

Université de Montréal

**Rôles du stress du réticulum endoplasmique et de  
l'immunité innée dans l'inhibition de la transcription du  
gène de l'insuline**

Étude du facteur de transcription ATF6 et du récepteur TLR4

par

Julie Amyot

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

Décembre 2011

© Julie Amyot, 2011



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôles du stress du réticulum endoplasmique et de l'immunité innée dans l'inhibition de la  
transcription du gène de l'insuline  
Étude du facteur de transcription ATF6 et du récepteur TLR4

Présentée par :

Julie Amyot

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Nathalie Grandvaux, présidente-rapporteuse

.....

Dr Vincent Poitout, directeur de recherche

.....

Dr Marc Servant, membre du jury

.....

Dr André Carpentier, examinateur externe

.....

Dr Réjean Couture, représentant du doyen de la FES

.....



## Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est caractérisé par une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline et par une insuffisance de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. Différents facteurs tels que le stress du réticulum endoplasmique (RE) et l'immunité innée affectent la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Toutefois, leur implication dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline demeure imprécise. Le but de cette thèse était d'identifier et de caractériser le rôle du stress du RE et de l'immunité innée dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline.

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques ont un RE très développé, conséquence de leur fonction spécialisée de biosynthèse et de sécrétion d'insuline. Cette particularité les rend très susceptible au stress du RE qui se met en place lors de l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Nous avons montré qu'ATF6 (de l'anglais, *activating transcription factor 6*), un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress du RE, lie directement la boîte A5 de la région promotrice du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans isolés de rat. Nous avons également montré que la surexpression de la forme active d'ATF6 $\alpha$ , mais pas ATF6 $\beta$ , réprime l'activité du promoteur de l'insuline. Toutefois, la mutation ou l'absence de la boîte A5 ne préviennent pas l'inhibition de l'activité promotrice du gène de l'insuline par ATF6. Ces résultats montrent qu'ATF6 se lie directement au promoteur du gène de l'insuline, mais que cette liaison ne semble pas contribuer à son activité répressive.

Il a été suggéré que le microbiome intestinal joue un rôle dans le développement du DT2. Les patients diabétiques présentent des concentrations plasmatiques élevées de lipopolysaccharides (LPS) qui affectent la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Nous avons montré que l'exposition aux LPS entraîne une réduction de la transcription du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans de rats, de souris et humains. Cette répression du gène de l'insuline par les LPS est associée à une diminution des niveaux d'ARNms de gènes clés de la cellule  $\beta$ -pancréatique, soit PDX-1 (de l'anglais, *pancreatic duodenal homeobox 1*) et MafA (de l'anglais, *mammalian homologue of avian MafA/L-Maf*). En utilisant un modèle de souris déficientes pour le récepteur TLR4 (de l'anglais, *Toll-like*

*receptor*), nous avons montré que les effets délétères des LPS sur l'expression du gène de l'insuline sollicitent le récepteur de TLR4. Nous avons également montré que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B entraîne une restauration des niveaux messagers de l'insuline en réponse à une exposition aux LPS dans les îlots de Langerhans de rat. Ainsi, nos résultats montrent que les LPS inhibent le gène de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques *via* un mécanisme moléculaire dépendant du récepteur TLR4 et de la voie NF- $\kappa$ B. Ces observations suggèrent ainsi un rôle pour le microbiome intestinal dans la fonction de la cellule  $\beta$  du pancréas.

Collectivement, ces résultats nous permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la répression du gène de l'insuline en réponse aux divers changements survenant de façon précoce dans l'évolution du diabète de type 2 et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles qui permettraient de prévenir ou ralentir la détérioration de l'homéostasie glycémique au cours de cette maladie, qui affecte plus de deux millions de Canadiens.

**Mots-clés** : Diabète, îlots de Langerhans, cellule  $\beta$ -pancréatique, gène de l'insuline, régulation transcriptionnelle, stress du réticulum endoplasmique, facteur de transcription ATF6, immunité innée, récepteur TLR4, lipopolysaccharides.

## Abstract

Type 2 diabetes is characterized by insulin resistance and impaired insulin secretion from the pancreatic  $\beta$ -cell. Endoplasmic reticulum (ER) stress and innate immunity have both been reported to alter pancreatic  $\beta$ -cell function. However, it is not clear whether these factors can affect the transcription of the insulin gene. The aim of this thesis was to assess the role of ER stress and innate immunity in the regulation of the insulin gene.

Pancreatic  $\beta$ -cells have a well-developed endoplasmic reticulum (ER) due to their highly specialized secretory function to produce insulin in response to glucose and nutrients. In a first study, using several approaches we showed that ATF6 (activating transcription factor 6), a protein implicated in the ER stress response, directly binds to the A5/Core of the insulin gene promoter in isolated rat islets. We also showed that overexpression of the active (cleaved) fragment of ATF6 $\alpha$ , but not ATF6 $\beta$ , inhibits the activity of an insulin promoter-reporter construct. However, the inhibitory effect of ATF6 $\alpha$  was insensitive to mutational inactivation or deletion of the A5/Core. Therefore, although ATF6 binds directly to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter, this direct binding does not appear to contribute to its repressive activity.

In recent years, the gut microbiota was proposed has an environmental factor increasing the risk of type 2 diabetes. Subjects with diabetes have higher circulating levels of lipopolysaccharides (LPS) than non-diabetic patients. Recent observations suggest that the signalling cascade activated by LPS binding to Toll-Like Receptor 4 (TLR4) exerts deleterious effects on pancreatic  $\beta$ -cell function; however, the molecular mechanisms of these effects are incompletely understood. We showed that exposure of isolated human, rat and mouse islets of Langerhans to LPS dose-dependently reduced insulin gene expression. This was associated in mouse and rat islets with decreased mRNA expression of two key transcription factors of the insulin gene, PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox 1) and MafA (mammalian homologue of avian MafA/L-Maf). LPS repression of insulin, PDX-1 and MafA expression was not observed in islets from TLR4-deficient mice and was completely prevented in rat islets by inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling pathway. These

results demonstrate that LPS inhibits  $\beta$ -cell gene expression in a TLR4-dependent manner and via NF- $\kappa$ B signaling in pancreatic islets, suggesting a novel mechanism by which the gut microbiota might affect pancreatic  $\beta$ -cell function.

Our findings provide a better understanding of the molecular mechanisms underlying insulin gene repression in type 2 diabetes, and suggest potential therapeutic targets that might prevent or delay the decline of  $\beta$ -cell function in the course of type 2 diabetes, which affects more than two million Canadians.

**Keywords** : Diabetes, islets of Langerhans, pancreatic  $\beta$ -cell, insulin gene, transcriptional regulation, endoplasmic reticulum stress, Activating transcription factor 6, innate immunity, TLR4, lipopolysaccharides.



## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abbréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xv</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 - Le diabète</b> .....	<b>2</b>
Historique : De l'Antiquité à l'ère moderne .....	2
Définition, prévalence et critères diagnostiques .....	5
Les différents types de diabète .....	6
Le diabète de type 1 .....	6
Le diabète de type 2 .....	7
Le diabète gestationnel.....	8
Les autres types de diabète.....	8
Les complications et la mortalité associées au diabète .....	10
L'étiologie du diabète de type 2.....	11
Les facteurs environnementaux.....	11
Les facteurs génétiques .....	11
Les facteurs épigénétiques .....	12
La pathophysiologie du diabète de type 2.....	13
La dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique .....	14
La résistance à l'insuline .....	17
<b>Chapitre 2 – Le pancréas endocrine</b> .....	<b>19</b>
La physiologie normale du pancréas endocrine .....	19
La morphologie du pancréas .....	19
L'îlot de Langerhans, l'unité fonctionnelle du pancréas endocrine .....	19

La régulation hormonale de la glycémie.....	22
L'insuline : de sa biosynthèse à sa sécrétion.....	26
La sécrétion d'insuline.....	29
<b>Chapitre 3 – Le gène de l'insuline .....</b>	<b>31</b>
La structure du gène de l'insuline.....	31
La régulation physiologique de l'expression du gène de l'insuline.....	32
La régulation positive.....	32
La régulation négative.....	37
Les défauts de régulation de l'expression du gène de l'insuline.....	38
La régulation du gène de l'insuline dans le diabète de type 2 chez l'Homme.....	40
<b>Chapitre 4 – Le stress du réticulum endoplasmique .....</b>	<b>43</b>
Généralités .....	43
Le stress du RE .....	44
La réponse UPR .....	44
L'activation de la kinase PERK.....	46
L'activation de la protéine IRE1 .....	46
L'activation du facteur de transcription ATF6 .....	46
L'apoptose induite par la réponse UPR .....	48
Le stress du RE et le diabète chez l'Homme .....	49
<b>Chapitre 5 – L'immunité innée.....</b>	<b>51</b>
Généralités .....	51
Les récepteurs de type Toll .....	52
Le récepteur de type Toll 4 .....	53
Le diabète, un état inflammatoire chronique de faible intensité.....	57
L'endotoxémie et le diabète de type 2 .....	60
<b>Chapitre 6 – Mise en contexte de la thèse .....</b>	<b>63</b>
Problématique .....	63
But de la thèse .....	63
Hypothèses de la thèse .....	64
Objectifs de la thèse .....	65
Publications.....	65

<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>67</b>
<b>Article 1</b> .....	<b>68</b>
Mise en contexte de l'article 1 .....	69
Binding of Activating Transcription Factor 6 to the A5/Core of the Rat Insulin II Gene Promoter does not Mediate its Transcriptional Repression .....	71
Discussion de l'article 1 .....	102
<b>Article 2</b> .....	<b>109</b>
Mise en contexte de l'article 2 .....	110
Lipopolysaccharides Impair Insulin Gene Expression in Isolated Islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- $\kappa$ B Signalling. ....	112
Discussion de l'article de l'article 2.....	141
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>150</b>
Le stress du RE et l'activation du système immunitaire inné entraînent une dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique : évidences.....	151
Serait-il possible de prévenir ou d'atténuer la dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique par l'inhibition du stress du RE et/ou par l'inactivation du récepteur TLR4? .....	160
Les LPS circulants représentent-ils un biomarqueur du développement précoce de la dysfonction de la cellule $\beta$ ?.....	167
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>170</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>172</b>
<b>Annexe I</b> .....	<b>i</b>
<b>Article 3</b> .....	<b>i</b>
Mise en contexte de l'article 3 .....	ii
Glucolipototoxicity of the Pancreatic Beta Cell.....	iii

## Liste des tableaux

Tableau I: Critères diagnostiques du diabète selon les lignes directrices de l'Association Canadienne du Diabète. ....	6
---	---

## Liste des figures

Figure 1: La découverte de l'insuline et le premier patient traité à l'insuline.....	4
Figure 2: La perte de fonction de la cellule $\beta$ -pancréatique dans le DT2. ....	14
Figure 3: L'histoire naturelle du DT2 et de la dysfonction de la cellule $\beta$ . ....	16
Figure 4: La pathophysiologie du DT2. ....	18
Figure 5: Le pancréas et l'îlot de Langerhans.....	21
Figure 6: Les voies de signalisation activées par l'insuline. ....	24
Figure 7: La régulation hormonale de la glycémie. ....	25
Figure 8: Biosynthèse et structure de l'insuline.....	28
Figure 9: Modèle classique de la sécrétion d'insuline. ....	30
Figure 10: Représentation schématique de la région proximale du promoteur de l'insuline II de rat.....	32
Figure 11: Les différents niveaux de régulation du gène de l'insuline par le glucose.....	36
Figure 12: La réponse UPR.....	45
Figure 13: Les différences fonctionnelles d'ATF6 $\alpha$ et d'ATF6 $\beta$ . ....	48
Figure 14: Motifs moléculaires associés aux pathogènes reconnus par les différents TLRs. .....	53
Figure 15: La structure des lipopolysaccharides.....	54
Figure 16: La signalisation intracellulaire induite par TLR4.....	55
Figure 17: L'endotoxémie et le DT2.....	62
Figure 18: Mécanisme potentiel de l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline par ATF6. ....	105
Figure 19: L'exposition aux LPS augmente les niveaux messagers de C/EBP $\beta$ <i>via</i> TLR4 dans les îlots isolés de souris.....	145
Figure 20: Mécanismes potentiels de l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline par les LPS. ....	146
Figure 21: Le stress du RE et la dysfonction de la cellule $\beta$ . ....	157
Figure 22: Modulation du stress du RE et de l'endotoxémie par les hormones GLP-1 et GLP-2.....	166

## Abbreviations

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Bêta
$\delta$	Delta
$\kappa$	kappa
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AGE	Advanced glycation end-product
AGJ	Anomalie de la glycémie à jeun
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsb	Acide ribonucléique simple brin
ASC	Apoptosis-associated specklike
ASK-1	Apoptosis signal regulating kinase 1
ATF	Activating Transcription Factor
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATP	Adénosine triphosphate
B2/E47	Beta 2/NeuroD/E47
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bHLH	Basic helix-loop-helix
BIP	Binding immunoglobulin protein
bZIP	Basic Leucine Zipper
Ca <sup>2+</sup>	Atomes de calcium
Canaux K <sub>ATP</sub>	Canaux potassiques dépendants de l'ATP
CAPN10	Calpain 10
CD14	Cluster of differentiation 14
C/EBP $\beta$	CCAAT-enhancer-binding proteins $\beta$
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CHOP	CEBP homologous protein
CPH	Carboxypeptidase H
CRE	cAMP response element
CREB	CRE binding protein
Cys	Cystéine
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DPP4	Dipeptidyl peptidase 4
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERAD	ER-associated degradation
FADD	FAS-associated death domain
FDA	Food and drug administration
GAD	glutamic acid decarboxylase auto-antibody

GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLP-2	Glucagon-like peptide 2
GLUT2	glucose transporter 2
GLUT4	glucose transporter 4
GRP-94	Glucose-regulated protein 94
GWAS	Genome-wide association studies
HDAC1	Histone déacétylase 1
HDAC2	Histone déacétylase 2
HGPO	Hyperglcémie provoquée orale
His	Histidine
HNF-1 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$
HNF-1 $\beta$	Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$
HNF-4 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$
HOMA	Homeostasis model assessment
HSP	Heat-shock protein
IAA	Insulin auto-antibody
ICA	Islet cell cytoplasmic antibody
iCER	Inducible cAMP early repressor
IFN $\beta$	Interféron $\beta$
IG	Intolérance au glucose
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor of $\kappa$ B $\alpha$
IKK	Inhibitor of $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase
IKK $\beta$	Inhibitor of $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase $\beta$
IL-1 $\beta$	Interleukine 1 $\beta$
IL-6	Interleukine 6
IL-10	Interleukine 10
INS(1,4,5)P <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IRAK1	IL-1R-associated kinase 1
IRAK4	IL-1R-associated kinase 4
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1
IRF3/7	Interferon-regulatory factor 3/7
IRS1/2	Insulin receptor substrate 1/2
JNK	Jun N-terminal kinase
K <sub>d</sub>	Constante d'affinité
kDa	Kilodalton
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysacharides
MafA	Mammalian homologue of avian MafA/L-Maf
MAL	MyD88-adaptator-like
MAPK	Mitogen-activated protein (MAP) kinase
MCP-1	Monocyte chimioattractant protein 1
MD2	Myeloid differentiation 2
MKK6	Mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 6
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MyD88	Myeloid-differentiation primary-response gene 88
NF-Y	Nuclear factor Y
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLR	NOD-like receptor
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PARP	Poly(ADP-ribose) (PAR) polymerase
pb	Paires de bases
PBA	4-phenylbutyrique acid
PC1/3	Proteine convertase 1/3
PC2	Proteine convertase 2
PDX-1	Pancreatic duodenal homeobox 1
PDI	Protein disulfide isomerase
PERK	PKR-like kinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3 kinase
PP	Polypeptide pancréatique
Pro	Proline
PRR	Pathogen-recognition receptor
PTB	Polypyrimidine-tract-binding
RAGE	Receptor for advanced glycation end-product
RE	Réticulum endoplasmique
REL	Réticulum endoplasmique lisse
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RLRs	Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)-like receptors
RIP1	Receptor-interacting protein 1)
ROS	Reactive oxygen species
S1P	Site-1-protease
S2P	Site-2-protease
SARM	Sterile $\alpha$ and armadillo-motif-containing protein
SERCA	Sarco(endo)plasmic reticulum $\text{Ca}^{2+}$ ATPase
SIIG	Sécrétion d'insuline induite par le glucose
SNP	Single-nucleotide polymorphism
S/O	Sans objet
TAB1/ 2	TAK-binding protein 1/2
TAK1	Transforming-growth-factor- $\beta$ -activated kinase 1
TBK1	Tumour-necrosis-factor-receptor (TNFR)-associated factor (TRAF)-family-member-associated NF- $\kappa$ B-activator-binding kinase 1
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2
TIR	Toll-IL-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TLR4	Toll-like receptor 4
ToI- $\beta$	Tet-on delta I $\kappa$ B in $\beta$ -cells
TRAF-2	TNF receptor-associated factor 2
TRAF-6	TNF receptor-associated factor 6
TRAM	TRIF-related adaptator molecule
TRIF	TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN $\beta$
TUDCA	Tauroursodeoxycholic acid)
Tyr	Tyrosine
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
UPR	Unfolded protein response



UTR	Untranslated region
XBP-1	X-box binding protein 1
XBP-1s	Spliced X-box binding protein 1 (forme épissée de XBP-1)
Zn <sup>2+</sup>	Atomes de zinc

*« C'est le devoir de chaque homme de rendre  
au monde au moins autant qu'il en a reçu. »*

- Albert Einstein

## Remerciements

On me dit que je suis déterminée depuis ma tendre enfance. Je dois cette qualité à mes parents. Papa, maman, je vous remercie sincèrement de m'avoir inculqué ces valeurs de détermination et de confiance en soi. Cette thèse est une finalité en-soi, le résultat des efforts déployés au cours des dernières années, efforts qui n'auraient pu exister sans les valeurs que vous m'avez transmises. Merci pour votre amour et votre soutien inconditionnels.

Jonathan. Ton fidèle dévouement et ton soutien envers tous les projets de vie entrepris ensemble représentent une énergie propulsante et inassouissable. Merci de rendre ma vie au quotidien si agréable.

Cher Benoit, cher petit frère. Merci d'avoir été là pour me soutenir à ta façon. Nous sommes mutuellement fiers de ce que nous avons accompli dans la vie et sache que ta détermination au cours des dernières années a été une source de motivation pour compléter mes études.

À mes amies, je vous remercie de votre inconditionnelle fidélité.

À tous les membres du labo : Merci, *Thank you, Chokrane, Amesseganalo, Graze mille.* Nous avons passé de bons moments ensemble. Et ce n'est qu'un début, puisque je suis certaine que nous nous reverrons, que ce soit en France, en Australie, en Algérie ou au Maroc. Meriem, Isma, Bader, Mourad, Melkam, Valérie, Arturo, Caroline, Sylvie, Grace, Mélanie et Ghislaine, je vous souhaite la meilleure des chances dans vos projets personnels et professionnels futurs. Special thanks also to Derek and Sophie.

Émilie, Julien, Claudiane et Annie : Merci pour tous ces « 5@7 » qui nous permettaient d'évacuer la pression et de relativiser les problèmes rencontrés dans nos projets! À quand notre prochaine soirée à la terre à bois?

Un merci tout particulier à Érik : Merci pour ton intelligence et tes précieux conseils d'homme sage. Ils me serviront toute la vie.

J'offre aussi mes sincères remerciements à Dr Raymond Lepage qui a toujours cru en moi et qui me guide et me soutien encore aujourd'hui dans mes choix professionnels.

Finalement et non le moindre, je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse. Vincent, ta rigueur, ta détermination, ton intelligence, ton perfectionnisme, ton dynamisme, ton professionnalisme et ton plaisir évident de voir évoluer tes étudiantes en thèse sont une source incroyable de motivation. Continue à pousser les gens hors de leur zone de confort, et ils continueront à progresser. Je tiens sincèrement à te remercier pour ta confiance, pour tous les conseils prodigués et pour toutes les merveilleuses opportunités qui m'ont été offertes au cours de mes études doctorales effectuées sous ta supervision. J'espère de tout cœur bien appliquer les leçons apprises avec toi au cours des dernières années. Et je te promets qu'un jour, rapproché j'espère, je réussirai à parler moins vite lors de mes présentations!

