine (DON) was dissolved in saline solution and administered intraperitoneally (i.p.) 3 times per week at a dose of 0.5 mg/kg. The control group was injected with the same volume of vehicle. The chronic urea model was initiated in 6-week-old mice. Mice were provided with drinking water containing 25 g/L urea or urea-free water (control group) for 3 weeks.

Tissue, blood collection and biochemical measurements

Blood samples obtained from the tail and collected in heparinized capillaries were used to measure fed and fasted blood glucose and insulin levels. Animals were fasted at 8 am and the samples were collected at 8 am and 5 h later. At the end of the experiment, mice were euthanized with ketamine/Xylazine (70/4 mg/kg), and blood (approximately 1 ml) was collected by left ventricular puncture using a syringe containing 0.2 µM EDTA and centrifuged for 8 minutes at 10,000 × g to separate the plasma. Blood was stored at -80°C. Gastrocnemius muscle, liver, epididymal, retroperitoneal, and subcutaneous inguinal white adipose tissue were dissected out, weighed, and snap-frozen in liquid nitrogen. Urea was measured using a commercial colorimetric assay kit (Biovision, Milpitas, CA, USA). Creatinine was measured using a colorimetric method by the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)

biochemistry core. Plasma free fatty acid (FFA) levels were measured using a kit from Wako Chemical (Osaka, Japan). Insulin was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (insulin mouse ultrasensitive electroimmunoassay, ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA).

Metabolic studies

Glucose tolerance test (GTT): after a 5-h fast, animals were injected i.p. with 1g/kg dextrose in sterile water. Blood glucose was measured prior to and 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after injection. Blood glucose values were determined from a drop of blood sampled from the tail using an automatic glucose monitor (Accu-Check, Roche Applied Science). Plasma samples were collected at 0, 5, 15, 30 and 60 min for insulin measurement. The area under the curve (AUC) of blood glucose levels above basal was calculated using GraphPad Prism software.

Insulin tolerance test (ITT): after a 5-h fast, animals were injected i.p. with 0.5 UI/kg of recombinant human insulin (Actrapid®, Novo Nordisk). Blood glucose was measured before and 15, 30, 40, 60, 90 and 120 min after injection. The glucose disappearance rate for ITT (Kitt; $\% \cdot \text{min}^{-1}$) was calculated using the formula given by Lundbeak (33). $\text{Kitt} = 0.693 \times 100 / t_{1/2}$ where $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the plasma glucose concentration, considering an exponential decrement of glucose concentration during the 30 min after insulin administration.

Hyperglycemic clamps: one-step hyperglycemic clamps were performed on conscious animals (fed ad libitum before the clamp) as described (79). Briefly, a catheter was inserted into the right jugular vein under general anesthesia. Animals

were allowed to recover for 5–6 days. A 50% dextrose solution was infused through the jugular vein to clamp plasma glucose at approx. 17 mM for 80 min and exogenous glucose infusion was adjusted based on instantaneous glycaemia measurement using a handheld glucometer. At 80 min, an arginine bolus was injected (1 mmol/kg; Sandoz, Canada) to assess the maximal insulin response. Plasma samples were collected from the tail at times 0, 5, 15, 30, 50, 80, 81, and 90 min during the clamp and the level of insulin was measured by ELISA. The AUC of insulinemia in response to arginine, after subtracting basal insulinemia, was calculated using GraphPad Prism software. At the end of the clamp the animals were sacrificed and the pancreas removed for morphological analyses. The M/I index of insulin sensitivity was calculated by dividing the average glucose infusion rate (GIR) during the second half of the glucose clamp (M expressed in $\mu\text{M}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) by the average circulating insulin value (I expressed in pM) during the same time period.

Islet isolation and urea and cyanate treatment

Mouse islets were isolated by hand-picking after collagenase digestion of the pancreas and dextran density gradient centrifugation as described previously (80), and maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% (wt/vol.) FBS, 100 U/mL penicillin–streptomycin and 11.1 mM glucose. Isolated islets from CKD or sham mice immediately underwent static incubations following isolation. For urea treatment, islets were isolated from 12-week-old C57BL/6N male mice and after overnight recovery in standard medium, islets were incubated for 24h in standard media containing 10 to 100 mM of urea, 20 to 100 mM of mannitol (osmotic control) or 0.2 to

1 mM of sodium cyanate. Urea, mannitol and cyanate were dissolved in sterile distilled water. Islets were treated with NAC (0.5mM) or DON (20 μ M) for 24 h with or without 20 mM urea. NAC and DON were dissolved in sterile ultrapure water.

Insulin secretion

For static incubations, batches of ten islets each were washed twice in KRB solution containing 0.1% (wt/vol.) BSA and 2.8 mM/l glucose for 20 min at 37°C, then incubated for 1 h in the presence of 2.8, 16.7 mM glucose, or 2.8 mM glucose plus 35 mM KCl. Each condition was run in triplicate. Intracellular insulin content was measured after acid–alcohol extraction. Insulin was measured by radioimmunoassay using rat insulin RIA kit (Millipore, Billerica, MA, USA) or AlphaLISA insulin immunoassay kit (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Glucose metabolism and ATP content

Glucose utilization and glucose oxidation: Groups of 20 isolated islets were incubated at 37 °C for 90 min in KRBH, 0.1 % BSA containing 0.5 μ Ci of D-[5-³H]glucose (16 Ci/mM) and 1 μ Ci/ml D-[U-¹⁴C]glucose (250mCi/mM) and 3 or 16 mM glucose. Incubation was stopped by the addition of citrate buffer (400 mM, pH 4.5) containing antimycin-A (10 μ M), rotenone (10 μ M) and potassium cyanide (5 nM). Glucose utilization was measured by the amount of ³H₂O. Glucose oxidation was determined by the generation of ¹⁴CO₂ trapped by KOH 5% after 60 min of incubation at room temperature. Results were normalized to the amount of protein in lysates, determined by using a BCA protein assay kit (Bio-rad, Richmond, CA).

ATP content: ATP was extracted from islets after incubation at 37 °C for 15 min in KRBH, 0.1 % BSA containing 2.8 or 16.8 mM glucose and assayed using ATP bioluminescence assay according to the manufacturer's instructions (ATPlite kit, PerkinElmer Life Science).

Single-cell measurement of β -cell exocytosis

Prior to patch-clamping, dissociated islet cells were preincubated in RPMI-1640 media with 2.8 mM glucose for 1 hour. Media was then changed to bath solution containing (in mM): 118 NaCl, 20 TEA, 5.6 KCl, 1.2 MgCl₂•6H₂O, 2.6 CaCl₂, 5 HEPES, and either 2.8 or 16.7 glucose (pH 7.4 with NaOH) in a heated chamber (37°C). After approximately 10 min in the bath solution, whole-cell patch clamp measurement of exocytosis was performed (73). The intracellular solution contained (in mM): 125 Cs-glutamate, 10CsCl, 10 NaCl, 1 MgCl₂•6H₂O, 0.05 EGTA, 5 HEPES, 0.1 cAMP and 3 MgATP (pH7.15 with CsOH). Capacitance responses in femtofarad (fF) were normalized to initial cell size in picofarad (pF) and β -cells were positively identified after the experiment by insulin immunostaining.

Measurement of ROS in urea-treated islets

The fluorescent probe 5-6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA, Invitrogen Burlington, ON, Canada) was used to measure ROS accumulation in dissociated islets as previously described (81). The islets were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% (wt/vol.) FBS, 100 U/mL penicillin–streptomycin and 11.1 mM glucose, containing 20 mM of urea or mannitol. At 3 h before the end of the 24 h culture period, batches of 100 islets were hand-picked and

incubated at 37°C for 40 min in a tube containing 100 µM of the freshly prepared carboxy-H2DCFDA probe. The reaction was stopped by adding PBS and the islets were once again cultured for 2 h. The islets were then hand-picked, washed twice with PBS and incubated with 0.25% trypsin/1 mM EDTA for 5 min at 37°C. This was followed by a gentle mechanical dispersion of the cells using a 1-ml pipette tip. The reaction was stopped by adding 700 µL cold PBS, and islet cells were then collected by centrifugation and resuspended in 200 µL PBS. Carboxy-H2DCFDA fluorescence was measured with a spectrofluorimeter (FLUOstar, BMG Labtech) with wavelengths filters of 495 nm for excitation and 520 nm for emission. Results were normalized to the amount of protein in lysates, determined by using a BCA protein assay kit (Bio-rad, Richmond, CA) and are presented as the fold increase from control islets.

PFK-1 and GK activity in islets

Islets were lysed in lysis buffer (0.1M Tris pH 8, 5mM MgCl₂, 2mM EGTA, 100µM β-mercaptoethanol). PFK1 V_{max} was assayed as described(46) using 10 µg of islets lysate in 190 µL of buffer containing 0.1M Tris-HCl pH 8, 5mM EDTA pH 8, 0.02 mM MgCl₂, 2mM fructose-6-phosphate, 0.2 mM NADH, 10 U of aldolase, 10 U of triose phosphate isomerase and 10 U of α-glycerophosphate dehydrogenase. The islets were then incubated for 10min in the buffer at 37° C and the reaction was initiated by adding 2mM of ATP to the buffer. Absorbance was recorded at 340 nm at room temperature every 15 s for 13 min using a spectrofluorimeter (FLUOstar, BMG Labtech) PFK-1 V_{max} was estimated by the slope of disappearance of NADH. To measure GK V_{max}, islets were lysed in buffer containing 50mM Tris, 5mM MgCl₂,

100mM KCl, 1mM EDTA and 4mM DTT. GK Vmax was measured using 10 µg of islets lysate in 190 µL of reaction buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM, MgCl₂, 1 mM ATP, 100 mM glucose, 15 mM β-mercaptoethanol, 1 mM NAD⁺, and 1 U/ml of glycerol-6-phosphate dehydrogenase. Absorbance was recorded at 340 nm at 30°C every 30 s for 60 min. GK Vmax was estimated by the slope of appearance of NADH.

Immunostaining of pancreatic sections

Pancreata were trimmed of fat, weighed, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, followed by embedding in paraffin blocks. Paraffin sections were rehydrated and antigen retrieval was performed using sodium citrate buffer. Antibodies and dilutions are listed Table S5. Images were taken with a fluorescence microscope (Zeiss, Thornwood, NY, USA). To measure β-cell mass, pancreatic sections were cut at 5-µm thickness and collected at 50 µm intervals. At least 6 slides from each pancreas were processed for β-cell mass measurement. β-cell mass was analysed after insulin immunostaining and haematoxylin counterstaining as described previously(82). The slides were scanned using a Super Cool Scan 9000 scanner (Nikon) and the images were analyzed using the image processing program Image J (National Institutes of Health, <http://rsbweb.nih.gov/gate2.inist.fr/ij/>) to assess the β-cell area and the whole pancreas area. The fractional β-cell area was multiplied by pancreas weight to obtain β-cell mass.

Immunoblotting

Islet protein were extracted using lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS, protease inhibitors and an inhibitor of O-GlcNAcase: PUGNAc, 20 μ M) followed by sonication (2min of 6.5 pulses: 10 sec pulse, 10 sec pause). Insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 \times g at 4 °C for 10 min. Protein extracts (15 μ g) were separated on 10% (wt/vol.) SDS–PAGE, blotted to nitrocellulose membranes (Whatman, Hanestrabe, Dassel, Germany). Membranes were blocked with 5% (w/v) BSA in Tris-buffered saline, pH 7.5, with 0.1% (v/v) Tween (TBS-T) for 2h at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies listed in Table S5. Blots were washed with TBS-T, and exposed to secondary antibodies for 1 h at room temperature. Membranes were washed again and developed by enhanced chemiluminescence using a standard kit (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate, Life technology, Burlington, ON, Canada). Signals were detected using a horseradish peroxidase–labeled IgG (Bio-Rad, Richmond, CA) and enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Canada, Woodbridge, ON, Canada) on Kodak BioMax XAR films (Kodak, Rochester, NY, USA). The bands were quantified by densitometry and ImageJ software. For the normalization of protein levels, membranes were incubated with anti-tubulin antibody. Results were expressed as a fold increase over control values.

Human islets

Isolated islets from nondiabetic human cadaveric donors were provided by Alberta Diabetes Institute Islet Core at the University of Alberta, and by the Integrated Islet Distribution Program sponsored by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (<http://www.iidp.coh.org>). Characteristics of the donors are summarized in Table S4.

Statistics

Data are expressed as the mean \pm SEM. All data were analyzed using GraphPad Software (San Diego, CA, USA). Multiple comparisons were performed using one-way ANOVA followed when appropriate by post-hoc Bonferroni's tests for 2-by-2 comparisons. Results of GTT, ITT, clamps, and body weight tests compared by two-way ANOVA (time, treatment). Simple comparisons were performed using Student's t-test. A p value <0.05 was considered to be significant.

Study approval

All procedures using animals were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the CHUM (protocol #CM13041VP). The use of human islets was approved by the Institutional Ethics Committee of the CHUM (protocol #: ND-05-035). A written consent for research from donor family was obtained for all donors.

Author contributions

L.K. conceived and performed the study, researched data, analyzed the results, and wrote the manuscript. E.N. performed the study, researched data, analyzed the results, and reviewed the manuscript. J.E.M.F., X.D., C.A., V.S.M. researched data and analyzed the results. J.G. and P.E.M. analyzed the results and reviewed the manuscript. V.P. conceived the study, analyzed the results and wrote the manuscript. L.K. and V.P. are the guarantor of this work and, as such, take full responsibility for the work. The authors have no relevant conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

This study was supported by the U.S. National Institutes of Health (R01DK58096 to V.P.), the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77686 to V.P.), and the Quebec Research Network in Cardiometabolic Health, Diabetes and Obesity. V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-Cell Function. P.E.M. holds the Canada Research Chair in Islet Biology. L.K. was supported by postdoctoral fellowships from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) - Fond de recherche santé Québec (FRQS), the Centre de recherche de centre hospitalier de Montréal (CRCHUM), and Hospices Civils de Lyon. E.N. was supported by studentships from the University of Montréal and the Montreal Diabetes Research Center. We thank G. Fergusson and M. Éthier of the Rodent Metabolic Phenotyping core facility of the CRCHUM for metabolic studies in

mice; M. Guévremont, J. Morin and the Cellular Physiology Service core of the CRCHUM for quantification of β -cell mass and alfaLISA assay; and C. Tremblay (CRCHUM) for valuable technical assistance. The authors gratefully acknowledge E. Joly for his technical advice for enzymatic assay and M. Ferdaoussi for fruitful discussions.