Merci, à toutes et à tous.

Julie

# **INTRODUCTION**

## Chapitre 1 - Le diabète

« Une grande découverte est un fait, qui, en apparaissant dans la science, a donné naissance à des idées lumineuses, dont la clarté a dissipé un grand nombre d'obscurités et montré des voies nouvelles. »

- Claude Bernard

Les premières descriptions du diabète remontent à l'Antiquité. Son histoire est ponctuée d'observations multiples des symptômes de la maladie qui ont entraîné l'identification d'un rôle pour le pancréas endocrine et les îlots de Langerhans, et qui ont ultimement mené à une découverte ayant changé la vie des patients diabétiques, soit la découverte de l'insuline.

### Historique : De l'Antiquité à l'ère moderne

Les premières observations des symptômes classiques du diabète, soit un volume urinaire important (polyurie), une faim excessive (polyphagie) et une soif intense (polydipsie) ont été décrites dans le Papyrus de Thèbes 1500 ans av. J.C. [1] ainsi que dans certains écrits médicaux retrouvés en Chine vers la même époque. La glucosurie, soit la présence de sucre dans les urines, fût également décrite avant notre ère. En Inde, vers le sixième siècle av. J.C., un médecin du nom de Sushruta avait décrit le diabète comme étant une polyurie dont le goût des urines était sucré ou « *madhumeha* » [2]. À cette même époque, il avait été également rapporté que les fourmis et les abeilles étaient attirées par l'urine de certains patients atteints de ce qu'on appelait à l'époque la « maladie des urines sucrées ». Ce n'est toutefois que vers le troisième ou le deuxième siècle av. J.C. que fût donné son nom à la maladie : diabète, du grec *διαβαίνω* signifiant « siphon ».

La première description clinique exhaustive du diabète a rigoureusement été décrite par Arétée (de Cappadoce), célèbre médecin de la Grèce Antique, dans son *Traité des signes, des causes et de la cure des maladies aiguës et chroniques*. Dans cet ouvrage, traduit en français par M.L. Renaud en 1834 [3], on peut y lire :

« [...] l'urine en effet ne reste point dans le corps, mais ne fait qu'y passer comme à travers un tube. Lorsque la maladie est parvenue à ce degré, les malades peuvent encore vivre, mais c'est pour peu de temps; [...] il ne passe qu'une très-petite partie de la boisson dans le reste du corps, et une grande partie des chairs se fond dans les urines. [...] D'où il me semble que cette maladie a reçu le nom de Diabète ou Siphon, à cause qu'il ne reste rien de liquide dans le corps de ceux qui en sont atteints, mais que tout en sort comme par un siphon.» [3]

Quoique le goût sucré de l'urine des patients diabétiques ait été rapporté dans l'Antiquité, ce n'est qu'au 17<sup>e</sup> siècle qu'on ajouta le vocable *mellitus*, du latin « miel », au terme diabète. Plusieurs années plus tard, en 1776, Matthew Dobson démontra que ce goût sucré des urines provenait d'un excès de sucre, et rapporta en plus une élévation de la glycémie par la saveur sucrée du sérum de patients diabétiques [4]. Puis, un physiologiste du nom de Claude Bernard montra que le diabète est une perturbation fonctionnelle et, suite à ses recherches sur le rôle de la glycogénolyse par le foie, a été le premier à reconnaître l'hyperglycémie comme étant une caractéristique des individus diabétiques [5].

En 1869, Paul Langerhans présenta sa thèse de doctorat dans laquelle il y décrit d'une façon soignée et détaillée que des « îlots de cellules claires » étaient dispersés dans le pancréas, sans toutefois mentionner la fonction de ces amas cellulaires. Vingt-quatre ans plus tard, les îlots pancréatiques furent nommés îlots de Langerhans par l'histologiste français Edouard Laguesse [6]. Néanmoins, ce n'est qu'en 1889 que fut identifié le rôle du pancréas dans le diabète. Cette découverte revient à Joseph von Mering et Oskar Minkowski qui ont démontré chez le chien que la pancréatectomie entraînait le développement d'un diabète.

Jusqu'au vingtième siècle, aucune médication ne permettait de traiter les patients diabétiques. Toutefois, une des grandes réussites médicales du siècle dernier fut sans contredit l'identification d'une hormone hypoglycémisante, l'insuline. Cette découverte valut en 1923 un prix Nobel de Physiologie ou de Médecine à deux chercheurs canadiens : Frederick Grant Banting et James. R. MacLeod. Dans leur laboratoire de Toronto, dirigé par MacLeod, Banting et son étudiant en médecine, Charles H. Best, ont montré qu'il était

possible de renverser un diabète en injectant à un chien diabétique des extraits d'îlots de Langerhans provenant d'un chien en santé [7]. Suite à cette observation, Banting et ses collègues ont isolé et purifié l'insuline à partir d'extraits de pancréas bovins. Ainsi, à l'âge de 14 ans, Leonard Thomson fut le premier d'une très longue série de patients traités et qui survivent grâce à l'insuline [7].



**Figure 1: La découverte de l'insuline et le premier patient traité à l'insuline.**

À gauche, Charles H. Best, Frederick G. Banting et Marjorie, la chienne diabétique utilisée lors de la découverte de l'insuline. Crédits: *UTA, MS. COLL. 241 (Best) Box 109, Folder 4*. À droite, Leonard Thomson, premier diabétique traité à l'insuline. Crédits : *UTA, MS. COLL. 76 (Banting), Box 12, Folder 1*.



## Définition, prévalence et critères diagnostiques

De nos jours, la description du diabète s'est précisée. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit le diabète comme étant « *une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit* ». (OMS, 2011).

La prévalence de cette maladie est désormais à la hausse partout dans le monde. En 1897, Sir William Osler considérait le diabète comme étant une maladie rare atteignant 0,01% des individus aux États-Unis et en Europe [8]. De nos jours, « *le diabète [serait] diagnostiqué chez deux personnes toutes les dix secondes quelque part dans le monde* » (Fédération internationale du diabète). Ainsi, il est mondialement estimé que le diabète affectera plus de 550 millions d'individus en 2030 [9]. À l'échelle nationale, plus de 2 millions de Canadiens (es) étaient diagnostiqués (es) diabétiques et les prévisions estiment que ce nombre atteindra plus de 3,5 millions d'ici 2030. (OMS, 2011).

Les critères diagnostiques du diabète sont établis en fonction des épreuves veineuses de glycémie à jeun, et 2 h après le test d'hyperglycémie provoquée orale (HGPO) qui est la mesure de la concentration sanguine du glucose 2 h post-ingestion de 75 g de glucose. Selon les lignes directrices de l'Association Canadienne du Diabète (Tableau I), la glycémie à jeun chez un individu sain, est inférieure à 6,1 mmol/L et la glycémie deux heures après l'ingestion d'une charge en glucose (HGPO) est inférieure à 7,8 mmol/L. À l'opposé, la concentration sanguine de glucose chez un individu diabétique à jeun sera égale ou supérieure à 7,0 mmol/L et la glycémie après le test HGPO sera supérieure à 11,1 mmol/L. Un individu présente par ailleurs une anomalie de la glycémie à jeûn si cette dernière se situe entre 6,1 et 6,9 mmol/L, avec un résultat de test HGPO inférieur à 7,8 mmol/L. À l'opposé, une intolérance au glucose est observée dans les cas où la glycémie à jeun est normale (< 6,1 mmol/L), mais que la glycémie 2 h post-ingestion de 75 g de glucose s'établit entre 7,8 et 11,0 mmol/L.

**Tableau I: Critères diagnostiques du diabète selon les lignes directrices de l'Association Canadienne du Diabète.**

	<b>Glycémie à jeun (mmol/L)</b>		<b>2 h post-ingestion de 75 g de glucose (mmol/L)</b>
<b>AGJ</b>	6,1 à 6,9		S/O
<b>AGJ (isolée)</b>	6,1 à 6,9	et	< 7,8
<b>IG (isolée)</b>	< 6,1	et	7,8 à 11,0
<b>AGJ et IG</b>	6,1 à 6,9	et	7,8 à 11,0
<b>Diabète</b>	≥ 7,0	ou	≥ 11,1

AGJ : Anomalie de la glycémie à jeun; IG : Intolérance au glucose; S/O : Sans objet.

## Les différents types de diabète

Le diabète est caractérisé par un défaut de sécrétion d'insuline accompagné ou non d'un défaut de l'action de l'insuline.

### Le diabète de type 1

Également nommé diabète insulino-dépendant, le diabète de type 1 (DT1) affecte 5 à 10 % des individus diabétiques [10] et est principalement caractérisé par une destruction des cellules productrices d'insuline, les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Près de 75 % des diabétiques de ce type vont développer la maladie avant même d'atteindre l'âge de 30 ans. La présentation clinique du DT1 se distingue par la présence soudaine d'une pléiade de symptômes (polydipsie, polyurie et perte rapide de poids corporel). Les patients diabétiques de type 1 vont également présenter une insulino-pénie absolue, due à la destruction des cellules  $\beta$ -pancréatiques.

L'étiologie du DT1 est encore partiellement identifiée. Toutefois, cette forme de diabète comprend les cas attribuables à un processus à médiation immunitaire et les cas de cause inconnue ou idiopathique. De nombreuses études ont rapporté un rôle imputable à plusieurs facteurs de risque, incluant une prédisposition génétique, une infection virale et la situation géographique du patient, pour ne nommer que ceux-ci [11-14]. Toutefois, la cause la mieux caractérisée est le processus auto-immun dont le taux de destruction des cellules  $\beta$  est variable, mais contribue néanmoins au développement du diabète insulino-dépendant. Ce processus auto-immun est caractérisé par l'infiltration de cellules mononucléaires dans les îlots de Langerhans et apparaît des années avant l'établissement du diagnostic. Ces cellules sont responsables du processus auto-immun et entraînent l'apparition de plusieurs auto-anticorps circulants dirigés contre les cellules  $\beta$  du pancréas : auto-anticorps anti-îlots (ICA; de l'anglais, *islet cell cytoplasmic antibodies*), auto-anticorps anti-insuline (IAAs; de l'anglais *insulin auto-antibodies*), auto-anticorps anti-décarboxylase de l'acide glutamique (GAD; de l'anglais, *glutamic acid decarboxylase auto-antibodies*) et auto-anticorps anti-tyrosine phosphatase membranaire (de l'anglais, *tyrosine phosphatase-related IA-2 molecule*) [15]. La présence d'un de ces quatre auto-anticorps témoigne des premiers signes de la destruction des cellules  $\beta$ -pancréatiques et fait partie de l'évaluation du profil auto-immunitaire qui peut être détecté dans le sérum des années avant l'apparition de l'hyperglycémie.

## **Le diabète de type 2**

Le diabète de type 2 (DT2), qui représente environ 90 % de l'ensemble des formes existantes de diabète [10], est caractérisé par deux défauts pathologiques identifiables chez les patients. Le premier défaut consiste en une anomalie du recaptage et de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, appelé résistance à l'insuline. Le second correspond à une défaillance des cellules  $\beta$ -pancréatiques, qui se reflète par une incapacité du pancréas à sécréter suffisamment d'insuline pour compenser la résistance à l'insuline qui s'installe progressivement chez des sujets prédisposés. Se distinguant par une carence insulinique relative, le DT2 est non-insulino-dépendant, initialement du moins. L'étiologie ainsi que la

pathophysiologie du DT2 seront expliquées en détails dans la prochaine section du présent chapitre.

## **Le diabète gestationnel**

Au cours des deuxième et troisième trimestres, une grossesse normale est associée à une augmentation physiologique de la résistance à l'insuline, et l'euglycémie chez ces femmes est maintenue grâce à une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Toutefois, 3 à 5 % des grossesses sont caractérisées par un défaut de la sécrétion d'insuline qui ne parvient pas à compenser pour la résistance à l'insuline physiologique associée à la gestation, ce qui entraîne en conséquence le développement d'un diabète [16, 17]. Les risques associés au diabète de grossesse, habituellement asymptomatique, comprennent une augmentation de l'incidence de la mortalité [18] et de la morbidité néonatales telles l'hypocalcémie, l'hypoglycémie et la macrosomie [19]. Le diagnostic du diabète gestationnel et par conséquent, l'initiation d'un traitement, sont d'une importance telle qu'ils peuvent réduire de façon significative les risques de morbidité et de mortalité associés à ce type de diabète [18].

## **Les autres types de diabète**

Il existe d'autres types de diabète beaucoup plus rares dans la population : parmi ces derniers, notons le diabète monogénique, les maladies du pancréas exocrine, la résistance à l'insuline extrême associée à certaines endocrinopathies et le diabète d'origine médicamenteuse ou chimique.

Le diabète monogénique constitue une forme rare de diabète et est classé en deux principales catégories selon le défaut qui lui est associé, à savoir si le défaut génétique entraîne une déficience en insuline ou un défaut de l'action de l'insuline [20]. La première catégorie comprend les cas attribuables aux mutations ou polymorphismes associés au génome de la mitochondrie, au diabète néonatal permanent (mutations entraînant le développement d'un diabète dans les six premiers mois de la vie du nourrisson), et les cas attribuables au diabète qui affectent des gènes codant pour la plupart des protéines

impliquées dans la production d'insuline de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Autrefois connu sous l'appellation du diabète de type MODY (de l'anglais, *Maturity Onset Diabetes of the Young*) [10], ce type de diabète est, tel qu'indiqué par son nom, un diabète apparaissant tôt dans la vie, soit à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte. La mutation de six gènes, la plupart étant des gènes de la cellule  $\beta$ -pancréatique, est connue pour causer un diabète et affecter la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  [21]. Parmi les gènes identifiés, un gène code pour la glucokinase, une enzyme du pancréas exocrine et également retrouvée dans le foie et correspond au MODY 2. Les cinq autres gènes codent pour des facteurs de transcription de la cellule  $\beta$ -pancréatique : HNF-4 $\alpha$  (de l'anglais, *hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* ), HNF-1 $\alpha$  (de l'anglais, *hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$* ), PDX-1 (de l'anglais, *pancreatic duodenal homeobox 1*), HNF-1 $\beta$  (de l'anglais, *hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$* ) et NeuroD1, qui correspondent respectivement au MODY 1-3-4-5 et 6. Seulement 2 à 5% de tous les cas de diabète sont causés par une mutation de ces gènes [22]. La seconde catégorie de diabète comprend les défauts génétiques entraînant un défaut de l'action de l'insuline. Ces anomalies sont très rares et résultent principalement de désordres génétiques associés à des mutations du récepteur de l'insuline [23]. Les symptômes de ces désordres génétiques comprennent une hyperinsulinémie qui est associée à une hyperglycémie modeste et à un diabète sévère. Les individus qui sont atteints de ce type de mutations génétiques peuvent développer diverses pathologies telles que l'acanthosis nigricans, le lepréchaunisme ainsi que le syndrome Rabson-Mendenhall [10].

Dans un autre ordre d'idée, toute atteinte au pancréas exocrine est également susceptible d'entraîner le développement d'un diabète : pancréatite, trauma, infection, carcinome pancréatique, pancréatectomie, fibrose kystique, etc. (Association canadienne du diabète). En règle générale, ces pathologies réduisent la masse des cellules  $\beta$ -pancréatiques et par conséquent, la quantité d'insuline sécrétée, d'où le développement d'un diabète secondaire.

Également, plusieurs endocrinopathies peuvent induire un diabète. Certaines hormones (e.g. hormone de croissance, cortisol, glucagon, épinéphrine) antagonisent les effets de l'action de l'insuline. Ainsi, un excès ne serait-ce que d'une seule de ces hormones,

rencontré dans les cas d'acromégalie, de syndrome de Cushing, de glucagonome ou de phéochromocytome, peut engendrer un diabète [10].

Enfin, le diabète d'origine médicamenteuse ou chimique est bien documenté et correspond aux hyperglycémies provoquées par certains types de médicaments ou d'agents chimiques. Glucocorticoïdes, antipsychotiques, agonistes  $\beta$ -adrénergiques, diazoxide, cyclosporine et antiprotéases sont tous des médicaments, pour ne nommer que ceux-ci, connus pour leurs effets secondaires non désirables de diabète [10].

## **Les complications et la mortalité associées au diabète**

Le diabète demeure à ce jour une maladie difficilement curable. Les comorbidités associées au diabète sont multiples et résultent principalement des effets à long terme de l'hyperglycémie mal contrôlée. Ainsi, le risque de développer des désordres physiologiques autres que le diabète est proportionnel au contrôle de la glycémie. Les complications à long terme du diabète incluent la rétinopathie associée à une perte potentielle de la vision, la néphropathie pouvant évoluer en une insuffisance rénale grave ainsi que les neuropathies périphériques pouvant entraîner le développement d'ulcères et ultimement, l'amputation des membres inférieurs [24]. Les maladies cardiovasculaires sont la plus grande cause de mortalité associée au diabète (Fédération internationale du diabète, 2011). En plus de ces troubles métaboliques, le diabète engendre des conséquences néfastes sur le plan psychologique et social qui peuvent affecter de façon sérieuse la santé mentale [25, 26]. Fait intéressant, il est toutefois possible de renverser ou de prévenir l'apparition de telles complications en l'améliorant le contrôle glycémique [27, 28].

En considérant la situation d'un autre point de vue, les coûts directs du diabète sont non seulement élevés au niveau des collectivités, mais également au niveau économique. En 2005, ces coûts ont totalisé environ 5,6 milliards \$, soit 10% des dépenses directes de santé au Canada [29].

## **L'étiologie du diabète de type 2**

Les principales anomalies métaboliques associées au DT2 sont retrouvées chez la grande majorité des patients. Toutefois, cette maladie demeure tout de même très hétérogène et comporte une composante environnementale, une composante génétique ainsi qu'une composante épigénétique.

### **Les facteurs environnementaux**

Une grande partie des différences de prévalence du DT2 d'un pays à l'autre, voire d'un continent à l'autre, s'explique par l'exposition à des facteurs environnementaux. Parmi ceux-ci, citons l'âge, le sexe, le surpoids et l'obésité, le niveau d'activité physique, la diète et le tabagisme, figurent à titre d'agents étiologiques déterminants dans le développement du DT2 [30]. Ainsi, le mode de vie joue un rôle prépondérant dans l'étiologie de ce type de diabète. En effet, la plupart des patients atteints du DT2 sont obèses et souffrent d'un certain degré de résistance à l'insuline. Or, on connaît fort bien les anomalies biochimiques de l'obésité, en particulier l'obésité centrale. Sous l'appellation syndrome métabolique [31], le tableau clinique chez un individu obèse est caractéristique et inclut, outre une obésité abdominale, une hypertension, une dyslipidémie, une insulino-résistance et une dysglycémie. La plupart des individus ayant cet ensemble de facteurs de risque métaboliques ont cinq fois plus de risque de développer un DT2 que des individus qui ne présentent pas ces facteurs.

Toutefois et heureusement, ces facteurs de risques sont modifiables et peuvent réduire l'incidence du diabète. Les effets de la diète, de l'exercice physique et de la perte de poids chez des personnes exposées peuvent entraîner une réduction du risque de développer un diabète variant entre 42 et 71% selon l'étude et l'âge des individus [32-35].

### **Les facteurs génétiques**

Le DT2 est une maladie hétérogène et polygénique. Outre les facteurs environnementaux, l'hérédité est un facteur prédominant dans l'étiologie du DT2. En effet, le risque de développer un DT2 est de 40% chez les individus qui ont un parent diabétique, et ce risque

s'élève à 70% si deux parents sont atteints [36]. Également, les taux de concordance du DT2 qui existent entre deux jumeaux monozygotes sont évalués à 70%, et à 20-30% chez des jumeaux dizygotes [37, 38]. Enfin, il existe de grandes différences dans la prévalence du diabète dans certains groupes ethniques et ces différences semblent dépendre de facteurs génétiques [39, 40].

Les gènes associés au DT2 sont des gènes de susceptibilité au diabète, à savoir qu'une mutation dans leur séquence d'ADN n'entraîne pas inéluctablement le développement de la maladie. Les études d'association pangénomiques (GWAS; de l'anglais, *genome-wide association studies*) ont permis l'identification d'une dizaine de polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs; de l'anglais *single-nucleotide polymorphisms*). Toutefois, ces variants génétiques sont responsables de moins de 10% de l'héritabilité du DT2 [41]. Ainsi, plusieurs variants ont été associés au DT2 [42], mais seulement deux gènes ont identifiés par études de liaison génétique : *CAPN10* (de l'anglais, *calpain 10*) et *TCF7L2* (de l'anglais, *transcription factor 7-like 2*) [43, 44]. Suite à l'identification de ces variants dont les fonctions biologiques étaient peu connues dans la cellule  $\beta$ -pancréatique, il a été montré que les gènes codants pour la calpaïne 10, une protéase dépendante du calcium, et pour *TCF7L2*, un facteur de transcription de la famille des Wnt, semblent être impliqués dans la sécrétion d'insuline et dans l'expression de son gène [45-47]. L'identification de tels rôles dans la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique démontre par le fait même l'importance de ces études génétiques qui permettent l'identification de candidats potentiels dans le but de mieux comprendre les mécanismes par lesquels se développe le DT2.

### **Les facteurs épigénétiques**

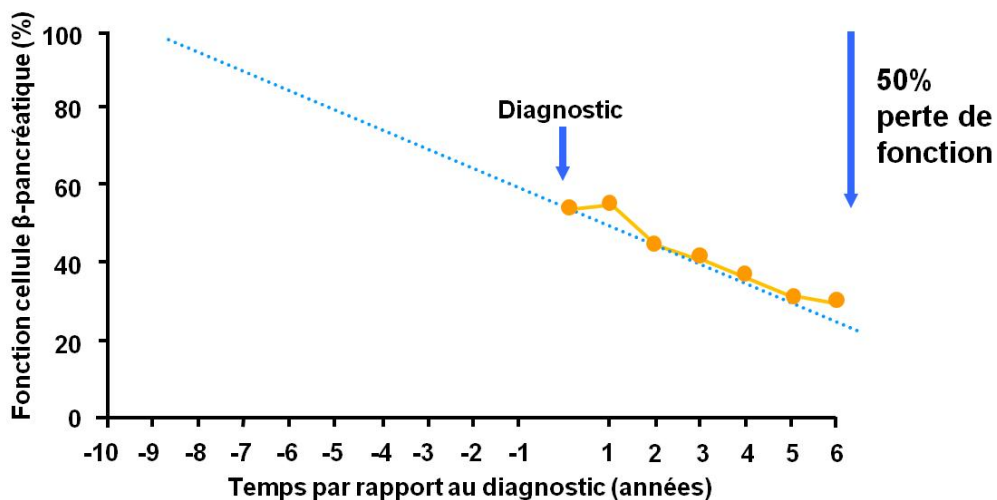
Le DT2 découle également des interactions qui existent entre l'environnement et certains gènes de susceptibilité. En particulier, les modifications épigénétiques ont récemment été associées du développement de la maladie (révisé dans [48]). Plus précisément, le développement d'un DT2 peut être associé à un retard de croissance intra-utérine, tel que démontré dans un modèle de rat où un retard de croissance a été induit par une ligation bilatérale de l'artère utérine de la femelle gestante afin de restreindre l'apport en nutriments



au fœtus. Dans cette étude, il y est rapporté que les rejetons développent un DT2 à l'âge adulte via l'extinction du gène codant pour PDX-1, un facteur de transcription crucial dans le développement, la différenciation et la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique [49, 50]. Autrement dit, la régulation épigénétique de l'expression de gènes représente un mécanisme par lequel la susceptibilité génétique et les insultes environnementales peuvent engendrer un DT2.

## **La pathophysiologie du diabète de type 2**

Le DT2 est attribuable à une sécrétion insuffisante d'insuline par le pancréas accompagnée d'une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. L'homéostasie normale du glucose (discutée dans le chapitre 2) n'étant plus assurée adéquatement, le DT2 mène à une détérioration de la glycémie avec le temps [28]. En dépit du fait que plusieurs études ont montré que la résistance à l'insuline précède l'hyperglycémie chez des sujets qui développeront un DT2 [51, 52], il est désormais largement admis que le DT2 se développe chez les sujets résistants à l'insuline seulement lorsque survient une défaillance de la fonction de la cellule  $\beta$  [53-56]. Cette perte de fonction est par ailleurs illustrée sur la figure 2 qui représente une extrapolation des taux observés du déclin de la fonction de la cellule  $\beta$  dans un groupe d'individus diabétiques. Au moment du diagnostic, la fonction des cellules  $\beta$  est déjà réduite de moitié. En présumant que cette perte de fonction est linéaire, il est possible d'extrapoler les résultats qui suggèrent par ailleurs que cette perte de fonction survient jusqu'à dix ans avant l'établissement du diagnostic [57].



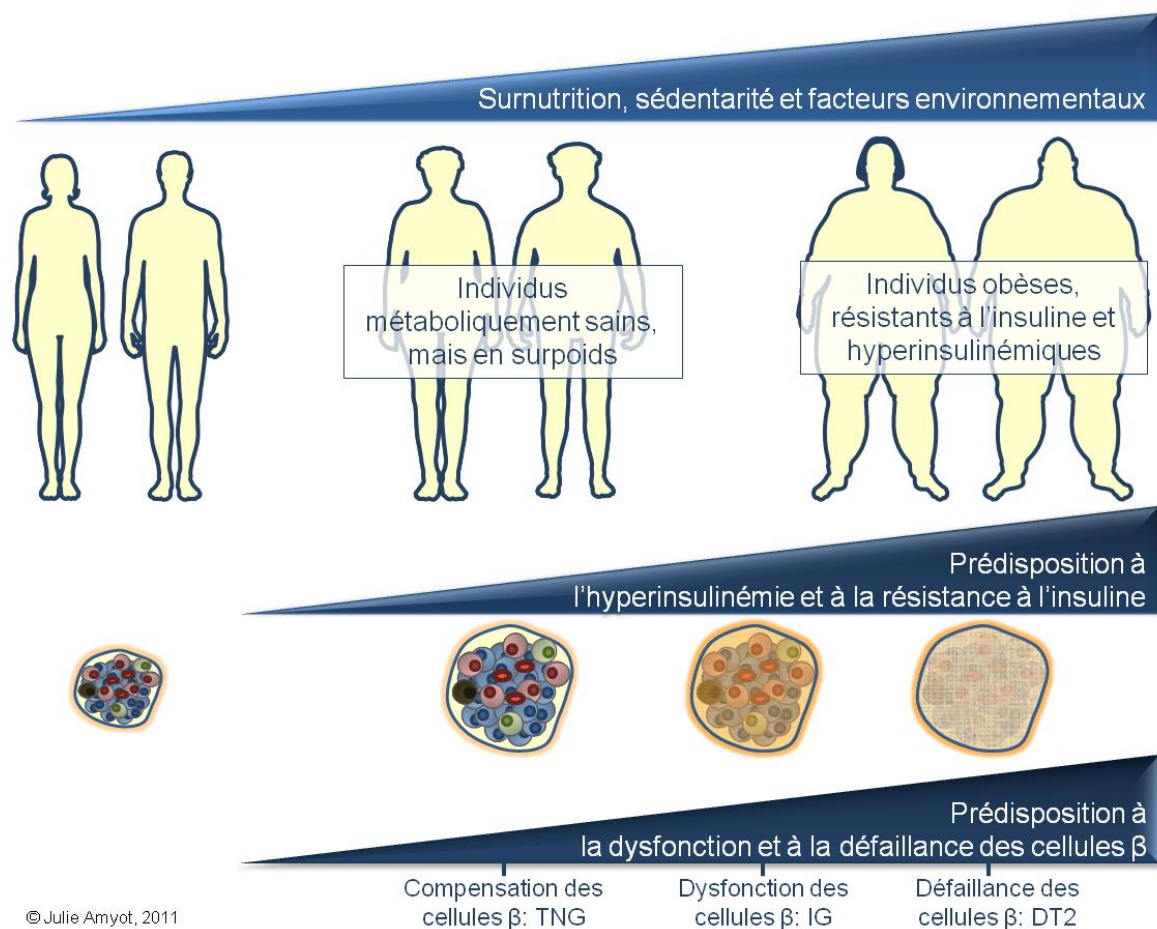
**Figure 2: La perte de fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique dans le DT2.**

La perte fonction de la cellule  $\beta$  est estimée à 50 % au moment du diagnostic de la maladie et s'initierait jusqu'à dix ans avant l'établissement du diagnostic. Adapté de [57].

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

L'histoire naturelle du DT2 comprend plusieurs phases qui sont, de manière générale, associées à la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique (Figure 3). En présence d'un excès de nutriments, la cellule  $\beta$ -pancréatique développe un mécanisme de compensation au cours duquel elle sécrète plus d'insuline afin de maintenir l'euglycémie et ce, malgré la résistance à l'insuline qui s'installe progressivement. Cette étape correspond à la phase de prédiabète où la tolérance au glucose est normale. Ce mécanisme de compensation est assuré par une augmentation de la masse et de la capacité de sécrétion des cellules  $\beta$ . Puis, les individus prédisposés à développer un DT2 vont progressivement montrer une diminution graduelle de la sécrétion d'insuline en réponse aux nutriments, de sorte que les niveaux circulants de glucose s'élèvent progressivement. Ces individus présentent une intolérance au glucose due à une altération de la fonction et de la masse des cellules  $\beta$ -pancréatiques qui évoluera vers une défaillance complète de la cellule  $\beta$  avec le temps. Ainsi, le DT2 se développe chez les individus prédisposés qui n'arrivent plus à soutenir une sécrétion accrue d'insuline en réponse à la résistance à l'insuline [53, 58].

Le DT2 entraîne ainsi diverses altérations fonctionnelles et quantitatives au sein des îlots de Langerhans, amas de cellules endocrines composés en grande partie de cellules  $\beta$ -pancréatiques. La fonction normale des cellules  $\beta$ -pancréatiques peut non seulement être affectée par divers facteurs tels que l'excès de glucose et d'acides gras [54, 59-62], le stress du réticulum endoplasmique (RE) (discuté au Chapitre 4), un processus inflammatoire (discuté au Chapitre 5) (figure 4), mais également une diminution de la masse des cellules  $\beta$  et la présence de dépôts d'amyloïde. En effet, la masse totale des cellules  $\beta$  chez les patients diabétiques de type 2 a été rapportée dans certaines études comme étant inchangée, alors que d'autres mentionnent une réduction de l'ordre de 30 à 50 % [63-69]. Quoiqu'il en soit, il est généralement accepté que la perte des cellules  $\beta$ -pancréatiques rencontrée dans le DT2 résulte d'une augmentation de l'apoptose [66, 69-71] ou d'une diminution de la néogenèse au sein de ces mêmes cellules [72, 73]. Un autre agent responsable du défaut de l'insulinosécrétion chez plus de 90 % des patients diabétiques réside dans la présence de dépôts d'amyloïde dans les îlots [74]. L'amyloïde est un polypeptide cosécrété avec l'insuline [75]. Dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, l'amyloïde forme de fibrilles toxiques pour la cellule. Il a été rapporté que ces dépôts d'amyloïde entraînent la perte des cellules  $\beta$  et le déclin progressif de la sécrétion d'insuline observé chez les individus diabétiques de type 2 [68].

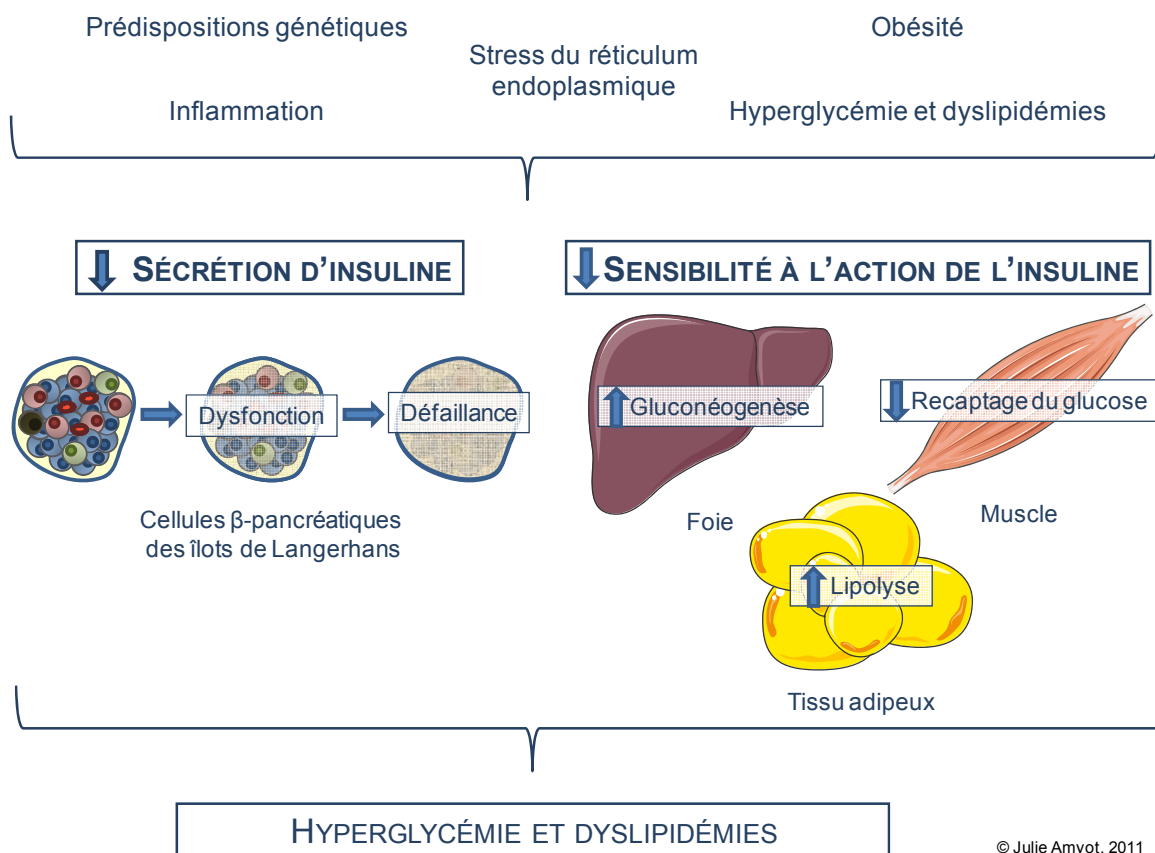


### Figure 3: L'histoire naturelle du DT2 et de la dysfonction de la cellule $\beta$ .

Le DT2 se développe en réponse à l'exposition à une combinaison de facteurs environnementaux chez des individus prédisposés à l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et à la défaillance de la cellule  $\beta$ . Avec le temps la cellule  $\beta$ -pancréatique n'arrive plus à sécréter suffisamment d'insuline pour compenser à la résistance à l'insuline qui s'installe progressivement. Il s'ensuit une hyperglycémie qui se développe avec la dysfonction puis la défaillance de la cellule  $\beta$ . Adapté de [58]. *TNG* : Tolérance normale au glucose; *IG* : Intolérance au glucose.

## La résistance à l'insuline

L'euglycémie est non seulement maintenue grâce à la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques, mais également *via* le captage du glucose par certains tissus périphériques : le foie, le tissu adipeux et les muscles. Or, le DT2 ne se développe pas sans un mécanisme de résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline et est associé à un excès de nutriments. Cette surcharge de nutriments n'est pas sans conséquence puisqu'elle crée notamment un état inflammatoire systémique ainsi qu'un stress du RE, tous deux altérant la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Les mécanismes par lesquels l'inflammation et le stress du RE affectent les tissus périphériques incluent l'infiltration de macrophages activés, la production de cytokines proinflammatoires, l'activation de voies proinflammatoires et l'activation du récepteur de type Toll 4 (de l'anglais, *Toll like receptor 4* ou TLR4) (révisé dans [76]). Ces mécanismes entraînent une réduction, voire même l'absence, de la transmission du signal de la liaison de l'insuline à son récepteur, ce qui se traduit par une augmentation de la lipolyse dans les adipocytes, une réduction de recaptage de glucose par les muscles et une augmentation de la gluconéogenèse hépatique, et contribue à l'hyperglycémie et les dyslipidémies rencontrées chez les individus diabétiques (figure 4).



**Figure 4: La pathophysiologie du DT2.**

Le DT2 est une maladie hétérogène. Des prédispositions génétiques et une combinaison de plusieurs facteurs environnementaux entraînent à la fois une diminution de la sécrétion d'insuline due à dysfonction puis une défaillance de la cellule  $\beta$ -pancréatique, et une diminution de la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline.

## **Chapitre 2 – Le pancréas endocrine**

### **La physiologie normale du pancréas endocrine**

#### **La morphologie du pancréas**

Le pancréas est un organe diffus et situé à l'arrière de l'estomac. Chez l'Homme, la tête du pancréas est rattachée au duodénum par le sphincter d'Oddi, et son corps s'étend vers la rate (Figure 5). Anatomiquement et fonctionnellement, le pancréas est divisé en deux parties bien distinctes : une fraction exocrine et une fraction endocrine.

La plus grande partie du pancréas est composée de cellules exocrines dont le rôle consiste à sécréter un liquide alcalin riche en enzymes digestives, telles l'amylase et la lipase, qui sera déversé dans le duodénum par le canal pancréatique. En revanche, 1 à 5 % de la masse totale du pancréas est constituée d'amas de cellules endocrines que l'on nomme îlots de Langerhans [67, 77].

#### **L'îlot de Langerhans, l'unité fonctionnelle du pancréas endocrine**

Au nombre d'approximativement un million, et dispersés entre les cellules exocrines, les îlots pancréatiques, ou de Langerhans, sont des amas sphériques richement vascularisés et sont composés de populations de cellules endocrines. Approximativement 10 % de la perfusion sanguine totale du pancréas est dirigée vers les îlots, qui ne représentent pourtant qu'un faible pourcentage de la masse pancréatique totale. Cet aspect reflète les niveaux d'échange élevés qui existent dans ces structures endocrines [78]. Quoique toujours débattue, la structure du système vasculaire des îlots est par ailleurs très spécialisée. Selon la théorie la plus acceptée, la circulation sanguine pénètre les îlots par les artérioles, situées au centre de l'îlot, puis le sang est ensuite dirigé dans un réseau de capillaires qui s'étend vers la périphérie, perfusant ainsi les cellules  $\beta$  avant les autres types cellulaires [79].

Les îlots sont enrichis de quatre types majeurs de cellules endocrines : les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et PP qui sécrètent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide

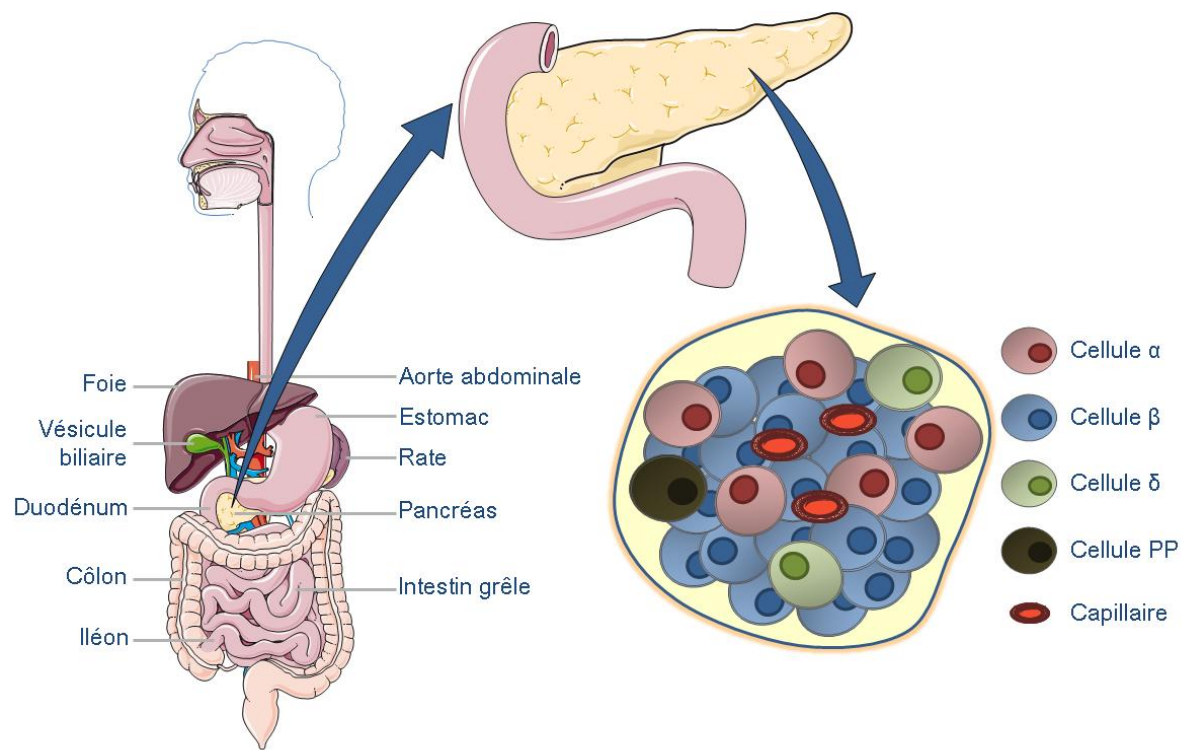
pancréatique (Figures 5 et 7). Chacune de ces hormones remplit une fonction distincte au sein de la régulation de la glycémie. Ces cellules sont caractérisées par une communication intercellulaire permettant un contrôle direct de la sécrétion des hormones. Par ailleurs, chaque îlot fonctionne de façon intégrée, en sécrétant ces hormones responsables du contrôle de la glycémie d'une façon qui est appropriée aux besoins métaboliques.