References

1. Eldin WS, Ragheb A, Klassen J, Shoker A. Evidence for increased risk of prediabetes in the uremic patient. *Nephron Clin Pract.* 2008;108(1):c47–55.
2. Lorenzo C, Nath SD, Hanley AJG, Abboud HE, Gelfond JAL, Haffner SM. Risk of type 2 diabetes among individuals with high and low glomerular filtration rates. *Diabetologia.* 2009;52(7):1290–7.
3. Sahakyan K, Lee KE, Shankar A, Klein R. Serum cystatin C and the incidence of type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2011;54(6):1335–40.
4. Mak RH. Insulin and its role in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2008;23(3):355–62.
5. Menon V, Greene T, Pereira AA, Wang X, Beck GJ, Kusek JW, et al. Glycosylated Hemoglobin and Mortality in Patients with Nondiabetic Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3411–7.
6. Trivin C, Metzger M, Haymann J-P, Boffa J-J, Flamant M, Vrtovsnik F, et al. Glycated Hemoglobin Level and Mortality in a Nondiabetic Population with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(6):957–64.
7. Koppe L, Pelletier CC, Alix PM, Kalbacher E, Fouque D, Soulage CO, et al. Insulin resistance in chronic kidney disease: new lessons from experimental models. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(9):1666–74.

8. Cohen G, Glorieux G, Thornalley P, Schepers E, Meert N, Jankowski J, et al. Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro—towards a standardized approach for research on uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(12):3381–90.
9. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2012;23(7):1258–70.
10. Johnson WJ, Hagge WW, Wagoner RD, Dinapoli RP, Rosevear JW. Effects of urea loading in patients with far-advanced renal failure. *Mayo Clin Proc Mayo Clin*. 1972;47(1):21–9.
11. Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, Daugirdas JT, Greene T, Kusek JW, et al. Effect of Dialysis Dose and Membrane Flux in Maintenance Hemodialysis. *N Engl J Med*. 2002;347(25):2010–9.
12. Chertow GM, Levin NW, Beck GJ, Depner TA, Eggers PW, Gassman JJ, et al. In-center hemodialysis six times per week versus three times per week. *N Engl J Med*. 2010;363(24):2287–300.
13. Maduell F, Moreso F, Pons M, Ramos R, Mora-Macià J, Carreras J, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013;24(3):487–97.
14. Zhang Z, Yang X-Y, Cohen DM. Urea-associated oxidative stress and Gadd153/CHOP induction. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 1999;276(5):F786–93.

15. D'Apolito M, Du X, Zong H, Catucci A, Maiuri L, Trivisano T, et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest*. 2010;120(1):203–13.
16. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2013;37(1):1–6.
17. D'Apolito M, Du X, Pisanelli D, Pettoello-Mantovani M, Campanozzi A, Giacco F, et al. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. *Atherosclerosis*. 2015;239(2):393–400.
18. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkkö S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med*. 2007;13(10):1176–84.
19. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2489–95.
20. Tepel M, van der Giet M, Statz M, Jankowski J, Zidek W. The antioxidant acetylcysteine reduces cardiovascular events in patients with end-stage renal failure: a randomized, controlled trial. *Circulation*. 2003;107(7):992–5.
21. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2006;48(5):752–60.

22. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56(7):1783–91.
23. Robertson RP. Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Dec;6(6):615–9.
24. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):463–6.
25. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813–20.
26. Lima VV, Spitler K, Choi H, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? *Clin Sci*. 2012;123(8):473–86.
27. Bond MR, Hanover JA. O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu Rev Nutr*. 2013;33:205–29.
28. Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, et al. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology*. 2007;17(2):127–40.
29. Konrad RJ, Kudlow JE. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med*. 2002;10(5):535–9.

30. Cooksey RC, Pusuluri S, Hazel M, McClain DA. Hexosamines regulate sensitivity of glucose-stimulated insulin secretion in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290(2):E334–40.
31. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, et al. p-Cresyl Sulfate Promotes Insulin Resistance Associated with CKD. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2013;24(1):88–99.
32. Covic AM, Schelling JR, Constantiner M, Iyengar SK, Sedor JR. Serum C-peptide concentrations poorly phenotype type 2 diabetic end-stage renal disease patients. *Kidney Int.* 2000;58(4):1742–50.
33. LUNDBAEK K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J.* 1962;1(5291):1507–13.
34. Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, Kimpara T, Hisanaga K, Sato N, et al. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis.* 2002;9(2):244–8.
35. Buchwalow I, Schnekenburger J, Tiemann K, Samoilova V, Bankfalvi A, Poremba C, et al. L-arginine-NO-cGMP signalling pathway in pancreatitis. *Sci Rep.* 2013;3:1899.
36. Kebede M, Ferdaoussi M, Mancini A, Alquier T, Kulkarni RN, Walker MD, et al. Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(7):2376–81.

37. El-Gamal D, Rao SP, Holzer M, Hallström S, Haybaeck J, Gauster M, et al. The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 2014;86(5):923-31
38. Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science.* 2012;337(6097):975–80.
39. DeFronzo RA, Tobin JD, Rowe JW, Andres R. Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to glucose and tissue sensitivity to insulin. *J Clin Invest.* 1978;62(2):425–35.
40. Bergman RN. Minimal model: perspective from 2005. *Horm Res.* 2005;64 Suppl 3:8–15.
41. Alvestrand A, Mujagic M, Wajngot A, Efendic S. Glucose intolerance in uremic patients: the relative contributions of impaired beta-cell function and insulin resistance. *Clin Nephrol.* 1989;31(4):175–83.
42. Mak RH. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 corrects insulin and lipid abnormalities in uremia. *Kidney Int.* 1998;53(5):1353–7.
43. Mak RH. Effect of metabolic acidosis on insulin action and secretion in uremia. *Kidney Int.* 1998;54(2):603–7.
44. Idorn T, Knop FK, Jørgensen M, Holst JJ, Hornum M, Feldt-Rasmussen B. Gastrointestinal factors contribute to glucometabolic disturbances in nondiabetic patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2013;83(5):915–23.

45. Allegra V, Mengozzi G, Martimbianco L, Vasile A. Glucose-induced insulin secretion in uremia: effects of aminophylline infusion and glucose loads. *Kidney Int.* 1990;38(6):1146–50.
46. Fadda GZ, Hajjar SM, Perna AF, Zhou XJ, Lipson LG, Massry SG. On the mechanism of impaired insulin secretion in chronic renal failure. *J Clin Invest.* 1991;87(1):255–61.
47. Fliser D, Pacini G, Engelleiter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int.* 1998;53(5):1343–7.
48. Duranton F, Depner TA, Argilés À. The saga of two centuries of urea: nontoxic toxin or vice versa? *Semin Nephrol.* 2014;34(2):87–96.
49. Zhang Z, Dmitrieva NI, Park J-H, Levine RL, Burg MB. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25):9491–6.
50. Jia L, Xing J, Ding Y, Shen Y, Shi X, Ren W, et al. Hyperuricemia causes pancreatic β -cell death and dysfunction through NF- κ B signaling pathway. *PloS One.* 2013;8(10):e78284.
51. Prentice KJ, Luu L, Allister EM, Liu Y, Jun LS, Sloop KW, et al. The Furan Fatty Acid Metabolite CMPF Is Elevated in Diabetes and Induces β Cell Dysfunction. *Cell Metab.* 2014;19(4):653–66.

52. Koeth RA, Kalantar-Zadeh K, Wang Z, Fu X, Tang WHW, Hazen SL. Protein carbamylation predicts mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013;24(5):853–61.
53. Kraus LM, Traxinger R, Kraus AP. Uremia and insulin resistance: N-carbamoyl-asparagine decreases insulin-sensitive glucose uptake in rat adipocytes. *Kidney Int*. 2004;65(3):881–7.
54. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2004;65(3):1009–16.
55. Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2013;83(6):1029–41.
56. Del Vecchio L, Locatelli F, Carini M. What We Know About Oxidative Stress in Patients with Chronic Kidney Disease on Dialysis—Clinical Effects, Potential Treatment, and Prevention. *Semin Dial*. 2011;24(1):56–64.
57. Jun M, Venkataraman V, Razavian M, Cooper B, Zoungas S, Ninomiya T, et al. Antioxidants for chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;10:CD008176.
58. Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause K-H. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 5):920-9.

59. Gao Y, Miyazaki J, Hart GW. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys*. 2003;415(2):155–63.
60. Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, et al. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31099–104.
61. Fardini Y, Masson E, Boudah O, Ben Jouira R, Cosson C, Pierre-Eugene C, et al. O-GlcNAcylation of FoxO1 in pancreatic β cells promotes Akt inhibition through an IGFBP1-mediated autocrine mechanism. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2014;28(2):1010–21.
62. Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, et al. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation*. 2008;117(9):1172–82.
63. Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, et al. Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem*. 1995;270(51):30253–6.
64. Richard A-MT, Webb D-L, Goodman JM, Schultz V, Flanagan JN, Getty-Kaushik L, et al. Tissue-dependent loss of phosphofructokinase-M in mice with

interrupted activity of the distal promoter: impairment in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(3):E794–801.

65. Tsuura Y, Ishida H, Shinomura T, Nishimura M, Seino Y. Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252(1):34–8.

66. Jenkins CM, Yang J, Sims HF, Gross RW. Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2011;286(14):11937–50.

67. Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, et al. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18572–9.

68. Goehring I, Sauter NS, Catchpole G, Assmann A, Shu L, Zien KS, et al. Identification of an intracellular metabolic signature impairing beta cell function in the rat beta cell line INS-1E and human islets. *Diabetologia.* 2011;54(10):2584–94.

69. Rao X, Duan X, Mao W, Li X, Li Z, Li Q, et al. O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. *Nat Commun.* 2015;6:8468.

70. Hajjar SM, Fadda GZ, Thanakitcharu P, Smogorzewski M, Massry SG. Reduced activity of Na(+)-K+ ATPase of pancreatic islets in chronic renal failure: role of secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol JASN.* 1992;2(8):1355–9.

71. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*. 2000;49(11):1751–60.
72. Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SRM. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab*. 2013;18(2):162–85.
73. Ferdaoussi M, Dai X, Jensen MV, Wang R, Peterson BS, Huang C, et al. Isocitrate-to-SEN1 signaling amplifies insulin secretion and rescues dysfunctional β cells. *J Clin Invest*. 2015;125(10):3847-60.
74. Nakamura Y, Yoshida T, Kajiyama S, Kitagawa Y, Kanatsuna T, Kondo M. Insulin release from column-perifused isolated islets of uremic rats. *Nephron*. 1985;40(4):467–9.
75. Pokrywczynska M, Flisinski M, Jundzill A, Krzyzanowska S, Brymora A, Deptula A, et al. Impact of Fructose Diet and Renal Failure on the Function of Pancreatic Islets. *Pancreas*. 2014;43(5):801-8.
76. Fergusson G, Ethier M, Guévremont M, Chrétien C, Attané C, Joly E, et al. Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab*. 2014;3(9):848–54.
77. Bailey JL, Zheng B, Hu Z, Price SR, Mitch WE. Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2006;17(5):1388–94.

78. Ivanovski O, Szumilak D, Nguyen-Khoa T, Ruellan N, Phan O, Lacour B, et al. The antioxidant N-acetylcysteine prevents accelerated atherosclerosis in uremic apolipoprotein E knockout mice. *Kidney Int.* 2005;67(6):2288–94.
79. Peyot M-L, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, et al. Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2009;284(25):16848–59.
80. Alquier T, Peyot M-L, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, et al. Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes.* 2009;58(11):2607–15.
81. Moore PC, Ugas MA, Hagman DK, Parazzoli SD, Poitout V. Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes.* 2004;53(10):2610–6.
82. Fontés G, Zarrouki B, Hagman DK, Latour MG, Semache M, Roskens V, et al. Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia.* 2010;53(11):2369–79.

Figures

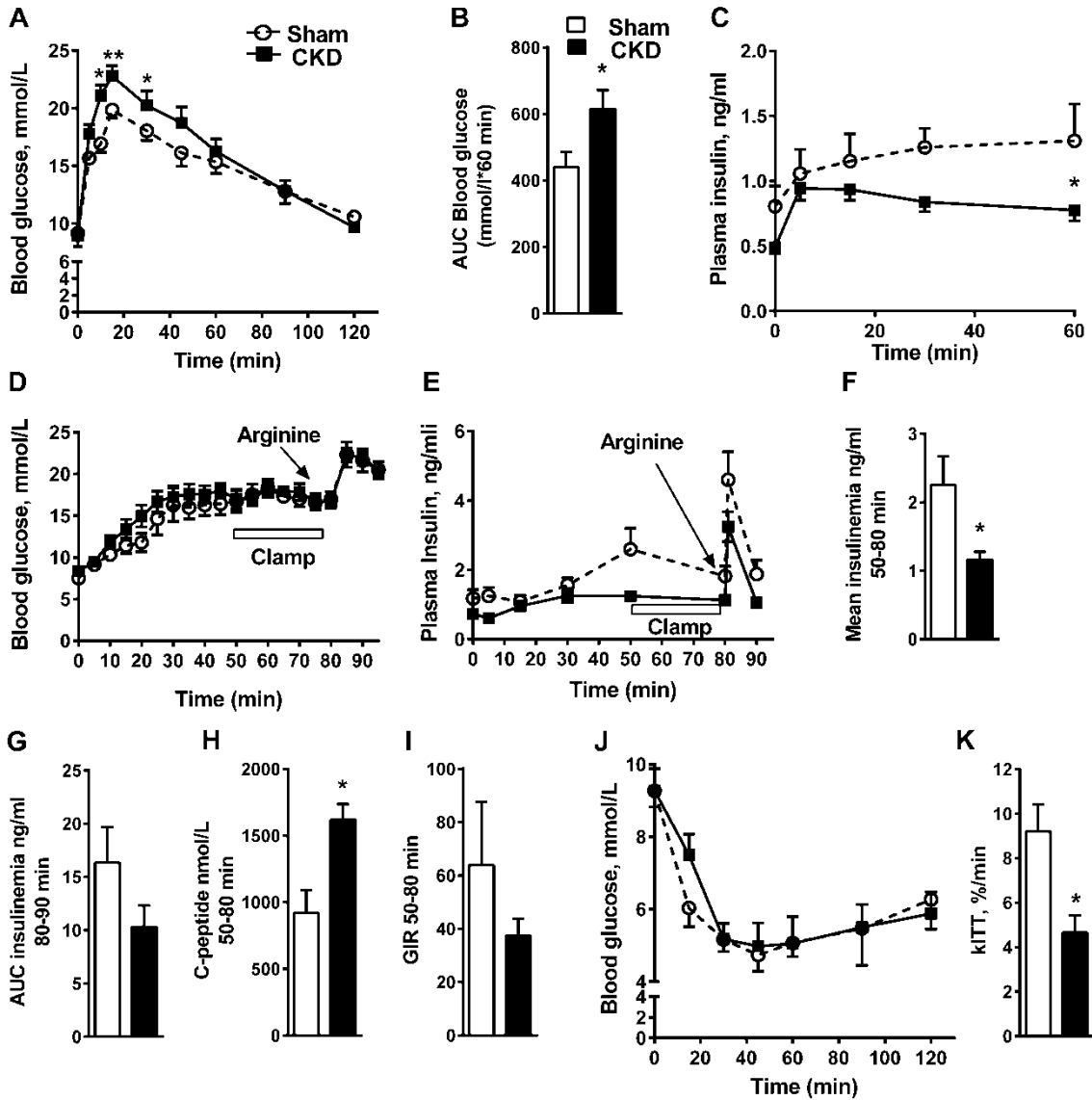


Figure 2. 1: CKD mice have defective glucose-stimulated insulin secretion *in vivo*.