Soixante à quatre-vingts pour cent des cellules endocrines des îlots sont les cellules  $\beta$  qui sécrètent de l'insuline, une hormone hypoglycémisante de 51 acides aminés. Brièvement (la régulation hormonale de la glycémie sera traitée en détail dans la section suivante), l'insuline sécrétée abaisse la glycémie *via* l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Le second type cellulaire le plus abondant dans l'îlot pancréatique est la cellule  $\alpha$  qui représente environ 25 % de la masse totale des îlots. Les cellules  $\alpha$  sécrètent du glucagon, un peptide de 29 acides aminés qui, à l'inverse de l'insuline, augmente la glycémie. Deux à huit pour cent de la masse des cellules endocrines des îlots sont des cellules  $\delta$ , qui sécrètent la somatostatine, un peptide de 14 acides aminés. Par son action d'inhibition conjointe du relâchement de glucagon et d'insuline, la somatostatine régule la relation existante entre ces deux hormones, et par conséquent, la glycémie. Finalement, les cellules PP sécrètent le polypeptide pancréatique dont le rôle reste à ce jour peu étudié. Sa fonction connue consiste à réguler négativement les sécrétions exocrines et endocrines du tissu pancréatique (révisé dans [80]).

Plusieurs aspects anatomiques différencient les îlots de Langerhans entre les espèces. D'une part, la forme sphérique des îlots semble plus spécifique aux rongeurs. À l'inverse, les îlots humains seraient moins réguliers et leur taille, beaucoup plus hétérogène comparativement aux îlots de rongeurs [81]. D'autre part, l'organisation structurelle des cellules endocrines au sein même de l'îlot diffère entre les deux espèces. Les cellules  $\beta$  chez les rongeurs sont groupées au centre de l'îlot et entourées des cellules  $\alpha$ ,  $\delta$  et PP [82, 83]. Chez l'Homme, les cellules  $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\delta$  sont plutôt disséminées dans l'ensemble de l'îlot et le ratio de cellules  $\beta$  sur  $\alpha$  est inférieur à celui observé chez les rongeurs, le nombre de cellules  $\beta$  étant diminué et le nombre de cellules  $\alpha$  étant augmenté [84]. Ces différences concernant la



cytoarchitecture des îlots de Langerhans entre les espèces reflèterait les différences significatives observées au niveau de leur fonction, notamment au niveau de la sécrétion d'insuline, qui sera traitée ultérieurement [84].



**Figure 5: Le pancréas et l'îlot de Langerhans.**

Situé à l'arrière de l'estomac et annexé au duodénum, le pancréas est une glande majoritairement exocrine. Moins de 5 % de la masse totale du pancréas est composé d'amas cellulaires arrondis de cellules endocrines nommés îlots de Langerhans. Dans ces îlots, environ 80 % des cellules sont des cellules  $\beta$ . Les autres types cellulaires présents sont les cellules  $\alpha$ ,  $\delta$  et PP.

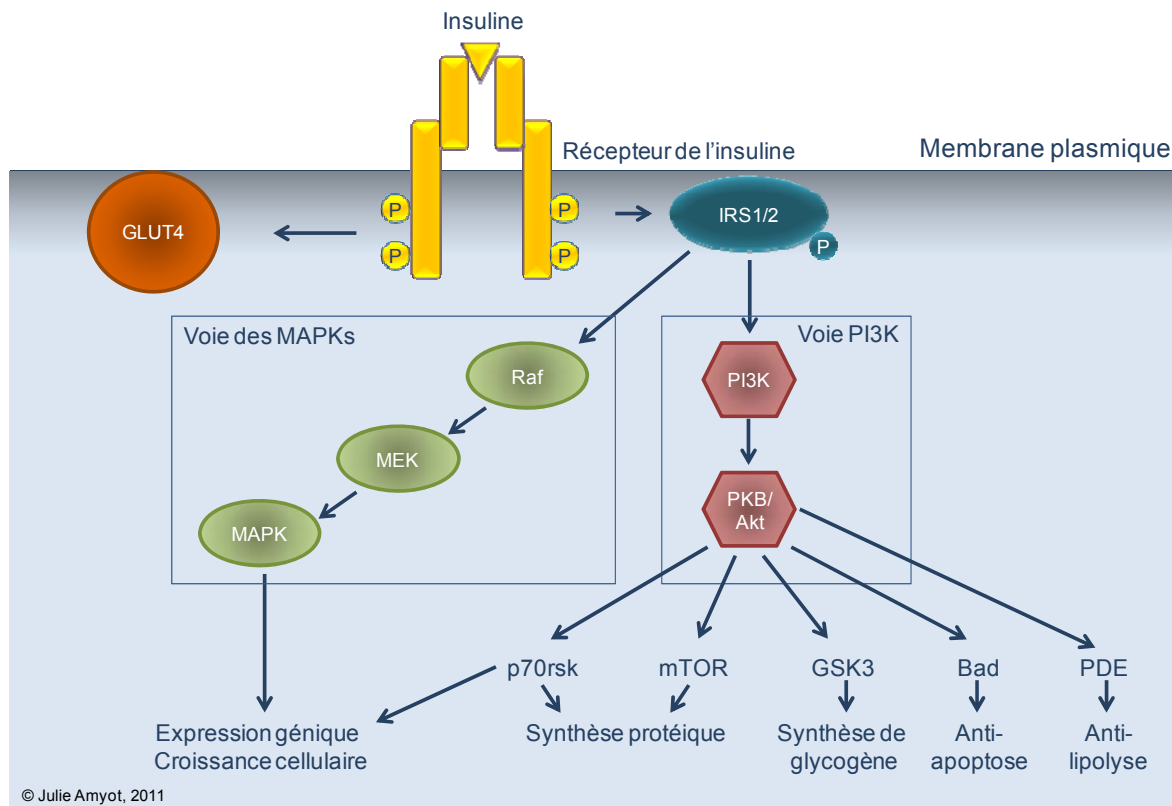
## La régulation hormonale de la glycémie

Le glucose exerce des fonctions vitales dans l'organisme. Il représente un substrat énergétique obligatoire pour certains tissus, notamment le cerveau et les hématies. Un apport ininterrompu de glucose est donc essentiel à la survie et l'organisme a développé des stratégies pour faire face à l'apport discontinu des nutriments. Chez un individu sain, la concentration de glucose dans le sang se situe entre 3,5 et 6,1 mmol/L, et tout affaissement ou élévation de la glycémie se traduit par des conséquences physiologiques néfastes pour l'organisme. L'homéostasie glycémique est par conséquent finement régulée, et ce, grâce à l'action combinée des hormones pancréatiques sécrétées par les îlots de Langerhans, de la production hépatique de glucose et du recaptage de ce dernier par les tissus adipeux et musculaire. Plus précisément, le contrôle de la glycémie est le résultat de l'action d'une hormone anabolique, l'insuline, mais aussi de certains facteurs de croissance de la même famille que l'insuline [85]. Également, certaines hormones cataboliques (glucagon, cortisol, catécholamines et hormone de croissance) exercent des effets opposés à l'action de l'insuline et contribuent au maintien de l'homéostasie glycémique [86].

L'homéostasie normale du glucose représente la balance entre son apport exogène, son utilisation par les tissus et sa production endogène [87]. Ainsi, lorsque la glycémie s'abaisse, les cellules  $\alpha$  libèrent du glucagon, une hormone hyperglycémiant. Le récepteur du glucagon, un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine  $G_s$ , est surtout présent sur les hépatocytes. Or, la liaison du glucagon sur son récepteur va entraîner une augmentation de la glycogénolyse, qui est le mécanisme principal d'augmentation à court terme de la glycémie, mais également de la néoglucogenèse [88]. L'action du glucagon vise avant tout à maintenir la glycémie stable entre les repas par la mobilisation des réserves d'énergie.

À l'inverse, une élévation de la glycémie, mais également des niveaux plasmatiques d'acides aminés, de triglycérides et d'hormones gastro-intestinales (gastrine, sécrétine, polypeptide gastro-intestinal) favorisent le relâchement rapide d'insuline par les cellules  $\beta$ . Cette hormone hypoglycémiant exerce ses actions sur quatre principales cibles tissulaires

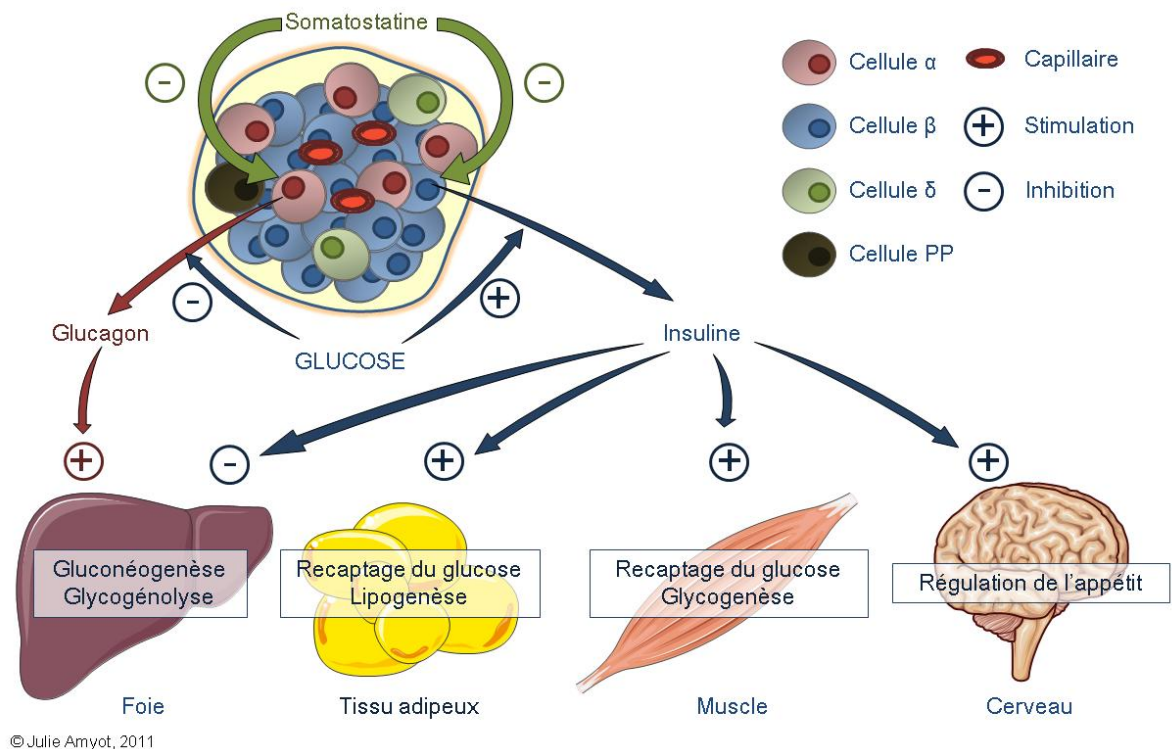
et organes : foie, tissu adipeux, muscles et cerveau. Dans un premier temps, l'insuline se fixe sur son récepteur tyrosine kinase et active une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la voie PI3K (de l'anglais, *phosphatidyl-inositol 3 kinase*) et menant à une augmentation de l'activité de la glycogène synthase (Figure 6). L'augmentation de l'activité de cette enzyme favorise le stockage du glucose dans les hépatocytes sous forme de glycogène. D'autre part, l'insuline abaisse la glycémie en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique, évitant ainsi un apport simultané endogène et exogène de glucose. Dans un deuxième temps et suite à sa fixation sur son récepteur, l'insuline stimule l'exocytose du transporteur de glucose GLUT4 (de l'anglais, *glucose transporter 4*) et l'active dans les tissus adipeux et musculaires, entraînant en conséquence le recaptage du glucose et son emmagasinage sous forme de triglycérides et de glycogène dans les adipocytes et les cellules musculaires, respectivement. De même, l'insuline exerce une action supplémentaire sur le tissu adipeux en inhibant le relâchement d'acides gras par ce dernier. Dans un troisième temps, l'insuline possède une action centrale sur le métabolisme énergétique en diminuant la prise alimentaire, en favorisant la dépense énergétique et en inhibant la production hépatique de glucose [89, 90]. En addition à ses rôles majeurs dans la mise en réserve et l'utilisation des substrats énergétiques, l'insuline est un puissant facteur de croissance exerçant des fonctions pléiotropes sur le métabolisme des protéines, la croissance cellulaire et le contrôle de l'apoptose (révisé dans [91]).



**Figure 6: Les voies de signalisation activées par l'insuline.**

La liaison de l'insuline à son récepteur tyrosine kinase entraîne son autophosphorylation et la phosphorylation de protéines IRS1/2 (de l'anglais, *insulin receptor substrate 1/2*). Ces dernières activent la voie des MAPKs (de l'anglais, *mitogen-activated protein (MAP) kinase*) et la voie PI3K afin de réguler d'une part l'expression de gènes, la croissance cellulaire, la synthèse des protéines, la synthèse du glycogène et d'autre part, exercer une activité anti-apoptose et anti-lipolyse. Adapté de [91, 92]. *PKB* : protéine kinase B/Akt; *mTOR* : de l'anglais, mammalian target of rapamycin; *GSK3*: de l'anglais, glycogen synthase kinase 3; *Bad* : de l'anglais, Bcl-2-associated death promoter; *PDE* : phosphodiesterase.

Une tierce hormone exerce des fonctions importantes dans la régulation de la glycémie. En réponse à une élévation des niveaux circulants de glucose, d'acides aminés, d'acides gras et de plusieurs hormones gastro-intestinales, les cellules  $\delta$  sécrètent la somatostatine. Outre ses actions sur la motilité de certaines parties du système digestif et sur la sécrétion et l'absorption dans le tractus gastro-intestinal, la somatostatine assure une régulation fine de la glycémie en inhibant à la fois le relâchement d'insuline et de glucagon. Ainsi, il a été suggéré que le principal rôle de la somatostatine consiste à réduire l'utilisation des nutriments absorbés par les tissus périphériques, prévenant en conséquence l'épuisement rapide des sources d'énergie et assurant que ces sources d'énergie soient disponibles sur une plus longue période de temps.



**Figure 7: La régulation hormonale de la glycémie.**

L'insuline, le glucagon et la somatostatine jouent des rôles clés dans la régulation de la glycémie.

## **L'insuline : de sa biosynthèse à sa sécrétion**

La fonction primaire de la cellule  $\beta$ -pancréatique consiste donc à synthétiser et sécréter l'insuline en réponse aux nutriments. En conséquence, la cellule  $\beta$  du pancréas possède plusieurs caractéristiques associées aux cellules spécialisées de sécrétion de protéines à haut débit. Entre autres, ces cellules ont typiquement un RE rugueux très développé qui leur permet un repliement adéquat des protéines en réponse à une demande accrue de synthèse de protéines. Les cellules  $\beta$ -pancréatiques n'échappent pas à cette règle. Également, et dans le but d'assurer une biosynthèse d'insuline rapide en réponse à une élévation de la glycémie, la cellule  $\beta$ -pancréatique contient une grande réserve d'ARN messager (ARNm) mature de l'insuline, qui représente jusqu'à 20 % des ARNms totaux dans la cellule, et 30 à 50% de la synthèse totale des protéines est dédiée à la synthèse d'insuline [93-95]. Or, il a été discuté au chapitre précédent que l'insuline est d'une importance physiologique majeure dans l'homéostasie métabolique. De ce fait, cette hormone est régulée à de multiples niveaux, de la transcription de son gène à sa sécrétion. Cette partie discutera des étapes de la régulation post-transcriptionnelle de l'insuline jusqu'à sa sécrétion. En revanche, la régulation transcriptionnelle du gène de l'insuline, qui représente le sujet principal de cette thèse, sera discutée en détail dans le chapitre 3.

### **La structure et la biosynthèse de l'insuline**

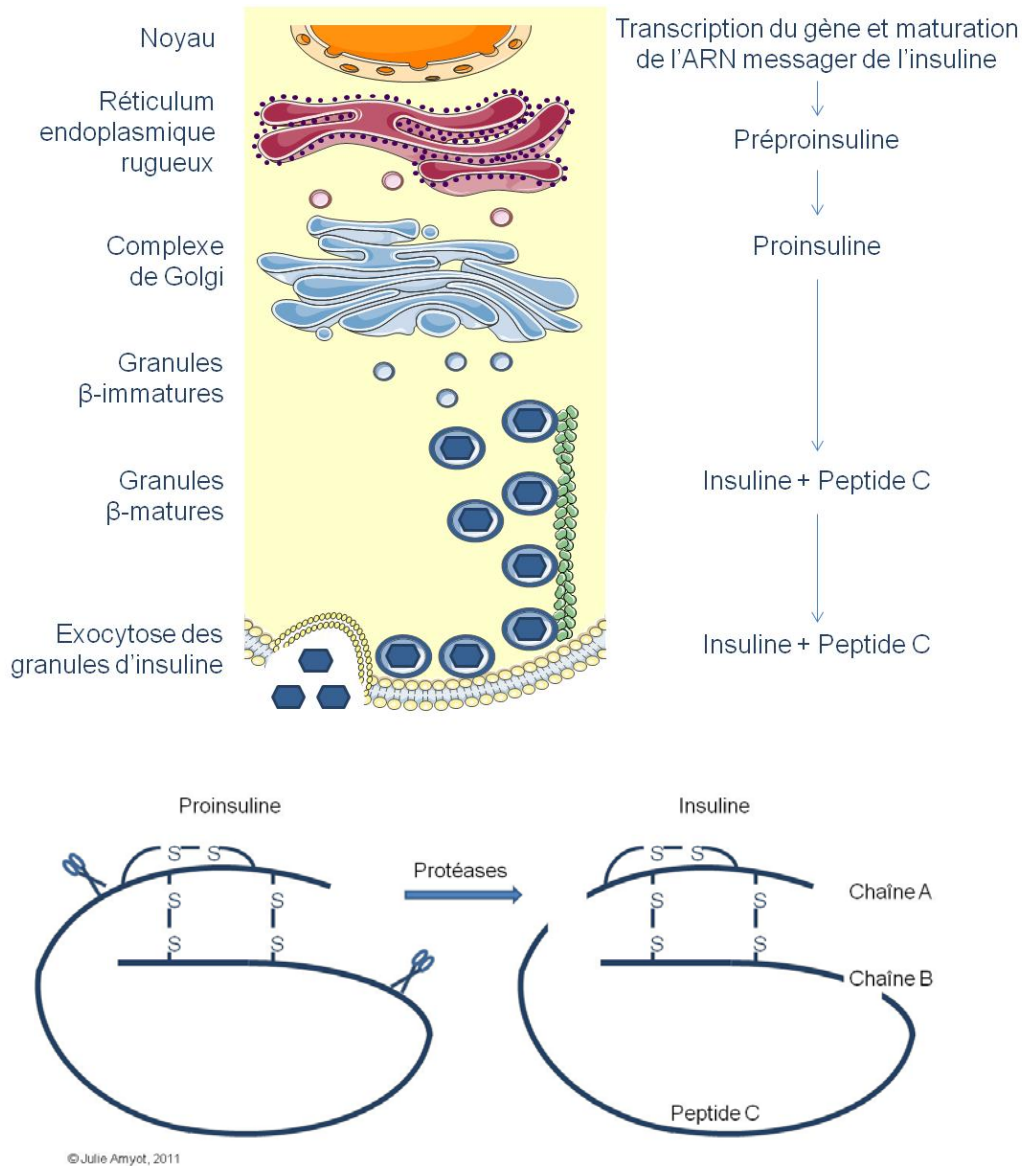
L'insuline comprend 2 chaînes polypeptidiques, les chaînes A et B, regroupées entre elles par deux ponts disulfures [96-98]. Un troisième pont disulfure relie deux cystéines propres à la chaîne A. L'insuline est synthétisée sous forme d'un précurseur plus volumineux de 110 acides aminés appelé préproinsuline, qui contient un peptide de connexion, le peptide C (Figure 8).

La biosynthèse de l'insuline, illustrée sur la Figure 8, s'amorce en réponse à des niveaux élevés de glucose, qui induisent près de 50 fois le taux de biosynthèse de l'hormone [99-101]. La première étape est la traduction de l'ARNm de la préproinsuline, via les étapes de

traduction des protéines classiques relatives à la plupart des ARNms eucaryotiques [102]. Le glucose exerce des effets généraux sur la traduction de l'ARNm de l'insuline en augmentant l'activité des facteurs généraux d'initiation de la traduction, le taux d'élongation de la traduction et la reconnaissance du peptide signal, mais également des mécanismes moléculaires plus spécifiques impliquant des séquences hautement conservées dans la région non transcrite 5' (5'UTR; de l'anglais, *5' untranslated region*) de l'ARNm de l'insuline [103-105]. Une fois traduite, la préproinsuline est acheminée dans le RE où elle sera repliée correctement par plusieurs chaperonnes moléculaires telles que BIP (de l'anglais, *Binding immunoglobulin protein*) et où la formation des ponts disulfures sera catalysée par la protéine PDI (de l'anglais, *protein disulfide isomerase*), les protéines BIP et PDI étant toutes deux exprimées dans le RE rugueux des cellules  $\beta$ -pancréatiques [106]. Puis, la préproinsuline traverse les citernes des membranes du RE rugueux, et une chaîne de 24 acides aminés est excisée de l'extrémité amino-terminale, produisant la proinsuline. La proinsuline est ensuite transportée vers le complexe de Golgi où elle est empaquetée sous forme non active dans les granules de sécrétion précoces. L'insuline dimérise, puis trois dimères de proinsuline se regroupent ensuite pour former un hexamère de molécules de proinsuline en présence d'atomes de zinc ( $Zn^{2+}$ ), formant la structure cristalline caractéristique des granules  $\beta$  [107]. Ces granules subissent une maturation, phase pendant laquelle les endoprotéases PC2 et PC1/3 (de l'anglais, *protéine convertase 2 et 1/3*) et la carboxypeptidase H (CPH) clivent de façon séquentielle les résidus dibasiques situés aux extrémités du peptide C [108, 109]. Ce clivage enzymatique entraîne la conversion de la proinsuline en insuline mature et, puisque le clivage du peptide C rend accessible la partie de l'insuline importante pour son activité [107], l'activation de l'insuline mature.

Dans une autre perspective, la biosynthèse normale de l'insuline est altérée chez les individus diabétiques. Dans cette catégorie de patients, le ratio proinsuline sur insuline mature est approximativement 2 à 3 fois plus élevé que chez un individu sain [110, 111]. Les bases de cette disproportion sont partiellement identifiées. Alors que certains suggèrent qu'il s'agit d'un défaut de maturation de l'insuline [112], d'autres, au contraire, proposent

que des granules immatures contenant la proinsuline relâchent leur contenu de façon précoce [113].



**Figure 8: Biosynthèse et structure de l'insuline.**

Suivant sa translocation co-traductionnelle, la préproinsuline est exportée dans le RE où elle sera correctement repliée. Puis la proinsuline est emballée dans le complexe de Golgi avant d'être acheminée vers les granules  $\beta$ -immatures qui contiennent les enzymes responsables de son clivage



protéolytique. L'insuline et le peptide C clivés subissent ensuite un processus de maturation dans les granules sécrétoires et seront sécrétés sur demande, en réponse à une élévation de la glycémie par exemple.

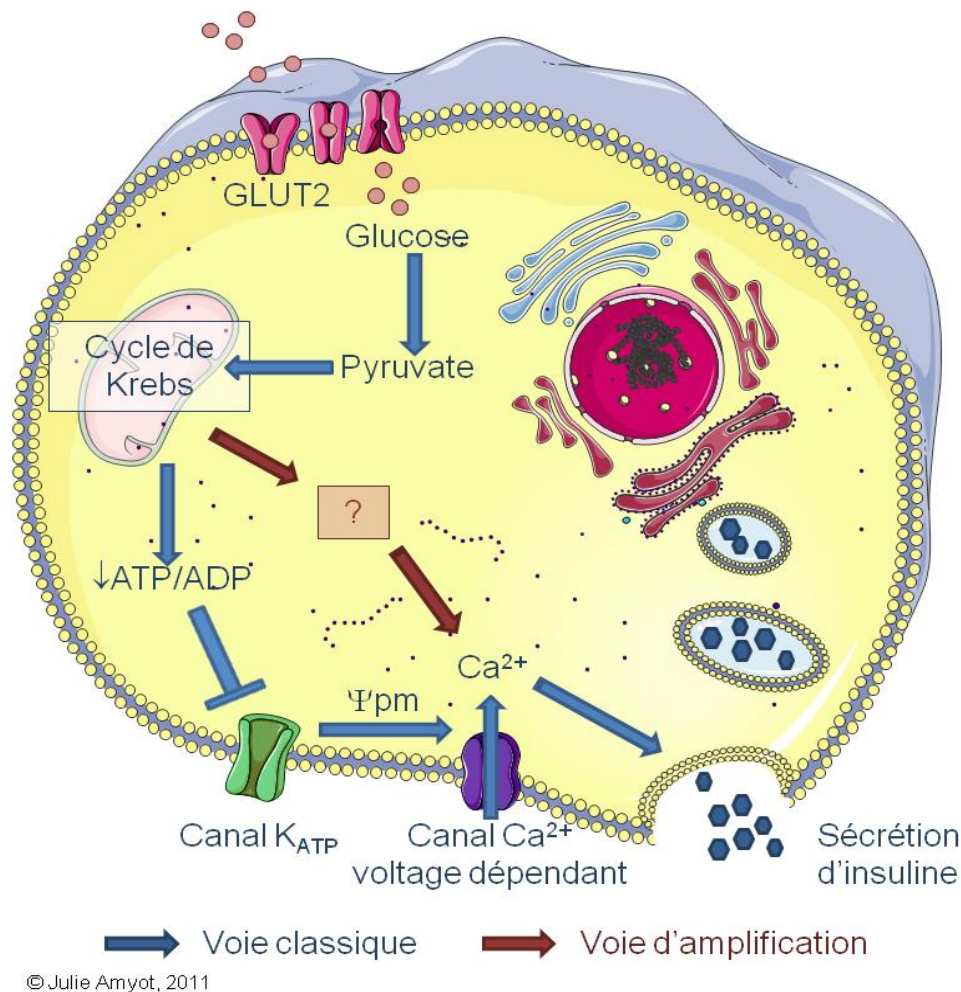
## **La sécrétion d'insuline**

Outre le glucose, qui représente le plus important régulateur de la sécrétion d'insuline, les acides gras, les acides aminés et certaines hormones gastro-intestinales régulent également la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

### *Modèle classique de la sécrétion de l'insuline*

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques peuvent détecter les concentrations circulantes de glucose par le transporteur du glucose GLUT2 exprimé à leur surface cellulaire et qui, avec sa faible affinité pour le glucose ( $K_d$  15-20 mmol/L), capte ce dernier de façon proportionnelle à l'élévation de la glycémie [114]. Une fois pénétré dans la cellule, le glucose est rapidement métabolisé en glucose-6-phosphate par la glucokinase [115] puis *via* la glycolyse, en pyruvate. Le pyruvate entre ensuite dans la mitochondrie où il sera métabolisé par le cycle de Krebs (Figure 9). Il s'ensuit alors une élévation du ratio ATP/ADP (adénosine triphosphate/ adénosine diphosphate) qui entraîne la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP (canaux  $K_{ATP}$ ) [116-118]. Cette fermeture des canaux  $K_{ATP}$  entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique, active les canaux calciques voltage-dépendants, qui s'ouvrent afin de permettre l'entrée de calcium dans la cellule [119]. C'est précisément l'élévation de la concentration intracellulaire des ions calciques qui provoque l'exocytose des vésicules d'insuline, dont on en dénombre entre 10 000 et 13 000 par cellule chez la souris [120-122], libérant ainsi l'insuline dans la circulation sanguine [123, 124].

Enfin, des facteurs métaboliques de couplage, dont la nature demeure encore très discutée, entraîneraient également une augmentation de la concentration cytosolique en ions calcium, et contribueraient ainsi à l'amplification de la sécrétion d'insuline [56, 125, 126].



### Figure 9: Modèle classique de la sécrétion d'insuline.

Le glucose est transporté dans la cellule  $\beta$ -pancréatique par le transporteur GLUT2. Le glucose est ensuite métabolisé en pyruvate qui sera métabolisé à son tour dans la mitochondrie. Il s'ensuit une élévation du ratio ATP/ADP qui ferme les canaux  $K_{ATP}$  dépendants, entraînant une dépolarisation de la membrane plasmique qui permet une entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Cet influx de  $Ca^{2+}$  déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline. D'autres facteurs métaboliques de couplage induisent également une élévation de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$ , contribuant à l'amplification de la sécrétion d'insuline.

## Chapitre 3 – Le gène de l’insuline

### La structure du gène de l’insuline

Le gène de l’insuline, ou préproinsuline, est presque exclusivement exprimé dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, à l’exception de faibles niveaux d’expression détectés dans un certain nombre de tissus extra-pancréatiques [127, 128], incluant le cerveau [129], le thymus [130-132], les glandes lacrymales [133] ainsi que les glandes salivaires [134]. Le rôle de l’expression du gène de l’insuline dans ces tissus reste confus, et certains ont rapporté une fonction de communication entre les complexes hormonaux, ou encore d’établissement d’une tolérance immune [135-137]. Par ailleurs, la séquence du gène de l’insuline a hautement été conservée au cours de l’évolution [138]. Dans la plupart des espèces, la préproinsuline n’existe que sous la forme d’un gène unique. Toutefois, le rat et la souris présentent deux formes non-alléliques du gène de l’insuline. Ces deux gènes murins sont situés sur le chromosome 1 chez le rat et sur les chromosomes 6 (gène I) et 7 (gène II) chez la souris [139], et sont exprimés en quantités relativement égales chez le rat [140]. Chez l’homme, la location chromosomique du gène de l’insuline se situe sur le bras court du chromosome 11, qui serait homologue aux chromosomes 1 et 7 chez la souris et le rat respectivement [139].

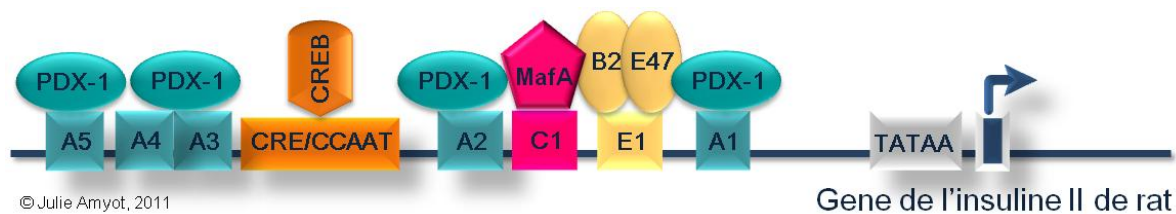
Les niveaux messagers de l’insuline représentant jusqu’à 20 % de la quantité totale d’ARNms présents dans la cellule  $\beta$  [93, 94], le contrôle transcriptionnel du gène de l’insuline est finement régulé et est conféré par les séquences cis-régulatrices situées dans une région hautement conservée. Cette région s’étend sur approximativement 400 paires de bases (pb) en amont du site de départ de la transcription et forme la région promotrice du gène de l’insuline. Les principaux éléments de régulation du promoteur de l’insuline sont illustrés sur la figure 10. L’orchestration des différents facteurs de transcription qui contrôlent la région promotrice du gène de l’insuline est complexe et hautement sophistiquée, assurant ainsi une régulation transcriptionnelle étroitement contrôlée.

## La régulation physiologique de l'expression du gène de l'insuline

### La régulation positive

#### Les éléments cis-régulateurs et les facteurs de transcription impliqués

Le gène de l'insuline partage différents motifs de domaines de liaison à l'ADN conservés qui peuvent être régulés par les mêmes facteurs de transcription. Parmi ces domaines de liaison, les éléments cis-régulateurs critiques comprennent les éléments A, C1, E et CRE (de l'anglais, *cAMP response element*), qui lient respectivement les facteurs de transcription PDX-1 (de l'anglais, *pancreatic duodenal homeobox 1*), MafA (de l'anglais, *mammalian homologue of avian MafA/L-Maf*), B2/E47 (*Beta 2/NeuroD/E47*) et CREB (de l'anglais, *CRE binding protein*) (Figure 10).



**Figure 10: Représentation schématique de la région proximale du promoteur de l'insuline II de rat.**

Situé environ 400 paires de bases en amont du site de départ de la transcription, la région promotrice du gène de l'insuline comprend des éléments cis-régulateurs qui lient les facteurs de transcription suivants : PDX-1, MafA, B2/E47 et CREB.

#### Les boîtes A (A1 – A5)

Les boîtes A incluent les séquences riches en nucléotides adénosine (A) et thymidine (T) et se présentent au nombre de cinq (A1 – A5) dans la région promotrice du gène de l'insuline. À l'exception de la boîte A2 (GGAAAT), toutes les boîtes A contiennent la séquence TAAT liant les facteurs de transcription de la famille des protéines à homéodomains (de l'anglais, *homeobox*) tel que PDX-1 [141]. La boîte A3 (-201/-196 pb) serait critique dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline puisque sa mutation entraîne une

diminution très marquée de l'activité promotrice [142]. PDX-1 joue un rôle crucial dans le développement du pancréas et dans la maturation des cellules  $\beta$  (révisé dans [143]). Également, les souris hétérozygotes pour *pdx-1* sont intolérantes au glucose [144] et les souris dont le gène a été invalidé sélectivement dans les cellules  $\beta$  développent un diabète avec l'âge [144, 145]. Rappelons également qu'une inactivation hétérozygote de PDX-1 chez l'humain entraîne un diabète de type MODY (discuté dans le Chapitre 1). Tous ces défauts témoignent de l'importance de PDX-1 dans la régulation transcriptionnelle du gène de l'insuline.

#### *L'élément C1*

MafA contrôle l'expression du gène de l'insuline *via* sa liaison à l'élément C1 (-118/-107) du promoteur dont la séquence contient une répétition CAGG. Ce facteur de transcription de la famille des protéines portant une agrafe à leucine (de l'anglais, *basic Leucine Zipper* ou bZIP) est d'une importance cruciale pour la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques puisque les souris invalidées pour ce gène présentent plusieurs anomalies au niveau des îlots de Langerhans, des niveaux largement abaissés de l'expression du gène de l'insuline et développent un diabète [146]. Également, sa séquence de liaison à l'élément C1 joue un rôle important dans la régulation la transcription du gène de l'insuline et sa mutation entraîne une réduction de l'activité du promoteur de l'insuline [147].

#### *Les boîtes E (E1 et E2)*

Les boîtes E (CANNTG) lient les facteurs de transcription de la famille des protéines à motif hélice-boucle-hélice (de l'anglais, *basic helix-loop-helix* ou bHLH) tel que l'hétérodimère B2/E47. Deux boîtes E ont été identifiées sur le promoteur de l'insuline de rat : la boîte E1 (-100/-91) et la boîte E2 (-241/-233). L'hétérodimérisation de B2/E47 augmente sa liaison à l'ADN et son activité d'activation transcriptionnelle [148, 149] et la mutation de la boîte E1 entraîne une diminution marquée de l'activité du promoteur du gène de l'insuline [150, 151].

### *L'élément de réponse de l'AMP cyclique (CRE1 et CRE2)*

Dans la région promotrice du gène de l'insuline, il existe deux sites de l'élément de réponse de l'AMP cyclique (CRE1 et CRE2) qui lient les facteurs de transcription de la famille des protéines portant une agrafe à leucine telle que la protéine CREB et les protéines de la famille des ATFs (de l'anglais, *Activating Transcription Factor*). Tous ces sites sont transcriptionnellement actifs et ont été identifiés comme étant des sites d'activation et de répression transcriptionnels [152-154].

### **Le glucose**

L'homéostasie glycémique requiert une régulation fine de la production et de la sécrétion de l'insuline. En conséquence, le glucose contrôle toutes les étapes de la régulation du gène de l'insuline : transcription, épissage et stabilité de l'ARNm (Figure 11).

### *Régulation de l'activité du promoteur du gène de l'insuline par le glucose*

Dans un premier temps, le glucose augmente les niveaux d'ARNm de PDX-1 [155] et de MafA [156, 157], du moins *via* PDX-1 qui régule sa propre expression [158] ainsi que celle de MafA [159]. Également, PDX-1, MafA et B2 subissent plusieurs modifications post-traductionnelles: phosphorylation [160, 161], acétylation [162], O-glycosylation [157, 163].

Dans un deuxième temps, le glucose exerce un niveau supérieur de régulation par la modulation de la localisation cellulaire de PDX-1 et de B2. D'une part, PDX-1 (31 kDa) est inactif à l'état basal et est majoritairement localisé dans le cytoplasme [164]. Toutefois, de faibles quantités de PDX-1 sont liées à la boîte A3 du promoteur, associées à aux histones déacétylases HDAC1 et HDAC2 et répriment la transcription du gène de l'insuline [165]. En réponse au glucose, PDX-1, activé par phosphorylation, devient une protéine nucléaire de 41 kDa [164]. Une fois dans le noyau, PDX-1 favorise le recrutement de coactivateurs transcriptionnels tel que l'histone acétyltransférase p300 et l'histone méthyltransférase Set7/9 et interagit avec ces derniers afin de potentialiser la transcription du gène [166-168]. D'autre part, des niveaux élevés de glucose modifient également la localisation cellulaire de B2. En réponse au glucose, B2 est phosphorylé, subit une

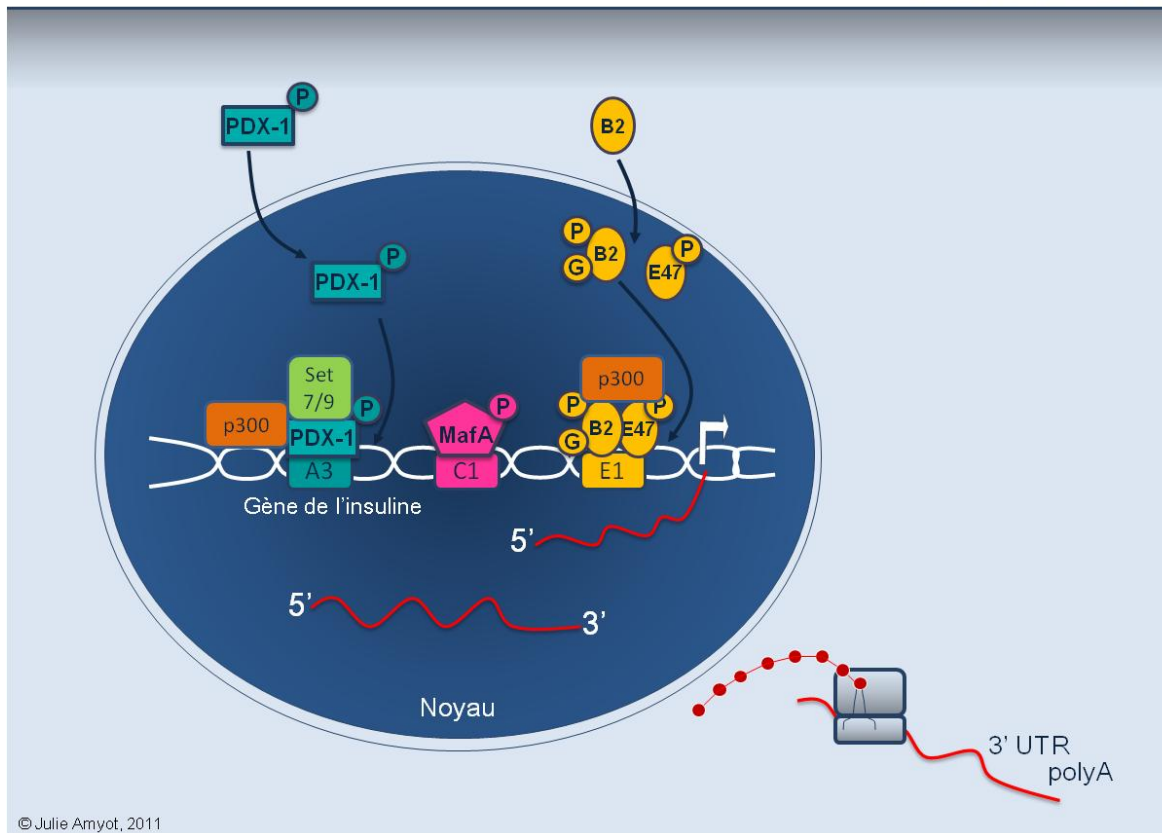
modification O-GlcNAc, migre au noyau où il hétérodimérise avec E47, favorise le recrutement de protéines coactivatrices telles que p300 et active la transcription du gène de l'insuline [169-171].