(A) Blood glucose and (B) Area under the curve (AUC) during an i.p. glucose tolerance test (IPGTT) (1g/kg) in CKD or sham-operated mice. (C) Insulin levels during the IPGTT (n=9-10). (D) Glucose levels during hyperglycemic clamps (HGC). (E) Insulin levels during HGC and in response to an arginine bolus (1 mmol/kg). (F) Mean insulinemia during the clamp (50-80 min). (G) Arginine-induced insulin secretion (AUC) from 80-90 min (n=7). (H) Mean C-peptide during the clamp (50-80 min). (I) Glucose infusion rate during the clamp (50-80 min). Blood glucose (J) and glucose disappearance rate (kITT) (K) during i.p. insulin tolerance test (IPITT) (0.5 UI/kg) (n=3-4). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05; **p<0.01 versus CKD for the same time; two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test for A, C, D, E, J and unpaired Student's t test for B, F, G, H, I, K.

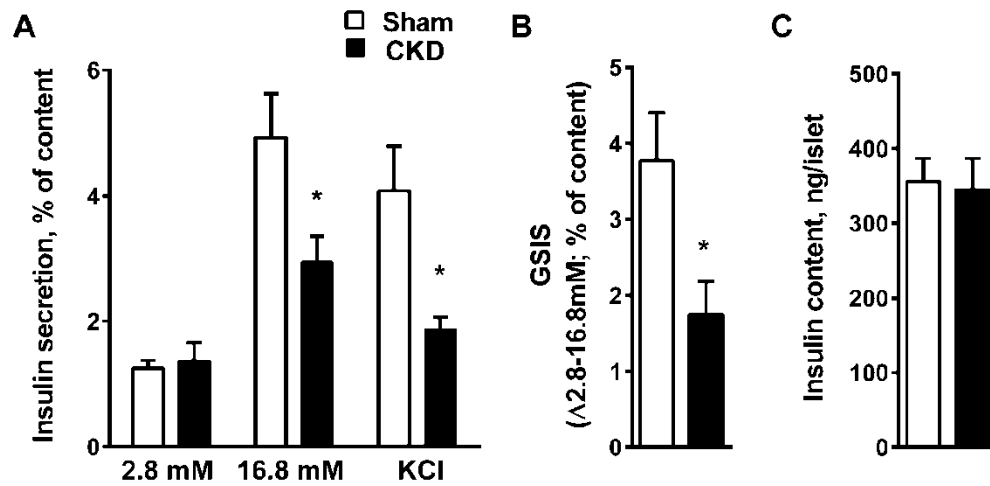


Figure 2. 2: Isolated islets from CKD mice have reduced insulin release in response to glucose and KCl.

(A) Insulin secretion, shown as a percentage of islet insulin content, was assessed in 1-h static incubations in islets isolated from CKD and sham-operated mice after 3 weeks in response to 2.8 or 16.8 mM glucose or 2.8 mM glucose plus 35 mM KCl. (B) Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS, Δ 2.8-16.8mM) in sham and CKD mice after 3 weeks. (C) Total islet insulin content. Data are mean \pm S.E.M., of 5-10 replicate experiments, * p <0.05 versus CKD for the same incubation condition by one-way ANOVA, Bonferroni post hoc test for A and unpaired Student's t test for B,C.

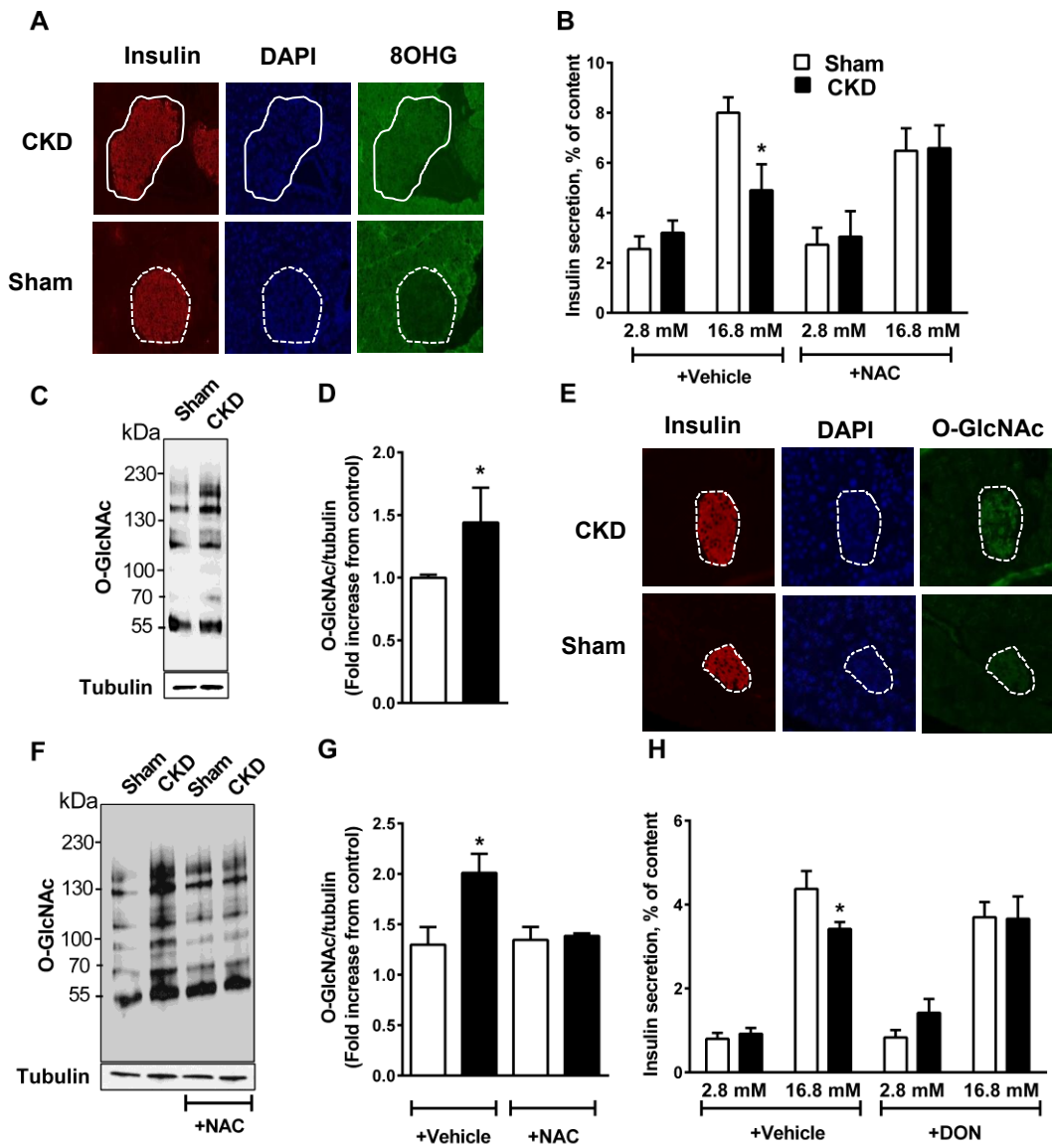


Figure 2.3: CKD mice show an increase of O-GlcNAcylation in islets and oxidative stress markers.

(A) Immunostaining of 8-hydroxyguanosine (8-OHG) in pancreatic sections of CKD and sham mice. (B) Insulin secretion, shown as a percentage of insulin content, was assessed in 1-h static incubations in isolated islet from CKD or sham mice after 3 weeks with or without NAC treatment (200 mg/kg/day p.o., n=3-5). (C-D) Representative Western Blot and quantification (n=3) for total islet protein O-GlcNAcylation. (E) Immunostaining of O-GlcNAc in pancreatic sections of CKD and sham mice. (F-G) Representative Western Blot and quantification (n=4) for total protein O-GlcNAcylation in isolated islet from CKD and sham mice with/without NAC treatment. (H) Insulin secretion, shown as a percentage of insulin content, in isolated islets from CKD mice treated with or without DON (1.5 mg/kg/3x/week, n=4-5). Data are expressed as mean \pm S.E.M., * $p < 0.05$ versus CKD for the same incubation condition; unpaired Student's t test for D and one-way ANOVA Bonferroni post hoc test for B, G, H.

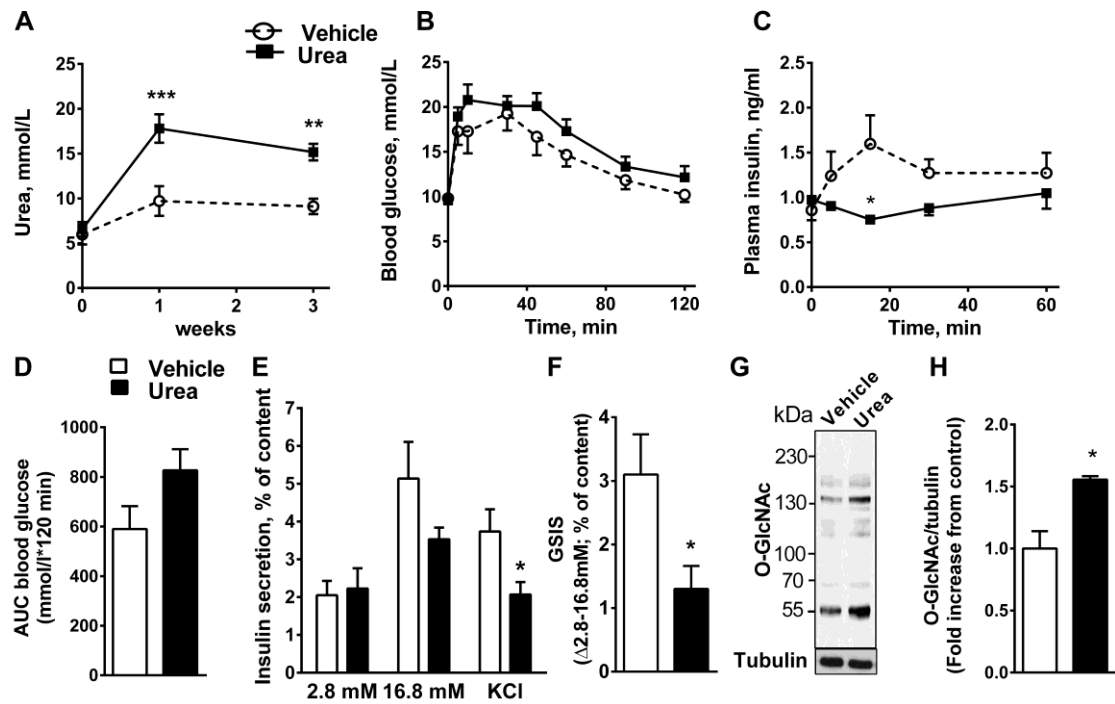


Figure 2. 4: Exposure to urea in drinking water increases circulating urea levels and inhibits insulin secretion.

(A) Urea consumption in drinking water (25 g/l) elevates blood urea levels independently of renal failure (n=4-5). (B) Blood glucose and (C) corresponding insulin levels during IPGTTs (n=3-4). (D) Area under the curve (AUC) during IPGTTs. (E) Insulin secretion shown as a percentage of insulin content assessed in 1-h static incubations in islet from mice after 3 weeks with/without urea in drinking water (n=4). (F) Glucose-stimulated insulin secretion (Δ 2.8-16.8mM) (n=4). (G) Representative Western Blot and (H) quantification for total protein O-GlcNAcylation in islets in mice with/without the addition of urea to drinking water for 3 week (n=3-4). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus vehicle; two-way ANOVA Bonferroni post hoc test for A,B,C one-way ANOVA Bonferroni post hoc test for E and unpaired Student's *t* test for D,F, H.