Enfin, le glucose augmente la liaison de MafA, PDX-1 et B2/E47 à la région promotrice du gène de l'insuline et favorise les interactions entre MafA, PDX-1 et B2/E47 afin d'induire une synergie d'activation de la transcription de l'insuline [156, 169, 172-176].

#### *Régulation de la stabilité de l'ARNm de l'insuline par le glucose*

La demi-vie de l'ARNm chez la plupart des eucaryotes est de 4 à 6 h. Toutefois et de façon non conventionnelle, l'ARNm de l'insuline, dont la demi-vie est de 36 h, est extrêmement stable dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Or, le glucose stabilise l'ARNm de l'insuline, en plus de ses effets sur la transcription du gène de l'insuline [177]. Ainsi, la demi-vie du messager de l'insuline augmente à 77 h en présence de concentrations élevées de glucose [177]. Les mécanismes par lesquels l'ARNm de l'insuline est stabilisé par le glucose incluent la liaison de la protéine PTB (*polypyrimidine-tract-binding*) à une séquence riche en pyrimidine [178] ainsi qu'une séquence UUGAA conservée et localisée dans la région non transcrite 3' (3'UTR; de l'anglais, 3' *untranslated region*) de l'ARNm de l'insuline [103].

Finalement, la modulation du gène de l'insuline par le glucose est induite très rapidement : une stimulation par le glucose d'une durée de 15 à 30 minutes est suffisante pour produire une réponse transcriptionnelle qui sera détectée 60 à 100 minutes plus tard [179, 180]. Toutefois et puisque le glucose stabilise l'ARNm de l'insuline, il s'avère ardu de détecter les changements précoces dans la transcription du gène de l'insuline, particulièrement une réduction de la transcription. Une façon de contourner cette limitation consiste à mesurer les niveaux pré-messagers de l'insuline qui possèdent une demi-vie très courte, de l'ordre de neuf à 30 minutes, comparativement aux niveaux messagers matures du gène de l'insuline dont la modulation en réponse au glucose ne peut qu'être détectée après 24 à 48 h [180, 181].



### Figure 11: Les différents niveaux de régulation du gène de l'insuline par le glucose.

Une augmentation des niveaux d'ARNm de MafA et de PDX-1, la phosphorylation de MafA et de PDX-1, la translocation de PDX-1 et B2 au noyau, une augmentation de la liaison de MafA et PDX-1 à la région promotrice de l'insuline ainsi que la transcription, l'épissage alternatif et la stabilité de l'ARNm de l'insuline sont tous des mécanismes activés par l'exposition des cellules  $\beta$ -pancréatiques au glucose.



### **La régulation hormonale positive**

Certaines hormones peuvent moduler la régulation du gène de l'insuline.

Le *Glucagon-like peptide 1* (GLP-1) est une hormone incrétine qui, par sa liaison à un récepteur couplé à une protéine Gs présente sur les cellules  $\beta$ , régule la biosynthèse ainsi que la sécrétion d'insuline induite par le glucose. En plus, le GLP-1 exerce une régulation positive sur la transcription du gène de l'insuline via deux mécanismes distincts [182, 183]. D'une part, le GLP-1 active directement l'élément CRE du promoteur via une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique et des niveaux cellulaires de CREB [182-184]. D'autre part, le GLP-1 augmente les niveaux d'expression de PDX-1 [185-187] et sa translocation au noyau [188].

L'hormone de croissance et la prolactine, en plus de leur fonction de régulation de la prolifération cellulaire des cellules  $\beta$ -pancréatiques, régulent également à la hausse l'activité transcriptionnelle du gène de l'insuline [189, 190].

### **La régulation négative**

L'homéostasie du glucose réside non seulement dans l'activation de l'expression du gène de l'insuline, mais également dans son inhibition. Ainsi, un certain nombre de facteurs antagonisent les effets du glucose sur la transcription du gène de l'insuline et contribuent au maintien de l'homéostasie glycémique et dans quelques cas, au développement de la dysfonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques observée dans le DT2.

### **Les répresseurs transcriptionnels**

C/EBP $\beta$  (de l'anglais, *CCAAT-enhancer-binding proteins  $\beta$* ) et c-Jun, deux facteurs de transcription de la famille des protéines portant une agrafe à leucine, répriment spécifiquement le gène de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ils interfèrent directement avec la liaison de E47 à la boîte E1 du promoteur de l'insuline en réponse au glucose [176, 191-194].

### **La régulation hormonale négative**

Certaines hormones dont l'épinéphrine, la somatostatine, le glucagon, la leptine et l'insuline elle-même sont des inhibiteurs physiologiques de la transcription du gène de l'insuline.

L'épinéphrine et la somatostatine réduisent le taux de transcription du gène de l'insuline en partie *via* une réduction de l'activité de son promoteur [195, 196] et la somatostatine réduit la stabilité de l'ARNm de l'insuline [197]. En revanche, le glucagon inhibe le gène de l'insuline via l'induction de iCER (de l'anglais, *inducible cAMP early repressor*) [154].

La leptine est une adipokine qui contrôle la balance énergétique de l'organisme et l'appétit et est présente en concentrations plasmatiques élevées chez les patients obèses. La leptine exerce des effets antagonistes à ceux du GLP-1 et réprime en conséquence l'expression du gène de l'insuline via une réduction des niveaux intracellulaires d'AMP cyclique [198-200].

Finalement, il a été rapporté que l'insuline réprime sa propre expression par un mécanisme de rétrocontrôle [201]. Toutefois, les mécanismes par lesquels l'insuline exerce un rétrocontrôle négatif restent à confirmer.

Somme toute, les mécanismes de régulation positive et négative de l'expression du gène de l'insuline assurent une biosynthèse de l'insuline optimale en fonction de la demande métabolique de sécrétion qui permet le maintien d'une homéostasie glycémique finement régulée.

### **Les défauts de régulation de l'expression du gène de l'insuline**

Plusieurs anomalies métaboliques exercent des effets délétères sur la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique, incluant un défaut de régulation du gène de l'insuline. Parmi ces anomalies, l'hyperglycémie et l'hyperlipémie chroniques observées chez les individus diabétiques entraînent des effets nocifs sur la cellule  $\beta$ , connus sous les noms de glucotoxicité et de lipotoxicité. Comme certains mécanismes entre ces deux concepts sont communs, ils sont

également désignés sous le nom de glucolipototoxicité. Ces concepts de gluco, lipo et glucolipototoxicité et leur impact sur la régulation du gène de l'insuline seront brièvement discutés dans les sections suivantes.

### **La toxicité induite par le glucose ou glucotoxicité**

L'hyperglycémie chronique affecte la sécrétion d'insuline, mais est également associée à une réduction de l'expression de son gène, chez l'homme et dans différents modèles animaux de diabète [202-208].

Plusieurs mécanismes moléculaires impliqués dans les effets délétères du glucose sur la régulation du gène de l'insuline ont été décrits. Parmi ceux-ci, une diminution de l'activité de liaison de PDX-1 et de MafA (révisé dans [54]) et une augmentation de la liaison de C/EBP $\beta$  au promoteur [176] ont été rapportés.

Additionnellement, certaines études ont rapporté un rôle pour la glycation et le stress oxydatif *via* une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (de l'anglais, *reactive oxygen species* ou ROS). L'hyperglycémie entraîne une augmentation des produits terminaux de glycation (de l'anglais, *advanced glycation end-products* ou AGE). Ces AGEs vont lier leur récepteur RAGE (de l'anglais, *receptor for advanced glycation end-products*) et entraîner une production de ROS délétère pour la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Ainsi, il a été rapporté que les AGEs diminuent les niveaux d'expression protéique de PDX-1 et l'activité du promoteur du gène de l'insuline [209, 210].

### **La toxicité induite par les acides gras ou lipotoxicité**

Tout comme pour l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie chronique contribuerait également à la dysfonction de la cellule  $\beta$  dans le DT2 [54, 211, 212].

Toutefois, la toxicité induite par les acides gras est contestée. Certains rapportent que l'exposition chronique d'acides gras entraîne un défaut dans l'expression du gène de l'insuline [213]. D'autres groupes, incluant le nôtre, rapportent plutôt un rôle délétère pour les acides gras sur l'expression du gène de l'insuline uniquement en présence de concentrations élevées de glucose, c'est-à-dire en condition de glucolipototoxicité.

### **La toxicité synergique induite par le glucose et les acides gras ou glucolipototoxicité**

Les acides gras, à court terme, potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Par contre et en présence de concentrations élevées de glucose, les acides gras non estérifiés répriment le gène de l'insuline *in vitro* et *in vivo* via des mécanismes bien distincts : la génération de céramides [214], l'inhibition de l'activité du promoteur du gène de l'insuline [214], une réduction des niveaux messagers de MafA [215], un défaut de localisation nucléaire de PDX-1 [215, 216] et une diminution de la liaison de PDX-1 et de MafA à la région promotrice du gène de l'insuline [215, 216].

Les études effectuées chez l'homme sont toutefois moins consistantes en raison des différences inhérentes aux divers protocoles employés. Néanmoins, *Carpentier et al.* ont montré qu'une infusion aiguë (90 minutes) de lipides augmente la sécrétion d'insuline qui diminue lorsque l'infusion se poursuit sur 48 h [217]. Le même groupe a montré que les patients obèses, mais non-diabétiques, présentent une susceptibilité aux effets délétères des lipides sur la sécrétion d'insuline [218], susceptibilité qui serait associée à une hyperglycémie modérée [219]. De façon importante, l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à une infusion de glucose est abolie si des lipides sont infusés simultanément avec le glucose [220].

### **La régulation du gène de l'insuline dans le diabète de type 2 chez l'Homme**

Sous des conditions physiologiques, il existe une coordination à la fois de la sécrétion et la biosynthèse de l'insuline. Ainsi, des mécanismes se mettent rapidement en place afin de refaire le plus efficacement possible les réserves d'insuline au sein des granules sécrétoires suite à une stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose (révisé dans [107]). Des études longitudinales menées chez l'homme ont montré que la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique se détériore avec le temps suite au diagnostic (Figure 4). L'origine de la dysfonction de la cellule  $\beta$  reste encore à confirmer. Toutefois, un rôle possible pour la dérégulation du gène de l'insuline se précise de plus en plus.

Les premières évidences de l'importance du gène de l'insuline dans le développement du DT2 proviennent d'études effectuées initialement dans différents modèles animaux et dont les résultats ont été validés ou restent à confirmer chez l'Homme.

Une première étude illustrant le rôle du gène de l'insuline dans le développement du DT2 a été effectuée par Leibowitz et al. [207]. Effectuée chez *Psammomys obesus* (*P. obesus*), un modèle animal de DT2 induit par la diète, cette étude a évalué l'importance de la régulation du gène de l'insuline en réponse au glucose dans la production de l'insuline [207]. Une des caractéristiques des îlots de Langerhans chez *P.obesus* réside dans l'effondrement rapide du contenu en insuline des cellules  $\beta$  suite à une hyperglycémie. Ainsi, des îlots de Langerhans de *P. obesus* et de rat Wistar normaux ont été isolés puis exposés à des doses croissantes de glucose pendant 24h. Alors que les niveaux messagers de l'insuline étaient rapidement induits par l'exposition au glucose, les îlots isolés de *P. obesus* démontraient une incapacité à augmenter les niveaux messagers de l'insuline. Ainsi après 24h, les réserves d'insuline dans les granules sécrétoires des îlots isolés de rat Wistar étaient refaites, inversement aux réserves des îlots de *P. obesus*, qui démontraient une incapacité à induire la biosynthèse de l'insuline afin de remplacer les réserves d'insuline. Cette étude démontre qu'une régulation inappropriée du gène de l'insuline par le glucose entraîne une déplétion des réserves d'insuline dans les granules sécrétoires des cellules  $\beta$ -pancréatiques et peut contribuer à l'apparition d'un diabète induit par la diète.

Une seconde étude, effectuée par notre groupe, a suggéré qu'une altération de la régulation du gène de l'insuline précède le développement de la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique chez les rongeurs [216]. Dans un modèle d'infusions cycliques de glucose et de lipides chez le rat, modèle qui reproduit l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie caractéristiques des individus diabétiques de type 2, nous avons observé que l'excès de glucose et de lipides entraîne une inhibition de l'expression du gène de l'insuline ainsi qu'une réduction du contenu en insuline, sans toutefois affecter la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cette observation suggère que l'inhibition du gène de l'insuline suite à l'exposition de conditions « diabétogènes » représente un défaut précoce pouvant contribuer à la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique dans le DT2.

Très récemment, Yang et al. ont rapporté une association entre les niveaux de l'ARNm de l'insuline et le DT2 [203]. Dans cette étude, ils ont montré que les îlots isolés post-mortem chez des patients diabétiques de type 2, dont la sécrétion d'insuline induite par le glucose est largement affectée, présentent une augmentation de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène de l'insuline qui corrèle négativement avec les niveaux messagers de l'insuline. Ainsi, chez ces patients diabétiques, les niveaux de l'ARNm de l'insuline sont diminués, dû à une augmentation de la méthylation de l'ADN du promoteur de l'insuline et entraîne un défaut de sécrétion d'insuline. Cette observation n'est pas banale puisqu'elle rapporte un défaut de régulation du gène de l'insuline présent chez les individus diabétiques qui contribuerait au défaut sécrétoire de la cellule  $\beta$ -pancréatique, élément important de la pathophysiologie du DT2.

Finalement, et dans un autre ordre d'idées, des mutations ponctuelles dans le gène de l'insuline humain, au nombre de trois, ont été identifiées [221-223]. Ces mutations d'une seule paire de bases sont localisées dans des régions cruciales codant pour les chaînes A et B de l'insuline, affectent la capacité de liaison de l'insuline sur son récepteur et sont associées à un syndrome hyperinsulinémique modéré [224]. Ces mutations ponctuelles dans le gène de l'insuline, qui entraînent un défaut dans l'action de l'insuline, démontrent l'importance de la régulation du gène de l'insuline dans le développement du DT2 chez l'Homme.

## Chapitre 4 – Le stress du réticulum endoplasmique

« [...] what makes a  $\beta$ -cell a  $\beta$ -cell, i.e., its enormous capacity to synthesize and secrete insulin, is also its Achilles heel [...] »

- Décio L. Eizirik

### Généralités

Le RE est un système membranaire prédominant dans la cellule eucaryote, qui représente à lui seul près de 50% de toutes les membranes cellulaires. Il s'agit d'un réseau, ou *réticulum*, de vésicules interconnectées qui est hautement dynamique. Le RE remplit maintes fonctions. Avec une concentration en ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) deux à trois fois plus élevée que le cytoplasme, le RE possède un rôle important de réserve du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule. Ce gradient est généré par la pompe SERCA (de l'anglais, *sarco(end)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*), qui pompe le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE et l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $\text{INS}(1,4,5)\text{P}_3$ ) qui l'exporte dans le cytoplasme [225]. Toutefois, la fonction principale du RE réside dans la synthèse des protéines et des lipides. Les zones riches en ribosomes forment le RE rugueux (RER), alors que les zones qui en sont dépourvues forment le RE lisse (REL). Ce dernier est le siège de la synthèse et du métabolisme des acides gras et des phospholipides, et abonde donc principalement dans les tissus où le métabolisme des lipides est élevé. En revanche, le RE rugueux est, tel qu'indiqué par son nom, pourvu de ribosomes accolés à sa paroi (d'où l'aspect rugueux que l'on peut apercevoir en microscopie électronique) et représente le site de synthèse de certaines protéines membranaires et d'organelles, et de presque toutes les protéines de sécrétion. Ainsi, le RER est très abondant dans les cellules spécialisées de sécrétion telles que les cellules acineuses du pancréas qui produisent les enzymes de la digestion, les plasmocytes qui synthétisent les anticorps et, bien entendu, les cellules  $\beta$ -pancréatiques qui sécrètent l'insuline.

## Le stress du RE

Par son environnement riche en protéines chaperonnes et en enzymes spécialisées dans le repliement des protéines, le RE est un carrefour important où les protéines subissent un contrôle strict de la qualité. À cet effet, la lumière du RE correspond au siège du repliement des protéines et de certaines modifications post-traductionnelles. La participation de plusieurs chaperonnes moléculaires telle que BIP, mais également d'enzymes de glycosylation et de foldases [226] est essentielle au repliement adéquat des protéines, à leur export hors de la lumière du RE en passant par le contrôle de la qualité des protéines nouvellement formées. Le RE est très sensible à toute altération de sa fonction, comme par exemple l'accumulation de protéines mal ou non repliées et la déplétion de  $\text{Ca}^{2+}$  qui causent un stress dans le RE.

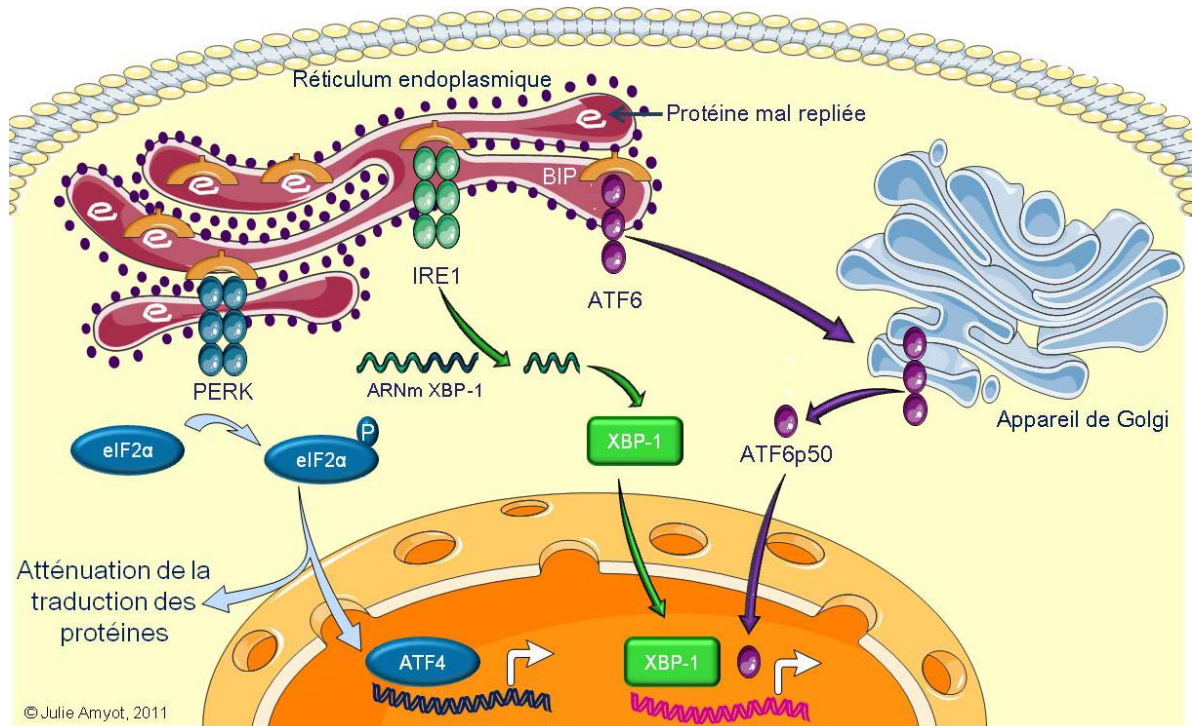
## La réponse UPR

La présence d'un stress dans le RE entraîne le déclenchement d'une réponse physiologique appelée réponse UPR (de l'anglais, *unfolded protein response*) [227]. Les objectifs de la réponse UPR sont les suivants : (1) ralentir l'arrivée de nouvelles protéines dans le RE afin de prévenir une accumulation additionnelle de protéines mal repliées; (2) synthétiser de nouvelles chaperonnes et foldases pour stimuler le processus de repliement; (3) favoriser l'export des protéines irréversiblement mal repliées et subséquemment leur dégradation dans le protéasome; et (4) déclencher l'apoptose de la cellule si tous les processus précédents ont échoué [228].

La réponse UPR est complexe (Figure 12). Elle affecte d'une part la traduction des protéines, et d'autre part, elle augmente la transcription de gènes impliqués dans le repliement des protéines. La réponse UPR implique l'activation de trois protéines localisées dans la membrane du RE et qui détectent le stress du RE : PERK (de l'anglais, *PKR-like kinase*), IRE1 (de l'anglais, *Inositol Requiring Enzyme 1*) et ATF6 (de l'anglais, *Activating Transcription Factor 6*). Ces protéines transmembranaires, à l'état basal, interagissent avec la chaperonne moléculaire BIP qui les maintient dans un état inactif. L'accumulation de



protéines mal repliées dans la lumière du RE entraîne le détachement de BIP qui rejoint les protéines mal repliées afin de favoriser leur repliement adéquat dans la lumière du RE. C'est précisément la dissociation de BIP qui déclenche l'activation de la réponse UPR. L'activation des voies de la réponse UPR sera discutée dans les paragraphes suivants, avec une attention tout particulière pour la protéine ATF6.



**Figure 12: La réponse UPR.**

L'interaction de BIP avec PERK, IRE1 et ATF6 prévient la signalisation par la réponse UPR. Lorsque s'accumulent des protéines mal repliées dans la lumière du RE, BIP se détache des trois protéines, entraînant leur activation. PERK est activé par homodimérisation et autophosphorylation, et phosphoryle à son tour eIF2 $\alpha$ , qui atténue la traduction des protéines et induit la transcription préférentielle d'ATF4. La dimérisation et l'autophosphorylation de IRE1 entraînent l'activation de son activité ribonucléase qui lui permet de cliver XBP-1 en sa forme épissée (XBP-1s). Une fois relâché de BIP, ATF6 migre à l'appareil de Golgi où il sera clivé par les protéases S1P et S2P, produisant un facteur de transcription actif. ATF4, XBP-1s et ATF6 régulent à la hausse plusieurs gènes impliqués dans le repliement des protéines.

## **L'activation de la kinase PERK**

L'établissement d'un stress du RE déclenche la dimérisation et l'autophosphorylation en *trans* de la protéine PERK. L'activation de cette kinase entraîne ensuite la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  du facteur eucaryotique d'initiation de la traduction (eIF2 $\alpha$ ; de l'anglais *eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* ) et par conséquent, inhibe la synthèse des protéines dans le but d'en réduire la demande fonctionnelle dans le RE. L'activation de la voie PERK inhibe la synthèse protéique générale, mais quelques protéines, par exemple ATF4 (de l'anglais, *activating transcription factor 4*), possèdent un cadre de lecture ouvert (ORF; de l'anglais, *open reading frame*) dans la partie 5' non traduite, qui leur permet d'être traduites plus efficacement [229]. ATF4, un facteur de transcription de la famille des ATFs, active non seulement plusieurs gènes impliqués dans le transport des acides aminés, la biosynthèse de glutathion et dans la résistance au stress oxydatif [230], mais également des gènes proapoptotiques tel que CHOP (de l'anglais, *CEBP homologous protein*) [231].

## **L'activation de la protéine IRE1**

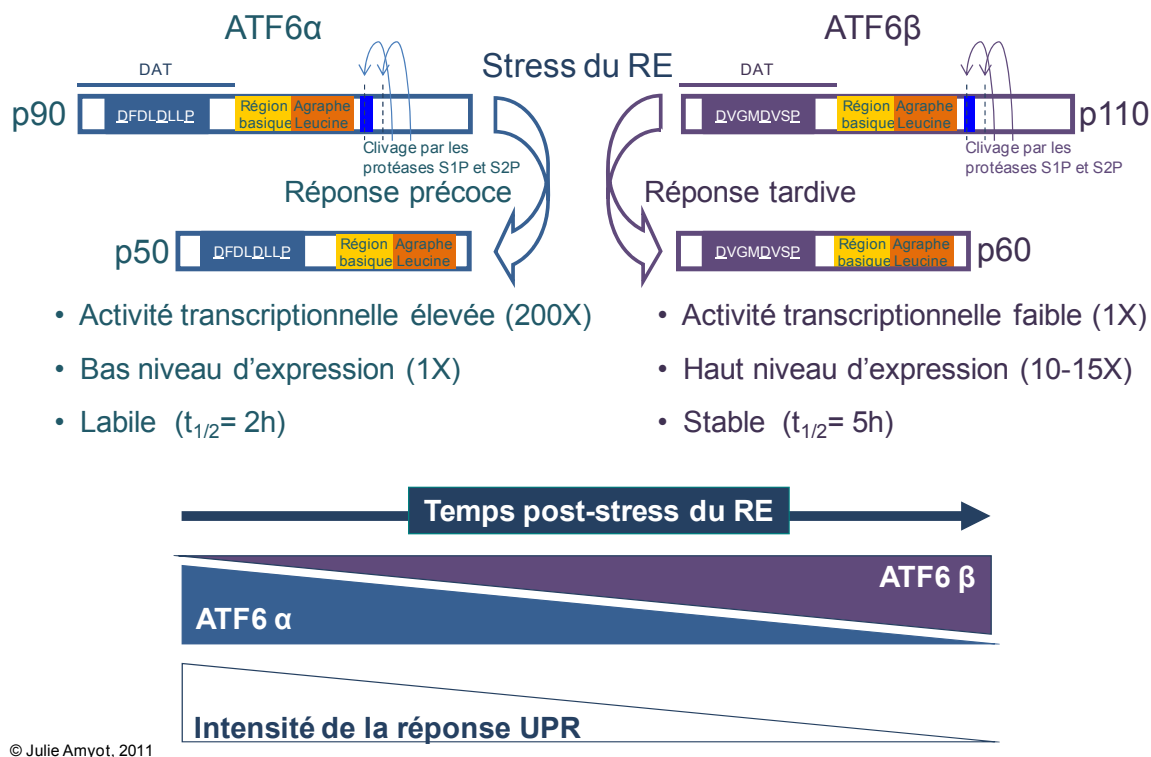
La protéine IRE1 possède une activité sérine/thréonine kinase et endoribonucléase dans sa partie cytoplasmique. Tout comme PERK, l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière de RE entraîne l'activation d'IRE1 par un processus de dimérisation et d'autophosphorylation en *trans*. Par contre, les étapes subséquentes diffèrent largement et impliquent l'activité endoribonucléase de IRE1 qui assure l'épissage alternatif du facteur de transcription XBP-1 (de l'anglais, *X-box binding protein 1*). La forme épissée de XBP-1 (XBP-1s; de l'anglais *spliced XBP-1*) migre au noyau et active divers gènes impliqués entre autres dans la maturation et le repliement des protéines [232, 233].

## **L'activation du facteur de transcription ATF6**

Le facteur de transcription ATF6 possède deux isoformes exprimées de façon ubiquitaire dans la membrane du RE, ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$ , et synthétisées respectivement sous la forme de protéines de 90 et 110 kDa [234-236]. En réponse à un stress du RE, la dissociation de

BIP entraîne l'exposition de deux signaux d'export du RE qui permettent la migration d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à l'appareil de Golgi, où elles seront respectivement clivées en protéines de 50 et 60 kDa, suite à l'action séquentielle des protéases S1P et S2P (de l'anglais, *site-1-protease* et *site-2-protease*) [234, 237]. Cette protéolyse intramembranaire régulée contribue à la translocation d'ATF6 $\alpha$ -p50 et d'ATF6 $\beta$ -p60 au noyau [234, 235] ce qui leur permet d'assurer la régulation transcriptionnelle de chaperonnes moléculaires afin d'augmenter la capacité de repliement et de réduire l'agrégation de protéines dans le RE [234, 235]. ATF6, toutes isoformes confondues, est une protéine de la même famille que les facteurs de transcription ATF et CREB, soit une protéine portant une agrafe à leucine. Par son interaction avec le facteur de transcription NF-Y (de l'anglais, *nuclear factor Y*) et sa liaison subséquente à l'élément de réponse du stress du RE, CCAATN<sub>9</sub>CCACG, ATF6 régule à la hausse un certain nombre de gènes impliqués dans le contrôle de la qualité [238] et le repliement des protéines telles que BIP, GRP94 (de l'anglais, *glucose-regulated protein 94*) et PDI [235, 239, 240]. ATF6 peut également se lier à un élément consensus cis-régulateur de la réponse UPR (G)(G)TGACGTG(G/A), où les nucléotides entre parenthèses sont plus ou moins conservés [241, 242].

ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$  possèdent des caractéristiques propres à leur isoforme (Figure 13). D'une part et du point de vue de la topographie de leurs domaines, une séquence de huit acides aminés située dans le domaine d'activation transcriptionnel diffère entre ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$  et implique des différences majeures au niveau de leur activité de transcription. Ainsi, l'isoforme  $\alpha$  de la protéine ATF6 possède une activité transcriptionnelle 200 fois plus élevée que l'isoforme  $\beta$ . D'autre part, les niveaux d'expression protéiques diffèrent entre ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$ . Quoique tous deux ubiquitaires, ATF6 $\beta$  serait 10 à 15 fois plus abondant dans la cellule et presque deux fois plus stable qu'ATF6 $\alpha$ . Enfin, l'expression temporelle d'ATF6 $\alpha$  suivrait l'intensité de la réponse UPR, alors qu'ATF6 $\beta$  serait exprimé plus tard, lorsque s'atténue la réponse UPR. ATF6 $\beta$  serait de surcroît impliqué dans un mécanisme de régulation temporelle ainsi que de l'intensité de la réponse UPR *via* la répression des niveaux messagers d'ATF6 $\alpha$  [243, 244].



**Figure 13: Les différences fonctionnelles d'ATF6α et d'ATF6β.**

Le domaine d'activation transcriptionnel (DAT) d'ATF6α diffère de celui d'ATF6β par une séquence de huit acides aminés, dont trois sont conservés entre les deux isoformes (acides aminés soulignés). ATF6α possède une activité transcriptionnelle élevée et est exprimé tôt au cours de la réponse UPR. À l'inverse, ATF6β apparaît plus tard dans le délai de la réponse UPR, est 10 à 15 fois plus exprimé et deux fois plus stable, mais son activité transcriptionnelle demeure 200 fois plus faible qu'ATF6α. Adapté de [243].

## L'apoptose induite par la réponse UPR

En dépit de l'activation de ses voies de signalisation, il arrive que la réponse UPR ne parvienne pas à résoudre le stress du RE. Dans ce cas précis, l'apoptose est déclenchée *via* deux mécanismes. D'une part, ATF4 de la voie PERK régule à la hausse l'expression de CHOP qui, par l'inhibition de la protéine antiapoptotique Bcl-2 (de l'anglais, *B-cell lymphoma 2*), favorise la mort cellulaire programmée de la cellule [231]. D'autre part, IRE1 forme un complexe trimérique avec TRAF-2 (de l'anglais, *TNF receptor-associated factor*

2) et ASK-1 (de l'anglais, *apoptosis signal regulating kinase 1*) et active la voie JNK (de l'anglais, *Jun N-terminal kinase*), qui conduit à l'apoptose [245, 246]. Finalement, les protéines proapoptotiques Bax (de l'anglais, *Bcl-2-associated X protein*) et Bak (de l'anglais, *Bcl-2 homologous antagonist killer*) subissent un changement conformationnel en présence d'un stress du RE persistant, et entraînent un efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol [247]. Le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré active la caspase-12, conduisant à l'apoptose de la cellule [248].

## **Le stress du RE et le diabète chez l'Homme**

Le stress du RE est au cœur de plusieurs pathologies dégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) [249, 250], de cancers [251, 252] et de pathologies métaboliques (obésité, résistance à l'insuline) [253, 254]. Le diabète n'échappe pas à ce constat où la fonction des cellules  $\beta$  est altérée par le stress du RE.

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques ont un RE très développé, conséquence de leur fonction spécialisée de production d'insuline en réponse au glucose et aux nutriments. Cette caractéristique les rend très susceptibles au stress du RE. Le repliement adéquat de l'insuline s'avère crucial et le cas échéant, induit un diabète. Un exemple bien connu réside dans un défaut génétique rencontré chez l'Homme dû à une mutation du gène de l'insuline, et préalablement identifié dans la souris Akita [255-257]. Cette mutation de l'insuline (Cys96  $\rightarrow$  Tyr) empêche la formation d'un des deux ponts disulfure reliant les chaînes A et B normalement présents dans la proinsuline et conduit à l'accumulation de l'hormone mal repliée dans la lumière du RE [256]. Les souris Akita deviennent diabétiques suite à la perte des cellules  $\beta$ -pancréatiques causée par un stress du RE.

D'autres évidences qui rapportent un rôle pour le stress du RE dans le développement d'un diabète proviennent de rares désordres génétiques. Une mutation dans le gène codant pour la kinase PERK est responsable du syndrome Wolcott-Rallison, une forme rare de diabète monogénique néonatal [258]. Un autre syndrome, le syndrome Wolfram, est également associé à un diabète apparaissant tôt dans l'enfance [259]. Ce désordre génétique correspond à une variation génétique dans le gène codant pour la protéine WFS1, soit un

canal calcique situé dans la membrane du RE, et a été associé au DT2 [260, 261]. En outre, ATF6 a été identifié comme gène de susceptibilité du DT2 dans des cohortes néerlandaises et d'Indiens Pima [262, 263]. Enfin, une mutation ponctuelle par substitution dans le gène de l'insuline qui empêche la formation de ponts disulfures dans la proinsuline est associée à un stress du RE et se caractérise par un diabète néonatal [264].

D'autres évidences directes rapportent la présence d'un stress du RE dans les îlots de Langerhans de patients diabétiques. Non seulement la taille du RE des cellules  $\beta$ -pancréatiques de ces patients est deux fois plus élevée que la taille observée dans des îlots sains, témoignant de la présence d'un stress, mais en plus, l'expression protéique de plusieurs marqueurs du stress du RE (BIP, CHOP) est augmentée dans ces îlots diabétiques [71, 265, 266].

## Chapitre 5 – L'immunité innée

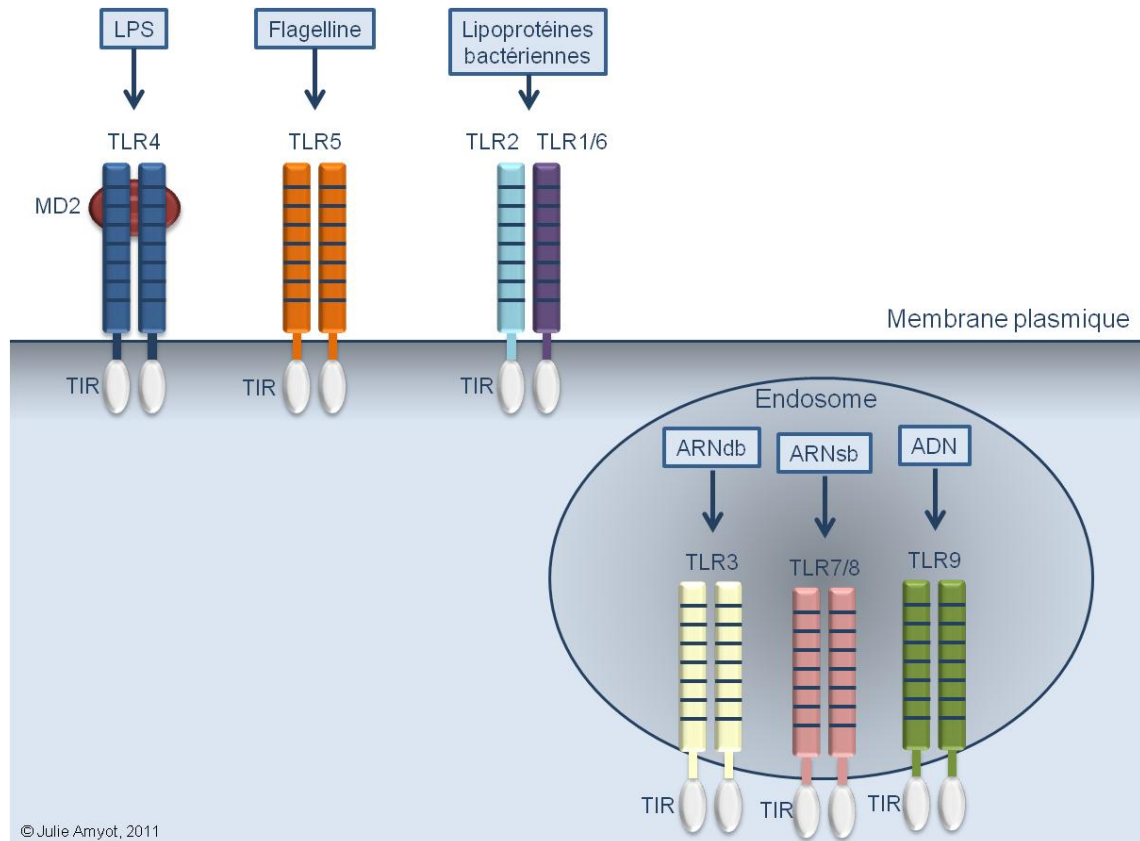
### Généralités

Le système immunitaire a deux composantes : une composante naturelle et une composante acquise. L'immunité acquise, ou adaptative, est caractérisée par un haut degré de spécificité et par sa remarquable propriété de mémoire. Elle dépend des lymphocytes T et B qui sont spécifiques pour des antigènes particuliers. Ce système implique la sélection clonale d'anticorps produits par les plasmocytes, très efficace dans la destruction des agents pathogènes envahisseurs, mais qui impose un délai de réponse de quatre à sept jours. À l'opposé, le système immunitaire naturel, ou inné, correspond à l'ensemble des mécanismes de résistance qui possèdent une reconnaissance très large des agents pathogènes. Assurée par les cellules phagocytaires telles les macrophages et les cellules dendritiques, l'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme suite à l'exposition de l'hôte à un agent infectieux. Elle comprend des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques (PRRs; de l'anglais *pathogen-recognition receptors*) spécialisés dans la détection de motifs moléculaires associés aux organismes pathogènes (PAMP; de l'anglais, *pathogen-associated molecular pattern*) [267]. La liaison des pathogènes par ces récepteurs entraîne des réponses très rapides et opérationnelles sans le délai imposé par l'expansion clonale requis dans l'immunité acquise. Initialement identifiés chez la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* [268], les récepteurs assurant ces fonctions ont hautement été conservés au cours de l'évolution et connus sous le nom de récepteurs Toll. Les protéines homologues ont été identifiées chez l'Homme et nommées récepteur de type Toll (TLR; de l'anglais *Toll-like receptor*). Suite à la découverte des TLRs, plusieurs classes de PRRs cytosoliques ont été identifiées, incluant les récepteurs de type RIG-I (RLRs; de l'anglais, *retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors*) et les récepteurs de type Nod (NLRs; de l'anglais, *NOD-like receptors*) [269]. Ces récepteurs seraient principalement impliqués dans la reconnaissance intracellulaire d'acides nucléiques et de peptidoglycans bactériens [269].