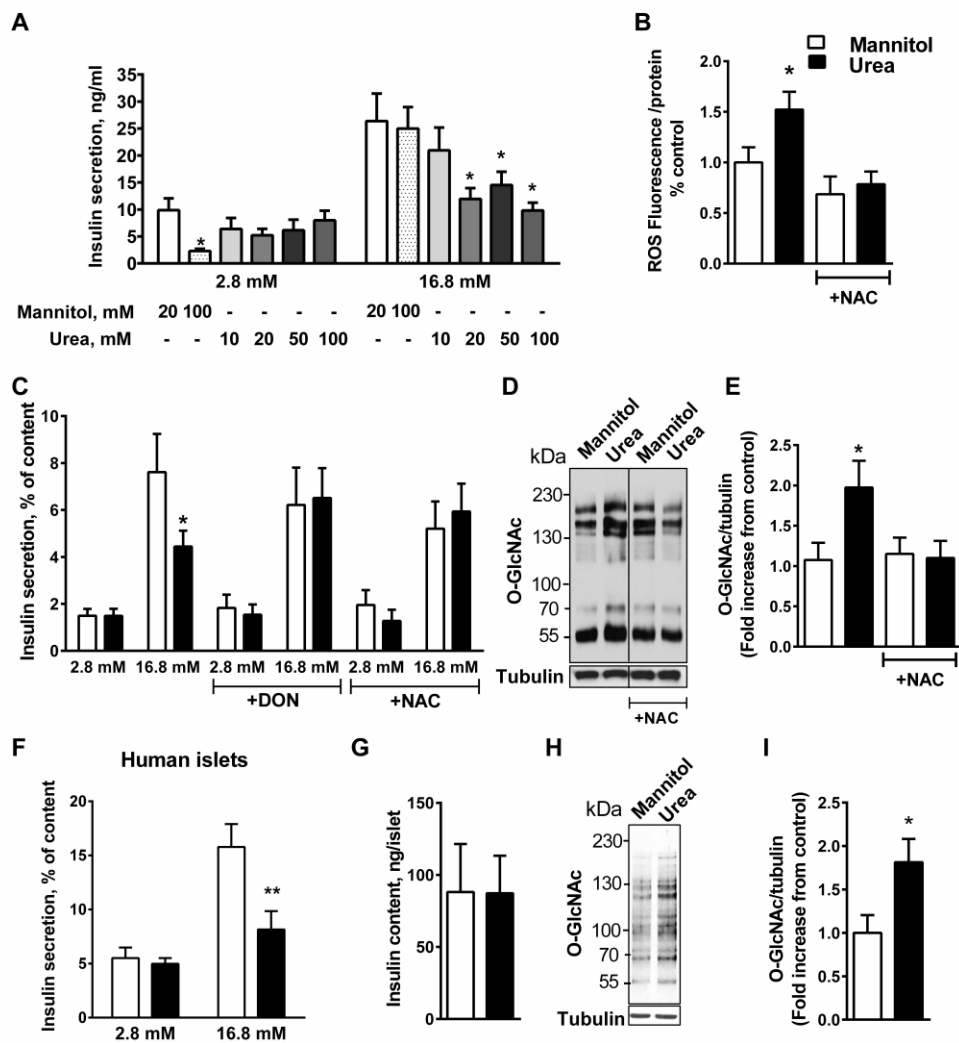


Figure 2. 5: The insulin secretory defect resulting from exposure of normal mouse or human islets to urea is prevented by antioxidant treatment or GFAT inhibition.

(A) 1-h static insulin incubations of isolated islets from normal mice cultured for 24 h with increasing urea levels (n=3-5). (B) ROS accumulation in mouse islets treated with mannitol or urea with or without N-acetyl cysteine (NAC, 500 μ M) for 24 h (n=8-3). (C) Insulin secretion shown as a percentage of insulin content as assessed in 1-h static incubations in the presence of 20 mM urea or mannitol as an osmotic control +/- the inhibitor of GFAT 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON, 20 μ M) or the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC, 500 μ M) (n=4-11). (D) Representative Western Blot and (E) quantification for total protein O-GlcNAcylation in urea-treated islets with/without NAC (n=4). (F) Insulin secretion shown as a percentage of islet insulin content from human islets incubated for 24 h with 20 mM urea or mannitol (n=5). (G) Total insulin content in urea-treated human islets. (H) Representative Western Blot and (I) quantification for total protein O-GlcNAcylation in urea-treated human islets (n=5). Data are expressed as mean \pm S.E.M., *p<0.05 versus mannitol for the same incubation condition; one-way ANOVA Bonferroni post hoc test for A, B, C, E, F, unpaired Student's t test for G,I.

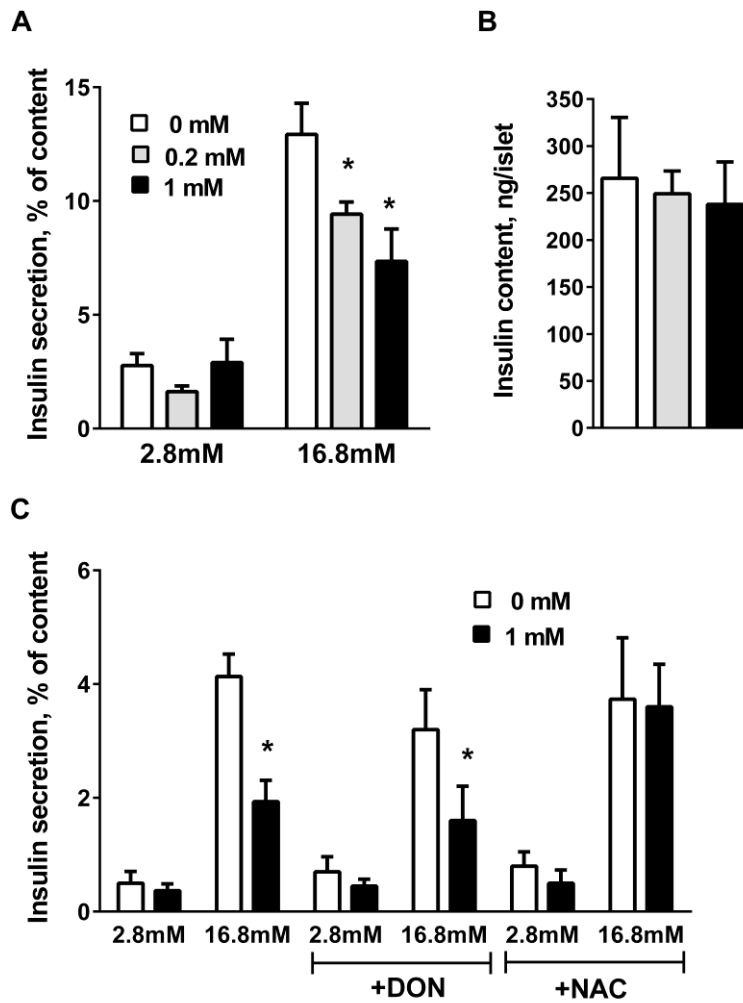


Figure 2. 6: Cyanate inhibits insulin secretion in islets *ex vivo*.

(A) Insulin secretion shown as a percentage of insulin content as assessed in 1-h static incubations and (B) total islet insulin in presence of 0, 0,2 and 1 mM of cyanate (n=3-4). (C) Insulin secretion shown as a percentage of insulin content as assessed in 1-h static incubations in the presence of 1 mM cyanate +/- the inhibitor of GFAT (6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON, 20 μ M) or the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC, 500 μ M) (n=3-4). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05 versus control for the same incubation condition by one-way ANOVA, Bonferroni post hoc tests.

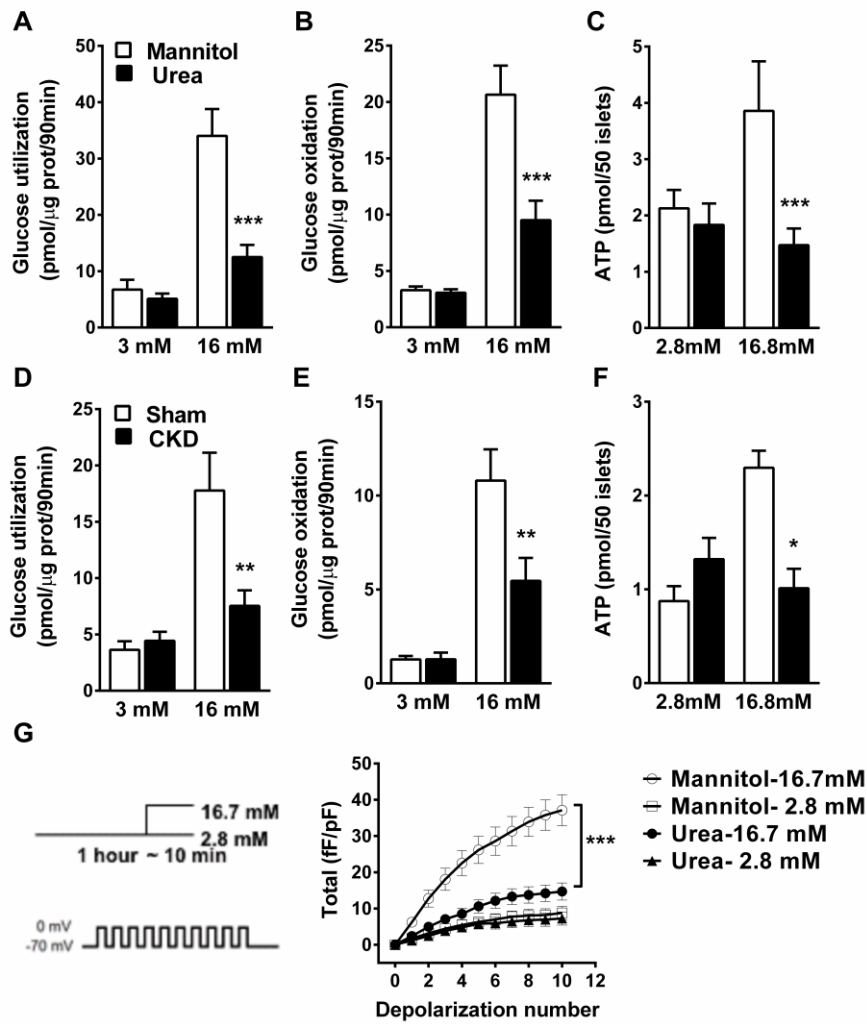


Figure 2. 7: Normal mouse islets exposed to urea and islets from CKD mice have impaired glucose metabolism.

Glucose utilization (A and D) and oxidation (B and E) measured in islets incubated for 90 min in KRBH at 3 mM or 16 mM glucose with D-[5-³H]glucose and D-[U-¹⁴C]glucose in urea-treated and CKD islets (n=4). (C and F) Total ATP content determined in islets incubated for 15 min in KRBH at 2.8 mM and 16.8 mM glucose (n=3-4). (G) Averaged data of exocytotic responses of single β-cells measured as increases in cell membrane capacitance by whole-cell patch clamp (arrow) performed after acute pre-treatment with 2.8 mM or 16.7 mM glucose (mean of 21-27 cells from 3 independent mice) after urea or mannitol treatment. Data are mean ± S.E.M., *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus control; two-way ANOVA Bonferroni post hoc test for G and one-way ANOVA Bonferroni post hoc test for A,B,C,D,E, and F.

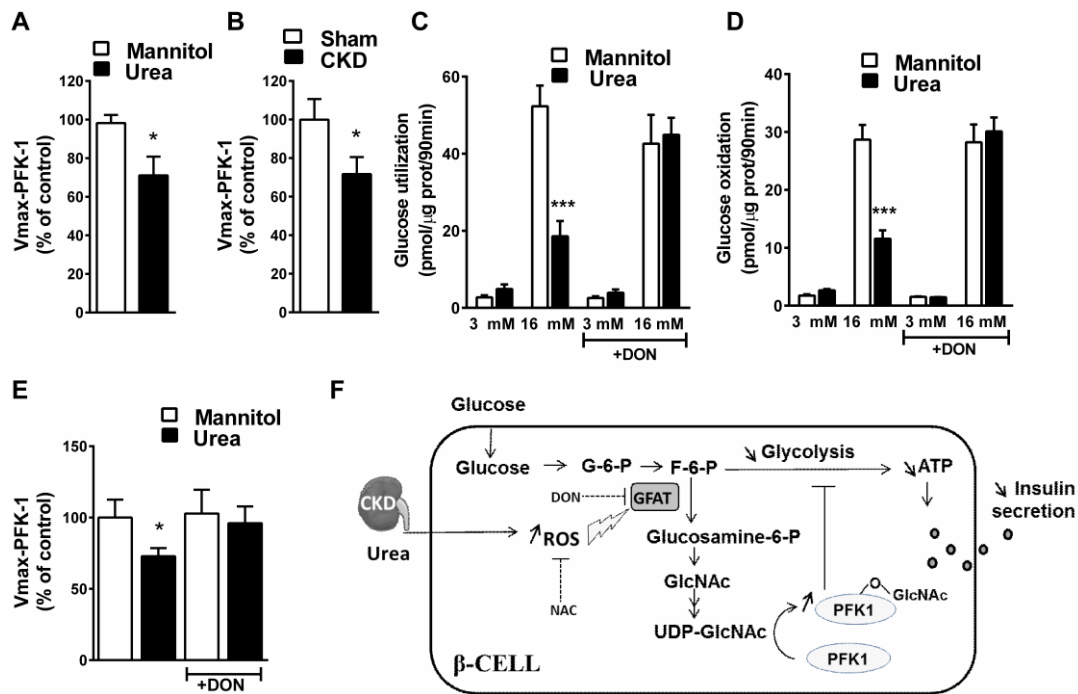


Figure 2. 8: Inhibiting protein O-GlcNAcylation in islets restores glucose metabolism and PFK-1 activity

Vmax of phosphofructokinase-1 in islets (A) after urea treatment (n=3) and (B) in CKD islets (n=4-5). Glucose utilization (C) and oxidation (D) measured in islets incubated for 90 min in KRBH at 3 mM or 16 mM glucose with D-[5-³H]glucose and D-[U-¹⁴C]glucose, respectively, in urea-treated +/- the inhibitor of GFAT 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON, 20 μM) (n=4). (E) Vmax of phosphofructokinase-1 in islets after urea treatment +/- DON (n=4-5). Data are mean ± S.E.M., *p<0.05, ***p<0.001 versus control; one-way ANOVA Bonferroni post hoc test for C,D,E and unpaired Student's t test for A,B. (F) Schematic representation of the mechanisms of pancreatic β-cells dysfunction in CKD.

Table 2. 1 Biometry, organ weights and metabolic parameters in sham or CKD mice at 3 weeks

	Sham	CKD	p value
Mice (n)	6	9	
Biometry			
Body weight, g	23.7 ± 0.6	22.7 ± 0.5	NS
Organ weight			
Liver, mg/10g BW	454.8 ± 147,2	467.7 ± 144.5	NS
Gastrocnemius, mg/10g BW	56.6 ± 4,7	51.4 ± 4.5	NS
Pancreas, mg/10g BW	108.1 ± 3,7	124.6 ± 2.5	0.001
eWAT, mg/10g BW	85.8 ± 9,4	42.7 ± 2.5	<0.001
scWAT mg/10g BW	52.5 ± 4,1	28.0 ± 4.0	0.0019
rWAT mg/10g BW	14.6 ± 3,6	6.9 ± 1.9	NS
Metabolic parameters			
Urea, mmol/L	10.1 ± 0.6	27.8 ± 0.4	<0.001
Creatinine, µmol/L	8.5 ± 1.4	24.2 ± 1.8	<0.001
Fed insulinemia, ng/mL	1.18 ± 0.25	0.73 ± 0.11	NS
Fasted insulinemia, ng/mL	0.92 ± 0.05	0.49 ± 0.17	0.03
Fed glycemia, mmol/L	8.3 ± 0.2	9.9 ± 0.4	<0.001
Fasted glycemia, mmol/L	8.7 ± 0.3	8.8 ± 0.2	NS
Fed NEFA, mmol/L	0.063 ± 0.006	0.101 ± 0.015	0.03
Fasted NEFA, mmol/L	0.650 ± 0.050	0.846 ± 0.081	NS
Data are mean ± SEM			

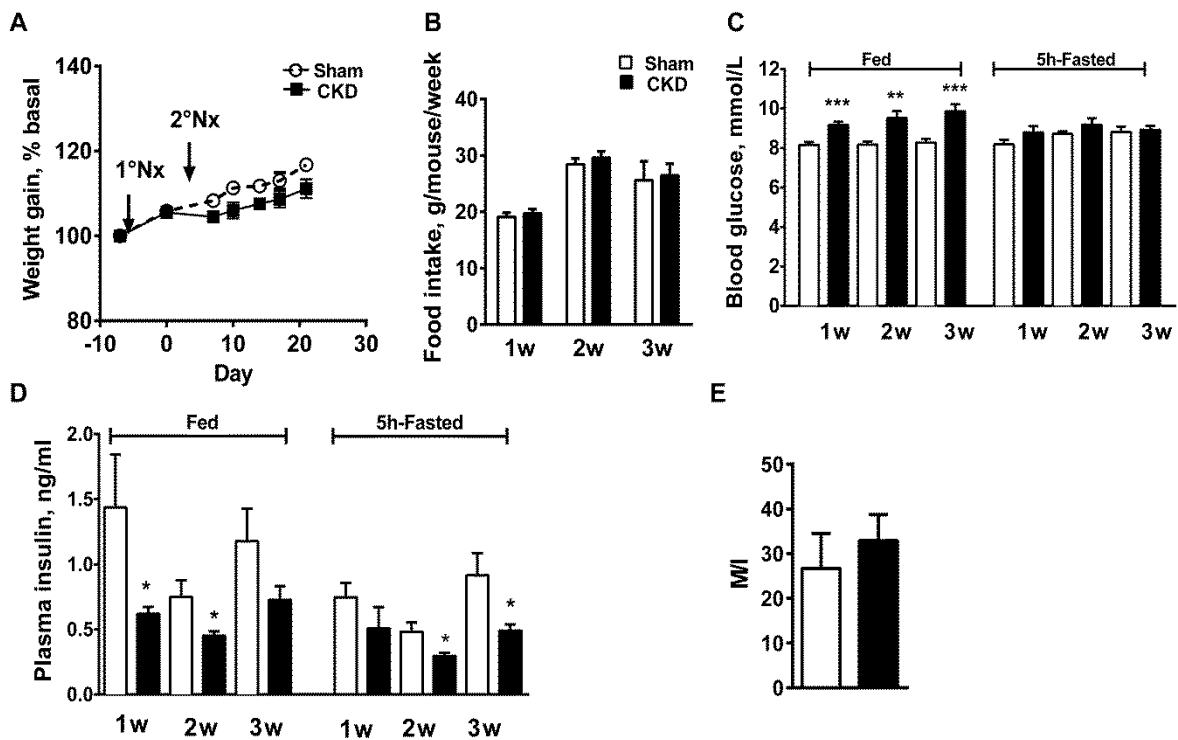


Figure 2.S 1: Body weight, food intake and metabolic parameters in sham and CKD mice.

(A) Weight gain in CKD and sham mice (n=32-36). (B) Food intake in CKD and sham mice (n=22-35). (C) Fed and 5h-fasted glycaemia (n=10-20) and (D) insulinemia in CKD and sham mice (n=5-11). (E) M/I index during hyperglycemic clamp (n=7). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus sham; two-way ANOVA Bonferroni post hoc test for A, B, D and E and unpaired two-tailed Student's *t* test for C.

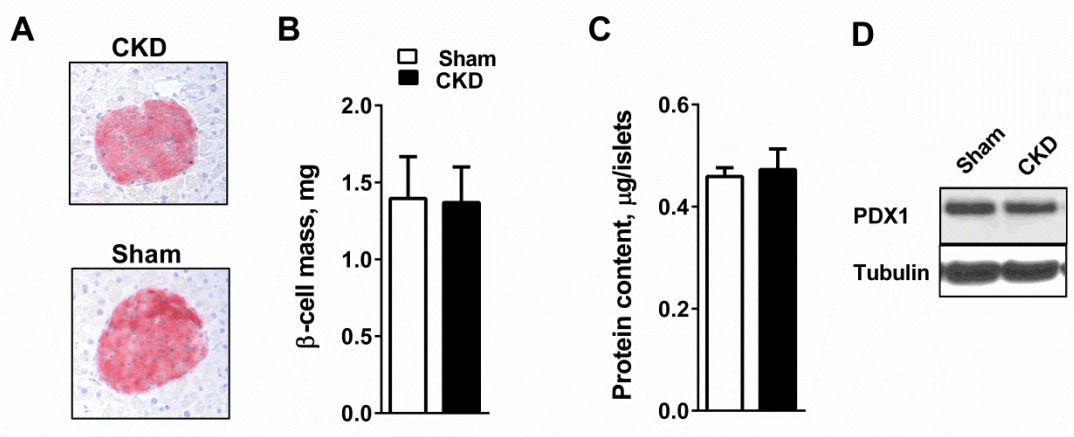


Figure 2.S 2: β -cell mass and protein content in islets from sham and CKD mice.

(A) Representative pancreatic sections stained for insulin (B) β -cell mass measured in pancreatic sections by insulin immunostaining and morphometric analysis (n=3-4). (C) Protein content in sham and CKD islets (n=4). (D) Representative Western Blot for PDX-1 CKD islets (n=2). Data are mean \pm S.E.M., unpaired two-tailed Student's *t* test.

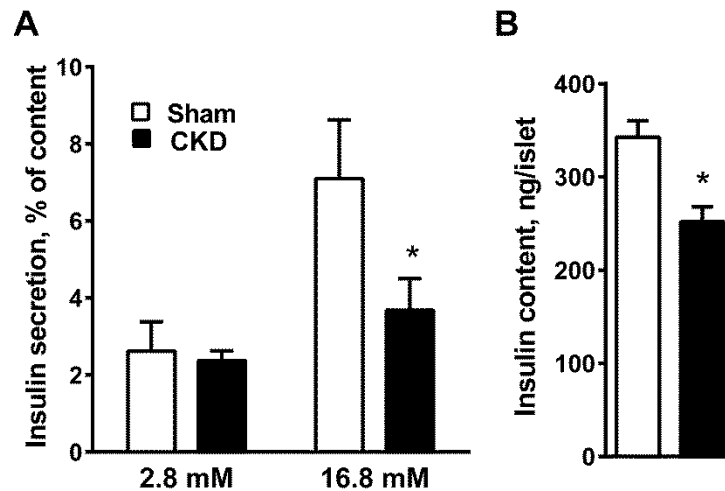


Figure 2.S 3: Insulin secretion in isolated islets from CKD mice at 6 weeks.

(A) Insulin secretion, shown as a percentage of islet insulin content, was assessed in 1-h static incubations in islets isolated from CKD and sham-operated mice in response to 2.8 or 16.8 mM glucose 6 weeks after surgery. (B) Total islet insulin content. Data are mean \pm S.E.M., **p*<0.05 versus control for the same incubation condition by one-way ANOVA for A and student *t* test for B.

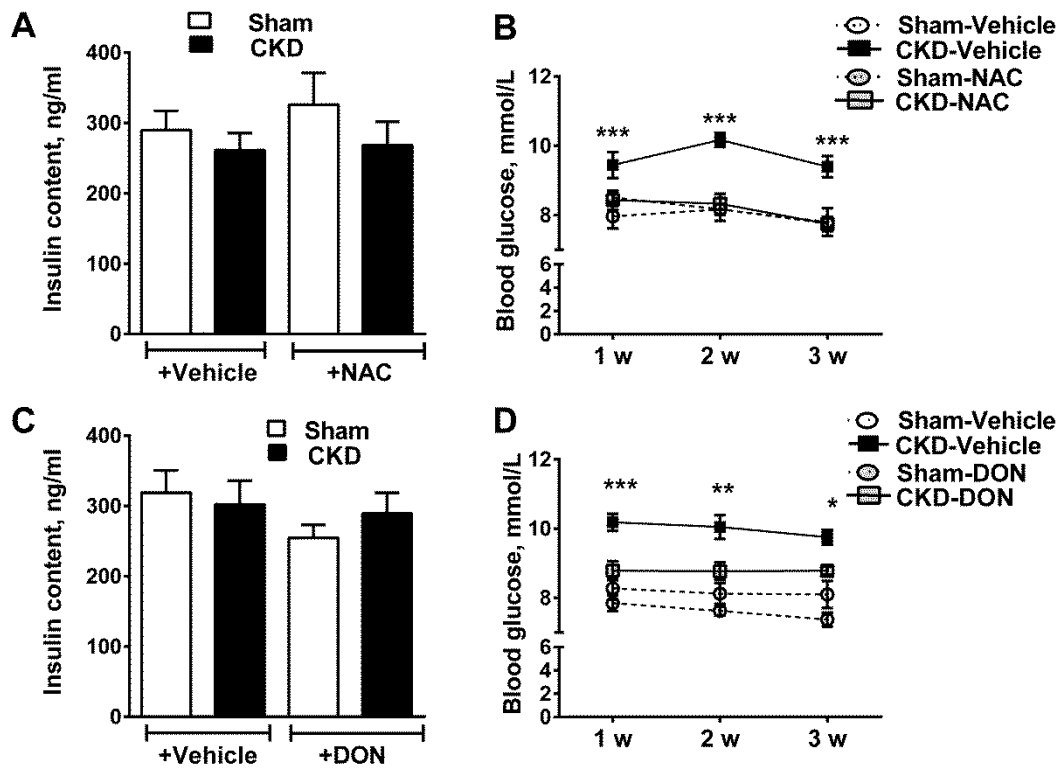


Figure 2.S 4: Fed glycemia, insulin content in islets in CKD and sham mice with/without NAC and DON.

(A) Total Insulin content in islets and (B) fed glycaemia in CKD mice with/without NAC (n=5-6). (C) Insulin content in islets and (D) fed glycaemia and in CKD mice with/without DON (n=4-6). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 versus vehicle; one way-ANOVA.

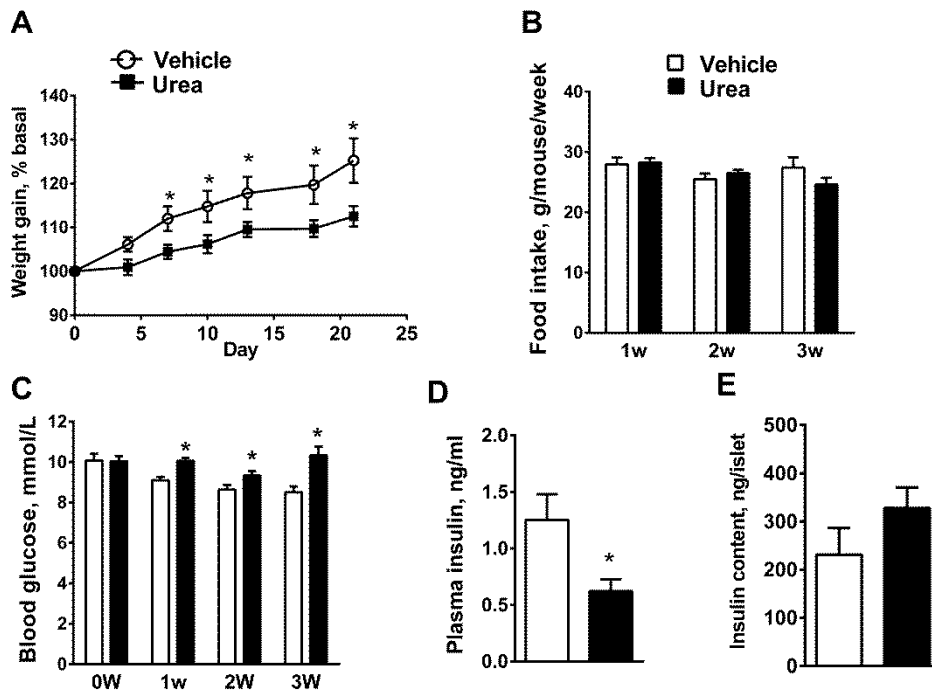


Figure 2.S 5: Body weight, food intake, metabolic parameters, insulin content in islets from normal mice with/without urea administration.

(A) Percentage of weight gain and (B) total food intake in normal mice with/without urea (n=8-10) (C) Fed glycaemia (8-10) and (D) one week fed insulinemia in normal mice with/without urea (n=3-4). (E) Total islet insulin content after 3 weeks in mice with/without urea in drinking water (n=4). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05, versus vehicle; two-way ANOVA for A and C and unpaired two-tailed Student's *t* test for B, D and E.

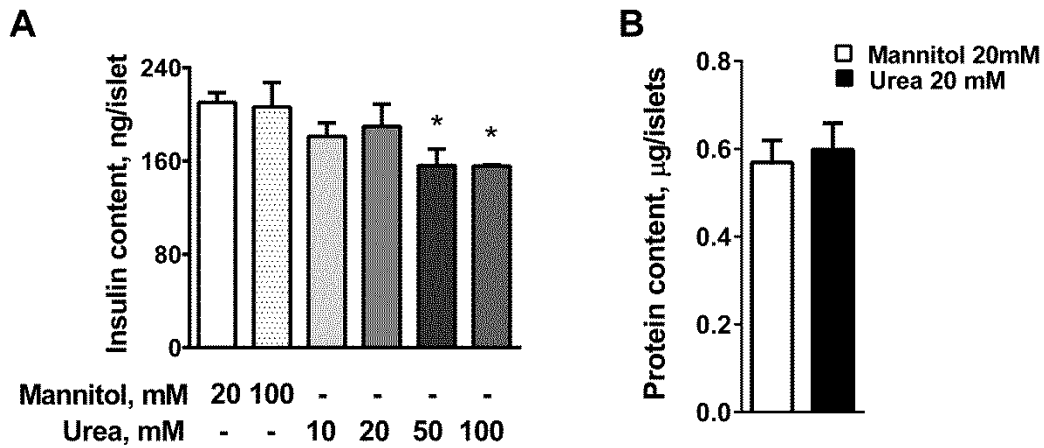


Figure 2.S 6: Insulin and proteins content in urea-treated islets.

(A) insulin content in isolated islets from normal mice cultured for 24 h with increasing urea levels (n=3-5). (B) Protein content in mannitol and urea-treated islets (n=4). Data are mean \pm S.E.M., *p<0.05; two-way ANOVA Bonferroni post hoc test for A and unpaired two-tailed Student's *t* test for B.

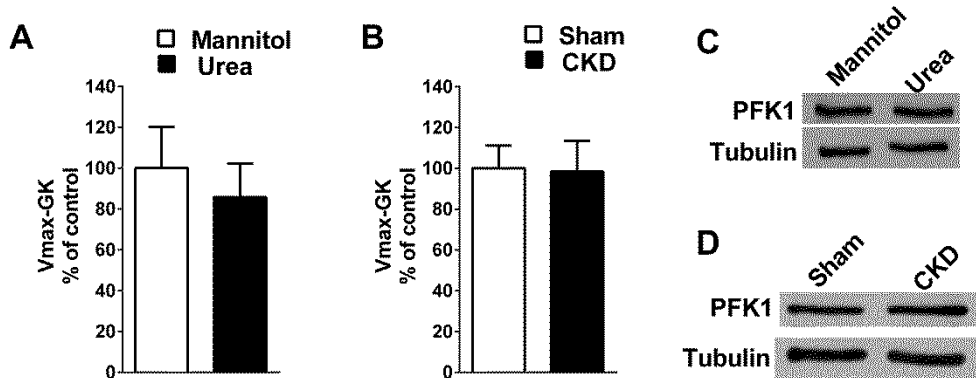


Figure 2.S 7: Glucokinase activity and phosphofruktokinase-1 expression in islets after urea treatment and from CKD mice.

Enzymes activity of glucokinase from urea-treated (A) and CKD islets (B) (n=3). Immunoblotting for PFK1 protein expression levels in urea-treated islets (C) and in CKD islets (D) (representative blot of 3 replicate experiments). Data are mean \pm S.E.M., unpaired two-tailed Student's *t* test.

Table 2. S 1. Biometry and metabolic parameters in sham or CKD mice with/without NAC treatment during 3 weeks

	Sham-Vehicle	CKD-Vehicle	Sham-NAC	CKD-NAC
Mice (n)	6	7	10	10
Biometry				
Body weight, g	23.0 ± 0.6	22.0 ± 0,4	24.5 ± 0.5*	22.8 ± 0.4
Metabolic parameters				
Urea, mmol/L	11.3 ± 1.8	30.5 ± 5.1*	12.3 ± 1.4	30.0 ± 3.4*
Fed glycemia, mmol/L	8.2 ± 1.0	9.4 ± 0.5*	7.7 ± 0.2	7.8 ± 0.2
Fed insulinemia, ng/mL	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1*	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.3

Data are mean ± S.E.M.

*p<0.05 by one-way ANOVA versus control, Bonferroni post hoc test

Table 2. S 2 Biometry and metabolic parameters in sham or CKD mice with/without DON treatment during 3 weeks

	Sham-Vehicle	CKD-Vehicle	Sham-DON	CKD-DON
Mice (n)	4	6	4	7
Biometry				
Body weight, g	24.5 ± 0.6*	22.5 ± 0.6	24.1 ± 0,8	22.7 ± 0.3
Metabolic parameters				
Urea, mmol/L	11.0 ± 0.8	32.0 ± 2.2*	7.9 ± 1.1	26.6 ± 1.1*
Fed glycemia, mmol/L	7.4 ± 0.2	9.7 ± 0,2*	8.1 ± 0.4	8.8 ± 0.1

Data are mean ± SEM

*p<0.05 by one-way ANOVA versus control, Bonferroni post hoc test

Table 2. S 3. Biometry and metabolic parameters in urea (25 g/L in drinking water) or vehicle treated mice

	Vehicle		Urea		p value
Mice (n)	6		7		
Biometry					
Body weight, g	25.6	± 0.9	25.1	± 1.4	0.68
Metabolic parameters					
Fed glycemia, mmol/L	8.5	± 0.29	10.34	± 0.43	0.01
Fasted glycemia, mmol/L	9.30	± 0.5	10.3	± 0.6	0.16
Fed insulinemia, ng/mL	0.89	± 0.15	0.47	± 0.02	0.03
Fasted insulinemia, ng/mL	0.90	± 0.13	0.91	± 0.19	0.99

Data are mean ± SEM

Table 2. S 4. Islet donor characteristics

Sex	Age	BMI
4F/6M	48.3±4.2	28.3±2.3

Chapitre 3- Discussion

Retour sur les résultats

Les études qui ont été faites dans le cadre de ce mémoire avaient pour but d'identifier le mécanisme par lequel l'urée, composante majeure de l'environnement urémique, pouvait induire une dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC. Nous avons démontré qu'un traitement chronique à l'urée dans des îlots isolés chez la souris et chez l'homme induisait un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose, tel qu'observé *in vivo* et *ex vivo* dans nos modèles de souris urémiques. Ce défaut de sécrétion était associé à une élévation du stress oxydant (dont la source n'était pas connue) et du niveau de l'O-glycosylation des protéines totales. En co-traitant les îlots avec la NAC (soit un composé qui cible différentes sources de radicaux libres grâce à ses effets antioxydants directs (via son groupe thiol) et indirects (via la production du glutathion) (99)) nous étions en mesure, d'une part, de prévenir le défaut de sécrétion d'insuline causé par l'urée, et d'autre part, de ramener à un niveau basal le patron d'O-glycosylation. Le métabolisme du glucose était également perturbé en contexte urémique. En effet, nous avons observé une réduction de l'utilisation du glucose qui était associée avec une baisse de l'activité enzymatique de PFK1; et toutes les étapes en aval de la glycolyse impliquées dans le mécanisme intracellulaire de la sécrétion d'insuline étaient par conséquent perturbées. En bloquant l'augmentation de l'O-glycosylation induite par l'urée, nous avons été en mesure de restaurer l'activité de PFK1, la glycolyse ainsi que la sécrétion d'insuline. Nous proposons donc un mécanisme par lequel l'accumulation chronique d'urée au cours de l'IRC affecte la fonction de la cellule bêta-pancréatique

via la production de ROS qui provoque une augmentation du niveau d'O-glycosylation des protéines totales dans l'îlot. Cette augmentation d'O-glycosylation mène à l'inhibition de la glycolyse par la modification post-traductionnelle d'une enzyme clé et limitante de la glycolyse, aboutissant à une sécrétion inadéquate d'insuline en réponse au glucose.

Le stress oxydant et l'O-glycosylation comme médiateurs de la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC

Dans cette étude, nous avons observé une perturbation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose associée à une augmentation du stress oxydant et des O-glycosylations. Une augmentation du flux vers la voie des hexosamines en cas de stress cellulaire (comme le stress oxydant) serait un mécanisme qu'adoptent les cellules pour se protéger des effets délétères que peuvent causer le stress (70, 100, 101). En effet, une étude de Zachara et collègues (102) a démontré que le gain de tolérance qu'acquiert une cellule face à une multiplicité de stress (choc thermique, exposition aux rayons UV, hypoxie et stress oxydant) est corrélé avec l'augmentation du niveau de protéines O-glycosylées. Il est aussi connu que pour se protéger, la cellule va promouvoir la capture du glucose à l'intérieur de la cellule afin de garder un niveau d'ATP élevé et maintenir également le potentiel membranaire mitochondrial (103-107). Zachara propose donc un mécanisme dans lequel l'augmentation du flux de glucose transporté à l'intérieur par la cellule en réponse au stress amène la cellule à augmenter sa réserve d'UDP-GlcNAc, induisant de ce fait

une élévation du niveau de protéines O-glycosylées (70). Cependant, dans notre étude, nous n'observons pas d'effets bénéfiques suite à l'augmentation du niveau d'O-glycosylation. Au contraire, la production d'ATP en réponse au glucose ainsi que l'activité mitochondriale sont réduites dans les îlots traités à l'urée et dans les îlots isolés de souris urémiques. De plus, dans l'étude de Zachara, le stress était induit de manière aiguë et les cellules étaient amenées à récupérer 24 à 48 h après l'induction du stress, ce qui avait pour conséquence un retour au niveau basal de l'O-glycosylation des protéines. En contexte urémique, l'urée est constamment en circulation dans l'environnement, maintenant de ce fait un niveau constant de stress oxydatif dans les cellules. Ceci a été observé dans des cellules adipeuses et endothéliales (12, 95); et nous observons le même phénomène dans la cellule bêta-pancréatique. Cette surcharge de ROS mène à une augmentation chronique du niveau d'O-glycosylation. Ainsi, alors qu'en contexte physiologique la voie des hexosamines est essentielle pour le maintien l'intégrité de la cellule bêta (108, 109), en contexte pathologique tel que l'urémie, l'O-glycosylation contribue à la dysfonction de la cellule bêta.

Une augmentation chronique du niveau d'O-glycosylation des protéines est connue pour être impliquée dans l'étiologie de plusieurs maladies autre que le diabète dont l'Alzheimer, les troubles cardiaques et le cancer (64, 110). L'O-glycosylation est un mécanisme contributeur aux lésions tissulaires et aux dysfonctions cellulaires associées à la pathophysiologie de ces maladies (64). Par exemple, dans une étude récente, les auteurs ont démontré qu'une augmentation du niveau d'O-glycosylation total aboutit à la réduction du métabolisme glycolytique

dans les cellules cancéreuses (111). Ils ont démontré que dans un tel contexte, PFK1 est O-glycosylée, ce qui a pour effet de perturber son activité. Nous observons le même phénomène dans la cellule bêta-pancréatique en contexte urémique. En effet, l'augmentation du niveau d'O-glycosylation causée par l'urée est associée à la réduction de l'activité de PFK1. PFK1 catalyse une étape clé de la glycolyse, soit l'étape qui assure l'engagement du glucose dans la glycolyse (112-114). Il est connu que la perturbation de l'activité de PFK1 mène à un défaut de glycolyse et du métabolisme dans plusieurs types cellulaires incluant la cellule bêta-pancréatique et affecte par conséquent la sécrétion de l'insuline (115). Dans notre modèle, il serait donc possible que PFK1 soit l'une des protéines ciblées par O-glycosylation, provoquant de ce fait la réduction que nous observons dans son activité, ce qui mène à une baisse générale du métabolisme.

Ainsi, le stress oxydant et l'O-glycosylation comme médiateurs d'une dysfonction cellulaire sont des phénomènes couramment observés en contexte pathologique, et au cours de l'IRC, ces mêmes acteurs seraient la cause principale de la dérégulation de la cellule bêta-pancréatique.

Modèles de perturbation de la fonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC

Notre modèle de perturbation de la sécrétion d'insuline au cours de l'urémie supporte le fait que la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique est un facteur qui contribue à la dérégulation de l'homéostasie glucidique observé au cours de l'IRC.

Cependant, nos données présentent à la fois des similitudes et des différences avec les autres études qui se sont penchées sur la fonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC. Ici, nous avons montré qu'un traitement d'urée à 20 mM provoque une réduction significative de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose sans altération du contenu en insuline, tel qu'observé dans notre modèle de souris IRC après 3 semaines. Ceci suppose que le défaut sécrétoire que nous observons est attribuable à un défaut dans le mécanisme intracellulaire de la sécrétion d'insuline, et d'autres ont déjà reporté ce phénomène (40). Cependant, certaines équipes utilisant d'autres modèles d'IRC ont attribué ce défaut sécrétoire à une baisse de biosynthèse d'insuline ou à une augmentation d'apoptose dans la cellule bêta (41, 77). Différentes explications permettent de justifier la différence que nous observons entre nos données et celles de la littérature.

Premièrement, ces données divergentes peuvent être expliquées par le stade d'IRC reproduit dans ces différents modèles. En effet, à 20 mM d'urée, notre modèle mimique une IRC en stade modéré où les concentrations d'urée ne sont pas aussi élevées que celles observées chez les patients en pré-dialyse. De manière intéressante, nous avons effectué une dose-réponse de la sécrétion d'insuline en fonction de la concentration d'urée (Figure 2.5 A) et ce n'est qu'à partir de 50 mM d'urée que nous observons une diminution du contenu en insuline. Il aurait d'ailleurs été intéressant de vérifier si l'apoptose est induite dans ces conditions, ce qui confirmerait l'hypothèse selon laquelle les différences observées entre nos données et ceux de la littérature peuvent être attribuables aux différences entre le stade d'IRC reproduit dans chacune des études respectives. Nous observons le même

phénomène auprès de nos souris IRC : alors qu'à 3 semaines d'IRC le contenu en insuline n'est pas modifié mais la sécrétion d'insuline en réponse au glucose l'est, à 6 semaines, le contenu en insuline est à la baisse. Ainsi, il serait possible de croire qu'en stade modéré d'IRC, la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique a lieu au niveau du mécanisme intracellulaire, alors qu'en stade avancé, un défaut additionnel au niveau de la biosynthèse d'insuline ou de la mort cellulaire serait présent. Il aurait également été intéressant d'étudier ce même phénomène en effectuant une expérience temps-dépendante afin de vérifier l'effet de la durée d'exposition à l'urée sur la fonction de la cellule bêta. Étant donné qu'il est difficile de maintenir une culture primaire d'îlots sur une longue période, nous n'avons pas testé ce phénomène sur les îlots. Par contre, nous avons vérifié ce phénomène *in vitro* en utilisant la lignée cellulaire de souris insulino-sécrétrice MIN6 (données non montrées). Nous avons traité ces cellules avec 20 mM d'urée à 6, 12, 24 et 48 h afin de vérifier l'effet du temps de traitement sur le niveau d'O-glycosylation des protéines. Le niveau d'O-glycosylation total augmentait en fonction de la durée du temps d'exposition à l'urée. À 24 h, l'effet était maximal et ce niveau se maintenait à 48 h. De manière intéressante, à 48 h, nous avons constaté de la mort cellulaire très prononcée. Nous n'avons cependant pas vérifié l'effet du temps de traitement sur la sécrétion d'insuline mais nous supposons qu'il soit également temps-dépendant.

Deuxièmement, la dichotomie entre nos résultats et ceux de la littérature peut être également expliquée par la différence entre les modèles d'IRC utilisés. Prenons par exemple les travaux de Sui et collègues (41). Ils ont utilisé un modèle de rat uninephrectomisé afin d'étudier la fonction de la cellule bêta au cours de l'IRC, et ils

ont observé 8 mois après l'opération une perte de masse de cellules bêta associée à l'activation de TGF- β 1. On constate plusieurs différences entre leur modèle d'IRC et le nôtre. Tout d'abord, l'espèce utilisée lors de l'étude est différente de celle que nous avons choisie (rat versus souris). Ensuite, ils ont effectué une uninephrectomie afin d'induire l'IRC alors que dans notre étude, nous avons opté pour la néphrectomie des 5/6^{ième}. Enfin, leur modèle d'IRC était de 8 mois, alors que le nôtre était de 3 semaines post-chirurgie. Ainsi, étant donné ces différences majeures entre notre modèle et le leur, il n'est pas étonnant que nous aboutissons à des résultats distincts.

Troisièmement, une nuance additionnelle à considérer est la différence entre le modèle *in vivo* et le modèle *ex vivo*. À côté de notre modèle de souris IRC, nous avons utilisé un modèle *ex vivo* afin de vérifier l'effet direct de l'urée sur la fonction de la cellule bêta-pancréatique. Cette approche nous a permis d'éliminer tous les effets confondants du contexte *in vivo* qui peut parfois rendre difficile l'interprétation de données. Ainsi, lorsque l'on confronte nos données *ex vivo* avec les données *in vivo* présentes dans la littérature, il faut prendre en considération que l'effet de l'environnement urémique (contexte *in vivo*) sur la fonction de la cellule bêta n'est pas équivalent à l'effet direct d'une toxine urémique en contexte *ex vivo*, ce qui peut expliquer les différences entre nos résultats expérimentaux et ceux déjà publiés.

Enfin, malgré la différence entre nos résultats et ceux obtenus par d'autres auteurs, il est important de souligner les similitudes avec certaines études. En effet, plusieurs de nos données concordent avec celles qu'a rapportées Massry dans son étude sur les rats IRC (néphrectomie des 5/6^{ième}) (39). Similaire à l'étude de Massry,

nous observons une baisse de l'activité mitochondriale, de la production d'ATP ainsi que de l'activité enzymatique de PFK1. En plus de ces données, nous avons vérifié l'utilisation du glucose ainsi que la capacité d'exocytose de la cellule bêta qui étaient toutes deux perturbées en réponse au glucose. Ainsi, notre étude apporte des pistes supplémentaires à la compréhension des mécanismes sous-jacents à la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'urémie. La dérégulation du métabolisme du glucose semble être centrale à ce mécanisme.

L'urée est une toxine urémique nocive

Cette étude a démontré pour la première fois que l'urée a un effet néfaste sur la fonction de la cellule bêta-pancréatique. Avec les données récentes de la littérature qui ont montré la toxicité de l'urée au sein de différents tissus (12, 86, 87, 95), on constate donc que l'urée est une toxine nuisible et participe aux troubles associés à l'IRC. Comment peut-on alors expliquer les résultats de l'étude HEMO concernant l'absence d'amélioration des symptômes urémiques suite au retrait de l'urée par dialyse chez les patients IRC? L'environnement urémique est constitué de plusieurs autres toxines urémiques dont la toxicité de plusieurs d'entre elles est nettement supérieure à celle de l'urée (14). Il est donc difficile de faire la part des choses dans un tel contexte, à savoir quel est l'apport de l'urée au syndrome urémique présent chez les patients IRC. C'est peut-être pour cette raison que l'effet néfaste de l'urée n'a jamais pu être démontré chez l'homme. L'utilisation de modèles expérimentaux a toutefois permis d'apprécier l'existence du potentiel nocif de l'urée sur différents

tissus. Cependant, les résultats provenant de ces modèles sont rarement extrapolables chez l'homme, car on y retrouve souvent des discordances entre les données cliniques et expérimentales. Ce phénomène de discordance de données se retrouve également entre les données *in vivo* et *ex vivo*. De manière intéressante, nos données chez les souris IRC étaient reproductibles à travers notre modèle *ex vivo* d'exposition à l'urée. Nous ne pouvons cependant pas spéculer que les effets observés chez les souris IRC sont exclusivement attribuables à l'urée car le modèle de souris IRC inclut bien évidemment l'ensemble des effets de l'environnement urémique. Toutefois, basé sur nos données *ex vivo*, nous pouvons dire que l'urée est l'une des toxines parmi plusieurs autres à participer à la dysfonction de la cellule bêta au cours de l'IRC.

Par ailleurs, il est concevable que le potentiel toxique de l'urée provienne de sa capacité à engendrer des modifications post-traductionnelles qui auront pour conséquence de perturber divers processus biologiques. En effet, ici nous démontrons que les modifications post-traductionnelles d'O-glycosylation causées par l'urée sont associées à une réduction du métabolisme du glucose menant à une baisse de sécrétion d'insuline. Il a par ailleurs été démontré que l'O-glycosylation de protéines causée par l'urée est associée à la résistance à l'insuline ainsi qu'à la dysfonction endothéliale (12, 95). De plus, il est connu que la décomposition de l'urée en cyanate aboutit à la carbamylation des protéines, soit une autre modification post-traductionnelle qui a des effets délétères sur le fonctionnement de plusieurs types cellulaires. Ainsi, la somme de ces études montre que la toxicité de l'urée est

non négligeable, et que les effets néfastes se retrouvent probablement au niveau des modifications post-traductionnelles provoquées par l'urée.

Nous avons également démontré l'effet toxique de l'urée via sa capacité à induire un stress oxydant dans l'îlot. Cependant, une question demeure : sachant que dans notre modèle l'activité mitochondriale est réduite (baisse de l'oxydation du glucose), d'où proviennent les ROS? Une hypothèse possible serait que la source de ROS dérive des enzymes NADPH oxydases. En effet, l'équipe de Giardino (95) a observé une augmentation de l'activité des NADPH oxydases dans les cellules endothéliales exposées à l'urée. Ces enzymes sont connues pour être une source majeure de ROS (116), et dans certains modèles d'urémie, il a été démontré que ces enzymes peuvent être surexprimées (117). Par ailleurs, une seconde hypothèse qui pourrait expliquer cette augmentation de ROS dans notre modèle concerne l'inhibition de l'activité antioxydante du sulfate d'hydrogène par l'urée. Il a été démontré que dans la cellule bêta-pancréatique, le sulfate d'hydrogène protège la cellule des dommages causés par l'hyperglycémie dont le stress oxydant (118). Et sachant que l'urée par sa dégradation en cyanate peut induire des carbamylations au niveau du sulfate d'hydrogène modifiant par conséquence son activité (93), il serait intéressant de vérifier si dans notre modèle, l'urée perturbe l'activité du sulfate d'hydrogène.

Forces et faiblesses

Tout d'abord, l'une des forces de cette étude est la variété des modèles utilisées. En effet, nous avons été en mesure de démontrer la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique à l'aide de 3 modèles : le modèle de souris IRC induit par néphrectomie des 5/6^{ième}, le modèle de souris urémiques suite à l'administration chronique d'urée pendant 3 semaines, et le modèle *ex vivo* du traitement d'urée de 24 h sur des îlots isolés de souris normales. Nous avons démontré dans ces 3 modèles la présence d'un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose associé à une augmentation du niveau d'O-glycosylation de protéines totales. Par ailleurs, une autre des forces de ce projet est l'utilisation du modèle *ex vivo*. Ce modèle nous a permis de tester l'effet direct de l'urée sur la fonction de la cellule bêta-pancréatique et d'identifier le mécanisme associé. De plus, nous avons effectué une variété d'expériences afin d'investiguer en profondeur le défaut de sécrétion. Chacune des étapes clés du mécanisme de sécrétion d'insuline a été vérifiée (allant de l'utilisation du glucose à l'exocytose). Nous avons également démontré par différentes méthodes la présence d'un même phénotype. Par exemple, le stress oxydant a été vérifié à la fois via la mesure des ROS et via le marquage par immunohistochimie d'un marqueur de stress oxydant.

Toutefois, ce projet contient certains points faibles. L'une des faiblesses de ce projet est dans le mécanisme proposé. D'une part, la source du stress oxydant induit par l'urée demeure inconnue. Étant donné que le mécanisme proposé indique que l'effet de l'urée passe par le stress oxydant, il aurait été intéressant d'investiguer davantage sur l'induction de ce stress (comment est-il provoqué, d'où vient-il?).

D'autre part, l'O-glycosylation directe de PFK1 n'a pas été démontré (en Western blot par exemple). Enfin, un autre point faible à noter est l'utilisation d'agents pharmacologiques. Les inhibiteurs pharmacologiques sont connus pour avoir certains effets non spécifiques. Dans cette étude, DON, inhibiteur de GFAT, a été utilisé à maintes reprises. Une approche génique telle l'utilisation d'un ARN interférant pour inhiber l'expression de GFAT aurait servi d'approche alternative plus spécifique.

Conclusion et perspectives

Ce projet a permis de déterminer l'implication de l'urée dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC. Nous avons identifié un mécanisme selon lequel le stress oxydant associé à l'augmentation du niveau d'O-glycosylation mène à la réduction de l'activité enzymatique de PFK1 et aboutit à une baisse de la glycolyse, de l'oxydation du glucose, de la production d'ATP, de l'exocytose; résultant ainsi à un défaut de sécrétion d'insuline. L'identification du stress oxydant et des O-glycosylations comme médiateurs de l'effet toxique de l'urée serviront de pistes afin de poursuivre les prochaines étapes du projet. En effet, afin de confirmer le rôle du stress oxydant, il serait intéressant d'utiliser des souris IRC qui surexpriment une enzyme antioxydante telle la glutathion peroxydase spécifiquement dans la cellule bêta afin de vérifier s'il est possible de restaurer le phénotype. Avec ces souris, nous pourrions également vérifier l'étendue du rôle du stress oxydant dans la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique au cours de l'IRC. En parallèle, il sera important de démontrer directement l'O-glycosylation de PFK1 dans notre

modèle *in vivo* et *ex vivo*. Yi et collègues (111) ont utilisé une stratégie de purification de protéines O-glycosylés pour l'identification de PFK1. En utilisant cette méthode, nous pourrions d'une part, confirmer l'O-glycosylation de PFK1 et d'autre part, identifier d'autres protéines candidates dont la modification d'O-glycosylation causée par l'urée perturberait le mécanisme de sécrétion d'insuline.

La dérégulation de l'homéostasie glucidique participe à la forte mortalité et morbidité cardiovasculaire retrouvée au cours de l'IRC. Notre projet s'est penché sur un seul phénomène, soit le défaut de sécrétion d'insuline qui contribue à cette dérégulation glucidique. Cependant, cibler uniquement la correction de la sécrétion d'insuline ne sera sûrement pas suffisant pour diminuer la morbi-mortalité cardiovasculaire. D'autres efforts seront nécessaires (telle l'étude de d'autres toxines urémiques) afin de contrer la perturbation de l'homéostasie glucidique retrouvée en IRC. Néanmoins, cette étude aura apporté une contribution appréciable quant à la compréhension du mécanisme de la dysfonction de la cellule bêta-pancréatique observée au cours de l'IRC.

Références

1. Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Kottgen A, Levey AS, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158-69.
2. Moody WE, Chue CD, Inston NG, Edwards NC, Steeds RP, Ferro CJ, et al. Understanding the effects of chronic kidney disease on cardiovascular risk: are there lessons to be learnt from healthy kidney donors? *J Hum Hypertens*. 2012;26(3):141-8.
3. Alani H, Tamimi A, Tamimi N. Cardiovascular co-morbidity in chronic kidney disease: Current knowledge and future research needs. *World J Nephrol*. 2014;3(4):156-68.
4. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
5. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012;379(9811):165-80.
6. Ortiz A, Covic A, Fliser D, Fouque D, Goldsmith D, Kanbay M, et al. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet*. 2014;383(9931):1831-43.
7. Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C. [Renal physiology]. *Bull Cancer*. 2012;99(3):237-49.
8. Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2005(94):S14-8.
9. Neiryneck N, Vanholder R, Schepers E, Eloit S, Pletinck A, Glorieux G. An update on uremic toxins. *Int Urol Nephrol*. 2013;45(1):139-50.
10. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(7):1258-70.
11. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2006;48(5):752-60.
12. D'Apolito M, Du X, Zong H, Catucci A, Maiuri L, Trivisano T, et al. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest*. 2010;120(1):203-13.
13. den Hoedt CH, Mazairac AH, van den Dorpel MA, Grooteman MP, Blankestijn PJ. Effect of hemodiafiltration on mortality, inflammation and quality of life. *Contrib Nephrol*. 2011;168:39-52.
14. Boure T, Vanholder R. Biochemical and clinical evidence for uremic toxicity. *Artif Organs*. 2004;28(3):248-53.
15. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, et al. p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(1):88-99.
16. Goldberg IJ, Kaufman AM, Lavarias VA, Vanni-Reyes T, Levin NW. High flux dialysis membranes improve plasma lipoprotein profiles in patients with end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 2:104-7.
17. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.
18. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet*. 2000;356(9224):147-52.
19. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116(1):85-97.
20. Koppe L, Pelletier CC, Alix PM, Kalbacher E, Fouque D, Soulage CO, et al. Insulin resistance in chronic kidney disease: new lessons from experimental models. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(9):1666-74.
21. Eldin WS, Ragheb A, Klassen J, Shoker A. Evidence for increased risk of prediabetes in the uremic patient. *Nephron Clin Pract*. 2008;108(1):c47-55.

22. Razeghi E, Heydarian P, Heydari M. The frequency of prediabetes and contributing factors in patients with chronic kidney disease. *Rev Diabet Stud.* 2011;8(2):276-81.
23. Lorenzo C, Nath SD, Hanley AJ, Abboud HE, Gelfond JA, Haffner SM. Risk of type 2 diabetes among individuals with high and low glomerular filtration rates. *Diabetologia.* 2009;52(7):1290-7.
24. Mak RH. Insulin and its role in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(3):355-62.
25. Trivin C, Metzger M, Haymann JP, Boffa JJ, Flamant M, Vrtovsnik F, et al. Glycated Hemoglobin Level and Mortality in a Nondiabetic Population with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(6):957-64.
26. Menon V, Greene T, Pereira AA, Wang X, Beck GJ, Kusek JW, et al. Glycosylated hemoglobin and mortality in patients with nondiabetic chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3411-7.
27. Rigalleau V, Gin H. Carbohydrate metabolism in uraemia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8(4):463-9.
28. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet.* 2011;378(9786):169-81.
29. Mak RH. Effect of metabolic acidosis on insulin action and secretion in uremia. *Kidney Int.* 1998;54(2):603-7.
30. DeFronzo RA, Tobin JD, Rowe JW, Andres R. Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to glucose and tissue sensitivity to insulin. *J Clin Invest.* 1978;62(2):425-35.
31. DeFronzo RA. Pathogenesis of glucose intolerance in uremia. *Metabolism.* 1978;27(12 Suppl 2):1866-80.
32. DeFronzo RA, Alvestrand A, Smith D, Hendler R, Hendler E, Wahren J. Insulin resistance in uremia. *J Clin Invest.* 1981;67(2):563-8.
33. Pham H, Robinson-Cohen C, Biggs ML, Ix JH, Mukamal KJ, Fried LF, et al. Chronic kidney disease, insulin resistance, and incident diabetes in older adults. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(4):588-94.
34. Fliser D, Pacini G, Engelleiter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int.* 1998;53(5):1343-7.
35. Dzurik R, Spustova V, Lajdova I. Inhibition of glucose utilization in isolated rat soleus muscle by pseudouridine: implications for renal failure. *Nephron.* 1993;65(1):108-10.
36. Schmitz O. Effects of physiologic and supraphysiologic hyperglycemia on early and late-phase insulin secretion in chronically dialyzed uremic patients. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989;121(2):251-8.
37. Allegra V, Mengozzi G, Martimbianco L, Vasile A. Glucose-induced insulin secretion in uremia: effects of aminophylline infusion and glucose loads. *Kidney Int.* 1990;38(6):1146-50.
38. de Boer IH, Zelnick L, Afkarian M, Ayers E, Curtin L, Himmelfarb J, et al. Impaired Glucose and Insulin Homeostasis in Moderate-Severe CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2016.
39. Fadda GZ, Hajjar SM, Perna AF, Zhou XJ, Lipson LG, Massry SG. On the mechanism of impaired insulin secretion in chronic renal failure. *J Clin Invest.* 1991;87(1):255-61.
40. Nakamura Y, Yoshida T, Kajiyama S, Kitagawa Y, Kanatsuna T, Kondo M. Insulin release from column-perfused isolated islets of uremic rats. *Nephron.* 1985;40(4):467-9.
41. Sui Y, Zhao HL, Ma RC, Ho CS, Kong AP, Lai FM, et al. Pancreatic islet beta-cell deficit and glucose intolerance in rats with uninephrectomy. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(23):3119-28.
42. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JJ, Nathan D, Peterson CM, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(7):1761-73.

43. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
44. Newsholme P, Cruzat V, Arfuso F, Keane K. Nutrient regulation of insulin secretion and action. *J Endocrinol*. 2014;221(3):R105-20.
45. Rojas JM, Schwartz MW. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes Obes Metab*. 2014;16 Suppl 1:33-40.
46. Schwartz MW, Seeley RJ, Tschop MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, et al. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature*. 2013;503(7474):59-66.
47. Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:233-51.
48. Scharfmann R, Xiao X, Heimberg H, Mallet J, Ravassard P. Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PLoS One*. 2008;3(10):e3559.
49. Prentki M, Matschinsky FM, Madiraju SR. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab*. 2013;18(2):162-85.
50. Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J Diabetes Investig*. 2013;4(6):511-6.
51. Mancini AD, Poitout V. The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(8):398-407.
52. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(8):285-91.
53. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
54. Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol*. 2001;11(11):437-41.
55. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in beta-cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(2):R33-54.
56. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
57. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008;29(3):351-66.
58. Kaneto H, Matsuoka TA. Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature beta-cell function. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6281-97.
59. Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A, et al. Probuocol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002;57(1):1-10.
60. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*. 1999;48(12):2398-406.
61. Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and beta-cell function: a critical role for amino acids. *J Endocrinol*. 2012;214(1):11-20.
62. Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, et al. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18572-9.
63. Issad T, Kuo M. O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(10):380-9.
64. Lima VV, Spitler K, Choi H, Webb RC, Tostes RC. O-GlcNAcylation and oxidation of proteins: is signalling in the cardiovascular system becoming sweeter? *Clin Sci (Lond)*. 2012;123(8):473-86.

65. Issad T. [O-GlcNAc glycosylation and regulation of cell signaling]. *Med Sci (Paris)*. 2010;26(8-9):753-9.
66. Andrali SS, Qian Q, Ozcan S. Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15589-96.
67. Akimoto Y, Kreppel LK, Hirano H, Hart GW. Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas. *Diabetes*. 1999;48(12):2407-13.
68. Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics*. 2013;10(4):365-80.
69. Konrad RJ, Kudlow JE. The role of O-linked protein glycosylation in beta-cell dysfunction. *Int J Mol Med*. 2002;10(5):535-9.
70. Zachara NE, Hart GW. O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1673(1-2):13-28.
71. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12222-6.
72. Chen G, Liu P, Thurmond DC, Elmendorf JS. Glucosamine-induced insulin resistance is coupled to O-linked glycosylation of Munc18c. *FEBS Lett*. 2003;534(1-3):54-60.
73. Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, et al. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology*. 2007;17(2):127-40.
74. Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(6):2820-5.
75. Kang ES, Han D, Park J, Kwak TK, Oh MA, Lee SA, et al. O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Exp Cell Res*. 2008;314(11-12):2238-48.
76. Cooksey RC, Pusuluri S, Hazel M, McClain DA. Hexosamines regulate sensitivity of glucose-stimulated insulin secretion in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(2):E334-40.
77. Prentice KJ, Luu L, Allister EM, Liu Y, Jun LS, Sloop KW, et al. The furan fatty acid metabolite CMPF is elevated in diabetes and induces beta cell dysfunction. *Cell Metab*. 2014;19(4):653-66.
78. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int*. 2003;63(5):1934-43.
79. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*. 2003;139(2):137-47.
80. Klein JD, Blount MA, Sands JM. Molecular mechanisms of urea transport in health and disease. *Pflugers Arch*. 2012;464(6):561-72.
81. Smith CP, Rousset G. Facilitative urea transporters. *J Membr Biol*. 2001;183(1):1-14.
82. Sands JM, Layton HE. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol*. 2009;29(3):178-95.
83. Johnson WJ, Hagge WW, Wagoner RD, Dinapoli RP, Rosevear JW. Effects of urea loading in patients with far-advanced renal failure. *Mayo Clin Proc*. 1972;47(1):21-9.
84. Eknoyan G, Beck GJ, Cheung AK, Daugirdas JT, Greene T, Kusek JW, et al. Effect of dialysis dose and membrane flux in maintenance hemodialysis. *N Engl J Med*. 2002;347(25):2010-9.

85. Maduell F, Moreso F, Pons M, Ramos R, Mora-Macia J, Carreras J, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):487-97.
86. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2013;37(1):1-6.
87. Trecherel E, Godin C, Louandre C, Benchitrit J, Poirot S, Maziere JC, et al. Upregulation of BAD, a pro-apoptotic protein of the BCL2 family, in vascular smooth muscle cells exposed to uremic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):479-83.
88. El-Gamal D, Rao SP, Holzer M, Hallstrom S, Haybaeck J, Gauster M, et al. The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 2014;86(5):923-31.
89. Hawkins CL. Role of cyanate in the induction of vascular dysfunction during uremia: more than protein carbamylation? *Kidney Int.* 2014;86(5):875-7.
90. Zhang Z, Yang XY, Cohen DM. Urea-associated oxidative stress and Gadd153/CHOP induction. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 2):F786-93.
91. Sokolowska M, Niedzielska E, Iciek M, Bilaska A, Lorenc-Koci E, Wlodek L. The effect of the uremic toxin cyanate (CNO(-)) on anaerobic cysteine metabolism and oxidative processes in the rat liver: a protective effect of lipoate. *Toxicol Mech Methods.* 2011;21(6):473-8.
92. Zhang Z, Dmitrieva NI, Park JH, Levine RL, Burg MB. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25):9491-6.
93. Prashberger M, Hermann M, Laggner C, Jirovetz L, Exner M, Kapiotis S, et al. Carbamylation abrogates the antioxidant potential of hydrogen sulfide. *Biochimie.* 2013;95(11):2069-75.
94. Schreier SM, Steinkellner H, Jirovetz L, Hermann M, Exner M, Gmeiner BM, et al. S-carbamylation impairs the oxidant scavenging activity of cysteine: its possible impact on increased LDL modification in uraemia. *Biochimie.* 2011;93(4):772-7.
95. D'Apolito M, Du X, Pisanelli D, Pettoello-Mantovani M, Campanozzi A, Giacco F, et al. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. *Atherosclerosis.* 2015;239(2):393-400.
96. Fergusson G, Ethier M, Guevremont M, Chretien C, Attane C, Joly E, et al. Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab.* 2014;3(9):848-54.
97. Roucher-Boulez F, Mallet-Motak D, Samara-Boustani D, Jilani H, Asmahane L, Souchon PF, et al. NNT mutations: a cause of primary adrenal insufficiency, oxidative stress and extra-adrenal defects. *Eur J Endocrinol.* 2016.
98. Ronchi JA, Figueira TR, Ravagnani FG, Oliveira HC, Vercesi AE, Castilho RF. A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6J mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:446-56.
99. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989;6(6):593-7.
100. Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(5-6):599-617.
101. Mattaini KR, Vander Heiden MG. Cancer. Glycosylation to adapt to stress. *Science.* 2012;337(6097):925-6.
102. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30133-42.

103. Pasternak CA, Aiyathurai JE, Makinde V, Davies A, Baldwin SA, Konieczko EM, et al. Regulation of glucose uptake by stressed cells. *J Cell Physiol.* 1991;149(2):324-31.
104. Widnell CC, Baldwin SA, Davies A, Martin S, Pasternak CA. Cellular stress induces a redistribution of the glucose transporter. *FASEB J.* 1990;4(6):1634-7.
105. Barnes K, Ingram JC, Porras OH, Barros LF, Hudson ER, Fryer LG, et al. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 11):2433-42.
106. Barros LF, Barnes K, Ingram JC, Castro J, Porras OH, Baldwin SA. Hyperosmotic shock induces both activation and translocation of glucose transporters in mammalian cells. *Pflugers Arch.* 2001;442(4):614-21.
107. Sviderskaya EV, Jazrawi E, Baldwin SA, Widnell CC, Pasternak CA. Cellular stress causes accumulation of the glucose transporter at the surface of cells independently of their insulin sensitivity. *J Membr Biol.* 1996;149(2):133-40.
108. Alejandro EU, Bozadjieva N, Kumusoglu D, Abdulhamid S, Levine H, Haataja L, et al. Disruption of O-linked N-Acetylglucosamine Signaling Induces ER Stress and beta Cell Failure. *Cell Rep.* 2015;13(11):2527-38.
109. Durning SP, Flanagan-Steet H, Prasad N, Wells L. O-Linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Acts as a Glucose Sensor to Epigenetically Regulate the Insulin Gene in Pancreatic Beta Cells. *J Biol Chem.* 2016;291(5):2107-18.
110. Ruan HB, Singh JP, Li MD, Wu J, Yang X. Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2013;24(6):301-9.
111. Yi W, Clark PM, Mason DE, Keenan MC, Hill C, Goddard WA, 3rd, et al. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science.* 2012;337(6097):975-80.
112. Mor I, Cheung EC, Vousden KH. Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:211-6.
113. Jenkins CM, Yang J, Sims HF, Gross RW. Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acyl-CoA: a mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2011;286(14):11937-50.
114. Ma Z, Ramanadham S, Kempe K, Hu Z, Ladenson J, Turk J. Characterization of expression of phosphofructokinase isoforms in isolated rat pancreatic islets and purified beta cells and cloning and expression of the rat phosphofructokinase-A isoform. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1308(2):151-63.
115. Tsuura Y, Ishida H, Shinomura T, Nishimura M, Seino Y. Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252(1):34-8.
116. Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause KH. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem Soc Trans.* 2008;36(Pt 5):920-9.
117. Zanetti M, Barazzoni R, Bosutti A, Stocca A, Grassi G, Guarnieri G. Vascular sources of oxidative stress: implications for uremia-related cardiovascular disease. *J Ren Nutr.* 2007;17(1):53-6.
118. Kaneko Y, Kimura T, Taniguchi S, Souma M, Kojima Y, Kimura Y, et al. Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose. *FEBS Lett.* 2009;583(2):377-82.