## Les récepteurs de type Toll

De nos jours, 10 et 12 membres fonctionnels de la famille des récepteurs de type Toll ont respectivement été identifiés chez l'Homme et chez la souris. Les motifs moléculaires associés aux microorganismes détectés par les TLRs incluent les lipides, les lipoprotéines, les protéines et les acides nucléiques dérivés des bactéries, virus, parasites et champignons (Figure 14). Certains TLRs sont exprimés à la surface cellulaire, soient TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6, alors que d'autres TLRs, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, sont exprimés dans les endosomes [270]. Tous comprennent un ectodomaine composé de répétitions riches en leucine et qui médie la reconnaissance des PAMPs, une région transmembranaire et un domaine cytosolique TIR (de l'anglais, *Toll-IL-1 receptor*) responsable de la transmission du signal. Cinq protéines adaptatrices, responsables de la spécificité de la signalisation en aval des TLRs, expriment également un domaine TIR: MyD88 (de l'anglais, *myeloid-differentiation primary-response gene 88*), MAL (de l'anglais, *MyD88-adaptator-like*) ou TIRAP, TRIF (de l'anglais, *TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN $\beta$* ), TRAM (de l'anglais, *TRIF-related adaptator molecule*) et SARM (de l'anglais, *sterile  $\alpha$  and armadillo-motif-containing protein*) [271, 272]. L'activation de la voie Toll sera discutée en détail en employant à titre d'exemple la signalisation initiée par TLR4 soit l'unique voie Toll dont il sera question dans cette thèse.





**Figure 14: Motifs moléculaires associés aux pathogènes reconnus par les différents TLRs.**

Les lipopolysaccharides, la flagelline et les lipoprotéines bactériens sont reconnus respectivement par les récepteurs de surface membranaires TLR4, TLR5 et TLR2/1/6. À l'opposé, l'ARN double brin (ARNdb), l'ARN simple brin (ARNsb) et l'ADN sont reconnus par les récepteurs endosomiaux TLR3, TLR7/8 et TLR9, respectivement.

### **Le récepteur de type Toll 4**

Le récepteur de type Toll 4 est exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène, mais également à la surface de cellules non immunes telles que les adipocytes [273], les myocytes [274] et les cellules  $\beta$ -pancréatiques [274-276]. Bien que le récepteur TLR4 peut lier certaines protéines virales, l'acide hyaluronique, des protéines de choc thermique (HSP; de l'anglais *heat-shock protein*), le fibrinogène et des fragments d'héparane sulfate, la fonction principale de ce récepteur réside dans la reconnaissance des lipopolysaccharides

(LPS) présents à la surface des bactéries à Gram négatif [277]. Ces LPS sont très immunogènes et sont responsables du choc septique. Leur structure, illustrée dans la Figure 15, comprend trois parties principales : un polysaccharide distal (antigène O), un « core » d'oligosaccharides et un domaine hydrophobique (lipide A). L'antigène O, attaché au « core », est composé de plusieurs répétitions de deux trisaccharides et d'un disaccharide [278] et confère le sérotype de la souche bactérienne. Le « core » est quant à lui constitué d'une courte chaîne d'oligosaccharides qui relie le lipide A à l'antigène O [278]. C'est la partie lipidique des LPS qui est hautement immunogène. Le lipide A, une endotoxine, est un phospholipide à base de glucosamine auquel sont rattachés six chaînes d'acides gras [278, 279].



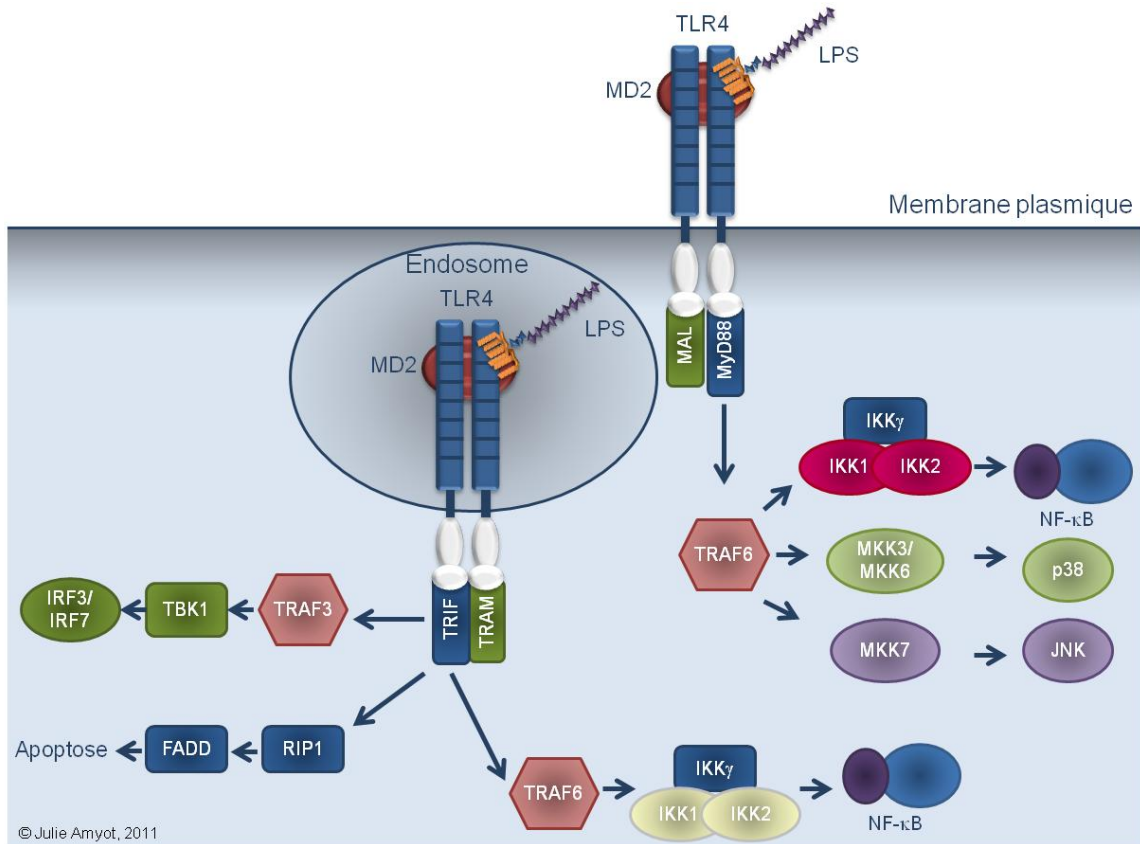
© Julie Amyot, 2011

### Figure 15: La structure des lipopolysaccharides.

Les LPS sont composés de trois régions distinctes : l'antigène O, le « core » et le lipide A, hautement immunogène.

Cinq des six chaînes d'acides gras du lipide A sont associées à MD2 (de l'anglais, *myeloid differentiation 2*), qui forme un complexe avec le récepteur TLR4. La chaîne d'acides gras libre sera reconnue par TLR4 et permettra l'homodimérisation du récepteur [280, 281]. Des protéines accessoires additionnelles, soient la protéine LBP (de l'anglais, *LPS-binding protein*) et le corécepteur CD14 (de l'anglais, *cluster of differentiation 14*), sont également impliquées dans la liaison des LPS au récepteur TLR4 [282]. En effet, la protéine LBP est une protéine plasmatique qui, tel qu'indiqué par son nom, lie les LPS circulants. CD14 lie la protéine LBP et présente le complexe LBP-LPS au complexe TLR4-MD2. Les dimères de TLR4 seraient préassemblés dans un complexe de faible affinité à l'état basal [272]. Or, la liaison des LPS entraîne un changement de conformation qui rapproche les domaines

TIR des deux monomères TLR4, créant ainsi une plateforme permettant le recrutement des protéines adaptatrices MAL et MyD88, responsables de l'activation des voies dépendantes de MyD88 ainsi que les protéines adaptatrices TRAM et TRIF, responsables de l'activation des voies dépendantes de TRIF (figure 16).



**Figure 16: La signalisation intracellulaire induite par TLR4.**

Les LPS se lient au complexe TLR4-MD2 et entraînent un changement de conformation dans les domaines TIR du récepteur. Ceci crée une plateforme de signalisation qui permettra le recrutement des protéines adaptatrices MAL et MyD88 ainsi que les protéines adaptatrices TRAM et TRIF. Alors que l'activation de la voie MyD88 entraînera l'activation des voies NF- $\kappa$ B, p38 et JNK, la voie TRIF activera plutôt les voies NF- $\kappa$ B, IRF3 et IRF7, ainsi que l'apoptose. Adapté de [272, 283].

### Voies dépendantes de MyD88

Le recrutement de MAL au complexe TLR4-MD2 entraîne l'engagement subséquent de MyD88 qui active les kinases IRAK1 (de l'anglais, *IL-1R-associated kinase 1*) et IRAK4 (de l'anglais, *IL-1R-associated kinase 4*). Une des cibles connues de IRAK1 qui est phosphorylé par IRAK4, est TRAF6 (de l'anglais, *tumour necrosis-factor (TNF)-receptor-associated factor 6*), dont le recrutement entraîne la formation d'une plateforme composée de TAK1 (de l'anglais, *transforming-growth-factor- $\beta$ -activated kinase 1*), de TAB1/ 2 (de l'anglais, *TAK-binding protein 1/2*) et du complexe d'ubiquitination UEV1A/UBC13. Cette plateforme permet la phosphorylation de IKK $\beta$  (de l'anglais, *inhibitor of  $\kappa$ B ( $I\kappa$ B) kinase  $\beta$* ) et MKK6 (de l'anglais, *mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 6*) qui sont respectivement responsables de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (de l'anglais, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ainsi que des voies MAPKs p38 et JNK [272]. Alors que les voies p38 et JNK participeraient à la stabilité des ARNm, la voie NF- $\kappa$ B induirait non seulement une régulation à la hausse de cytokines proinflammatoires, mais également la transcription des gènes C/EBP $\delta$  et I $\kappa$ B $\zeta$ , qui agissent à titre de coactivateurs pour l'induction d'IL-6 et d'IL-12 [284, 285] et d'ATF3, qui restreint l'activité de NF- $\kappa$ B via le recrutement de l'histone déacétylase HDAC1 [286]. Il est important de mentionner que tous les TLRs, à l'exception de TLR3, peuvent activer ces voies dépendantes de la protéine adaptatrice MyD88 [272]. Également, la voie NF- $\kappa$ B possède deux vagues d'activation en réponse à la signalisation par le récepteur TLR4. La voie MyD88 serait responsable de la première vague d'activation [287, 288].

### Voies dépendantes de TRIF

Tout comme MyD88, la protéine adaptatrice TRIF est responsable du recrutement de TRAF6 et participe à la deuxième vague d'activation de la voie NF- $\kappa$ B [287, 288]. Toutefois, l'engagement de TRIF mène également à l'activation de TRAF3 (de l'anglais, *tumour necrosis-factor (TNF)-receptor-associated factor 3*), TBK1 (de l'anglais, *tumour-necrosis-factor-receptor (TNFR)-associated factor (TRAF)-family-member-associated NF-*

*κB-activator-binding kinase 1*) puis à l'activation de IRF3/7 (de l'anglais, *interferon-regulatory factor 3/7*). Ces derniers induisent non seulement la transcription d'interféron  $\beta$  (IFN $\beta$ ), impliqué dans la réponse immunitaire innée anti-virale et une activité autoproliérative, mais également la production du facteur de nécrose des tumeurs (TNF- $\alpha$ ; de l'anglais, *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) [287]. Finalement, une troisième voie dépendante de TRIF conduit à l'apoptose *via* l'activation de RIP1 (de l'anglais, *receptor-interacting protein 1*) et FADD (de l'anglais, *FAS-associated death domain*) [272].

Somme toute, les voies activées en aval de TLR4, quelles soient dépendantes de MyD88 ou de TRIF, mènent à la transcription de molécules pro-inflammatoires, ainsi que d'autres effecteurs de la réponse immunitaire innée, la plupart étant également impliqués dans la pathogenèse du DT2 [289].

## **Le diabète, un état inflammatoire chronique de faible intensité**

Les premières évidences suggérant la présence d'un état inflammatoire au cours du diabète remontent à il y a plus de 100 ans lorsque l'utilisation de doses élevées de salicylate de sodium a entraîné une réduction de la glycémie, de la glycosurie ainsi que de la fréquence des injections d'insuline chez des patients diabétiques [290-292]. Toutefois, ce fût la découverte du rôle central qu'exerce le TNF- $\alpha$  dans la résistance à l'insuline dans les années 90 qui propulsa littéralement l'idée qu'un état inflammatoire de faible intensité caractérisait l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète [293-295]. En effet, plusieurs médiateurs de l'inflammation sont présents en faibles concentrations, mais à l'état chronique chez les patients diabétiques, d'où le statut inflammatoire chronique de faible intensité chez ce groupe d'individus. Quelques études prospectives et transversales ont rapporté des niveaux circulants élevés de protéines de phase aiguë (fibrinogène, haptoglobine, protéine C-réactive), de cytokines et chimiokines (TNF- $\alpha$ , interleukine 6 (IL-6), interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), MCP-1; de l'anglais monocyte chemoattractant protein 1) et une élévation du décompte leucocytaire [296-299].

Cet état inflammatoire persistant serait dû, en partie du moins, à l'infiltration de macrophages dans les tissus responsables de la résistance à l'insuline, ainsi que dans les

îlots de Langerhans. À titre d'exemple, environ 15% du tissu adipeux chez la souris non obèse est infiltré de macrophages, comparativement à approximativement 60 % chez la souris obèse [300]. Les macrophages possèdent un caractère versatile et plastique ce qui leur permet d'adapter la réponse inflammatoire à leur environnement. Or, l'état d'activation de ces macrophages est différent selon la présence ou non d'obésité. Alors que chez la souris non obèse, les macrophages ont un phénotype M2, donc anti-inflammatoire, ont une dispersion uniforme au sein du tissu adipeux et sécrètent de l'IL-10 (interleukine 10), une cytokine anti-inflammatoire qui potentialise la signalisation de l'insuline. À l'inverse, les macrophages infiltrant le tissu adipeux chez la souris obèse sont proinflammatoires (phénotype M1) et leur dispersion est telle qu'ils entourent les adipocytes en processus de mort de cellulaire, formant des structures en couronne (de l'anglais, *crown-like structures*) [301, 302]. Ces macrophages sécrètent une pléiade de cytokines pro-inflammatoires qui induisent la résistance à l'insuline via l'activation des voies de l'inflammation JNK et NF- $\kappa$ B [303]. L'infiltration de macrophages dans les hépatocytes et le tissu musculaire étant beaucoup moins étudiée, quelques articles seulement font référence à un rôle pour ces cellules présentatrices d'antigène dans ces tissus [304, 305]. Enfin, la présence de macrophages dans les îlots de Langerhans de patients diabétiques et dans les îlots isolés de rat et de souris diabétiques n'a été rapportée que récemment [306, 307]. Ces macrophages sécrèteraient des cytokines qui, par leur action paracrine sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques environnantes, participeraient à la défaillance de ces dernières et en conséquence, à une diminution de la sécrétion d'insuline [308].

La production de cytokines pro-inflammatoires, plus particulièrement l'IL-1 $\beta$ , dans les îlots de Langerhans ne provient pas seulement des macrophages ayant infiltré le tissu pancréatique endocrine, mais provient également des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Effectivement, la production d'IL-1 $\beta$  par les cellules  $\beta$  d'individus diabétiques a été rapportée [309]. En réponse à des concentrations élevées de glucose, les cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots isolés sécrètent l'IL-1 $\beta$  ce qui entraîne l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, une régulation à la hausse de FAS et une dysfonction de la cellule  $\beta$  [309]. D'autre part, il a également été montré que la production d'IL-1 $\beta$  par les îlots entraîne des effets opposés

sur les cellules pancréatiques. Alors que l'IL-1 $\beta$ , en absence de glucose, active plusieurs kinases qui s'associent à la région promotrice du gène de l'insuline et régule à la hausse son expression, l'IL-1 $\beta$ , en présence de concentrations élevées de glucose, favorise le recrutement de C/EBP $\beta$  et l'activation de c-jun qui se lient au promoteur de l'insuline et en répriment son activité transcriptionnelle [310]. Récemment, un mécanisme par lequel les cellules  $\beta$ -pancréatiques sécrètent de l'IL-1 $\beta$  en réponse au glucose a été identifié. La production de l'IL-1 $\beta$  est finement régulée et l'activation de sa forme précurseur en sa forme active implique son clivage par la caspase-1. Or, la maturation de l'IL-1 $\beta$  est contrôlée par un complexe multiprotéique qui active la caspase-1, appelé inflammasome. L'inflammasome NLRP3, le mieux caractérisé à ce jour, comprend la protéine adaptatrice ASC (de l'anglais, *apoptosis-associated specklike*), la caspase-1 et NLRP3, un membre des NLRs (révisé dans [311]). En effet, il a été rapporté que des concentrations élevées de glucose entraînent une augmentation du stress oxydatif menant à l'activation de l'inflammasome NLRP3 et de la caspase-1 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques [312]. Une fois activée, la caspase-1 clive la pro-IL-1 $\beta$  en sa forme mature, et l'IL-1 $\beta$  sécrétée affecte la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique d'une manière autocrine ou paracrine. Également, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B par l'IL-1 $\beta$  pourrait entraîner une boucle de d'autoamplification où le facteur de transcription NF- $\kappa$ B augmenterait l'activité du promoteur de l'IL-1 $\beta$  qui sera clivé par l'inflammasome NLRP3 et ainsi de suite. Finalement et de façon importante, la preuve conceptuelle du rôle de l'IL-1 $\beta$  dans l'immunomodulation du DT2 se confirme dans les essais cliniques qui ont rapporté que l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 $\beta$  améliore la glycémie et la sécrétion d'insuline chez des diabétiques de type 2 [313, 314].

Plusieurs facteurs environnementaux contribuent au développement du DT2 (voir Chapitre 1). Or, l'excès d'acides gras dans la diète aurait des propriétés pro-inflammatoires. Récemment, il a été proposé que les acides gras seraient des ligands endogènes pour le récepteur TLR4 [315-317] et activeraient en conséquence une réponse pro-inflammatoire dans les adipocytes, les macrophages, les muscles et le foie [273, 274, 318-321]. De plus, l'invalidation ou la mutation du gène *Tlr4* protégerait contre la résistance à l'insuline

induite par une diète riche en gras et contre une obésité induite par la diète [273, 274, 318, 320, 321]. Toutefois, le lien direct entre les acides gras et le récepteur TLR4 a récemment été contesté [322]. Dans une étude visant à évaluer les effets des acides gras saturés sur les différentes voies de signalisation induites par les TLR2, TLR4 et TLR5, il a été rapporté que l'activation des voies de signalisation induites suite à l'activation des TLRs par les acides gras saturés était le résultat d'une contamination de l'albumine sérique bovine, qui est utilisée dans l'étape de précomplexation des acides gras<sup>1</sup>. Cette étude pouvant rapporter un cas isolé de contamination, il est, selon moi, important de ne pas généraliser cette observation à toutes les études ayant évalué le rôle des acides gras sur l'activation du récepteur TLR4 puisque, de façon générale, un contrôle d'albumine sérique bovine est inclus à titre de contrôle négatif.

## **L'endotoxémie et le diabète de type 2**

La source exacte de ce qui crée l'état inflammatoire chez les patients diabétiques demeure imprécise. Néanmoins, un nombre croissant d'évidences suggère que la flore intestinale joue un rôle prépondérant dans le développement de l'obésité et du DT2. Or, la relation existant entre la flore intestinale et l'obésité a été décrite il y a une trentaine d'années alors qu'il avait été observé que la chirurgie bariatrique des patients obèses et que la prise poids corporel des suites d'une lésion du noyau hypothalamique ventromédian entraînaient un changement dans la flore intestinale [323, 324].

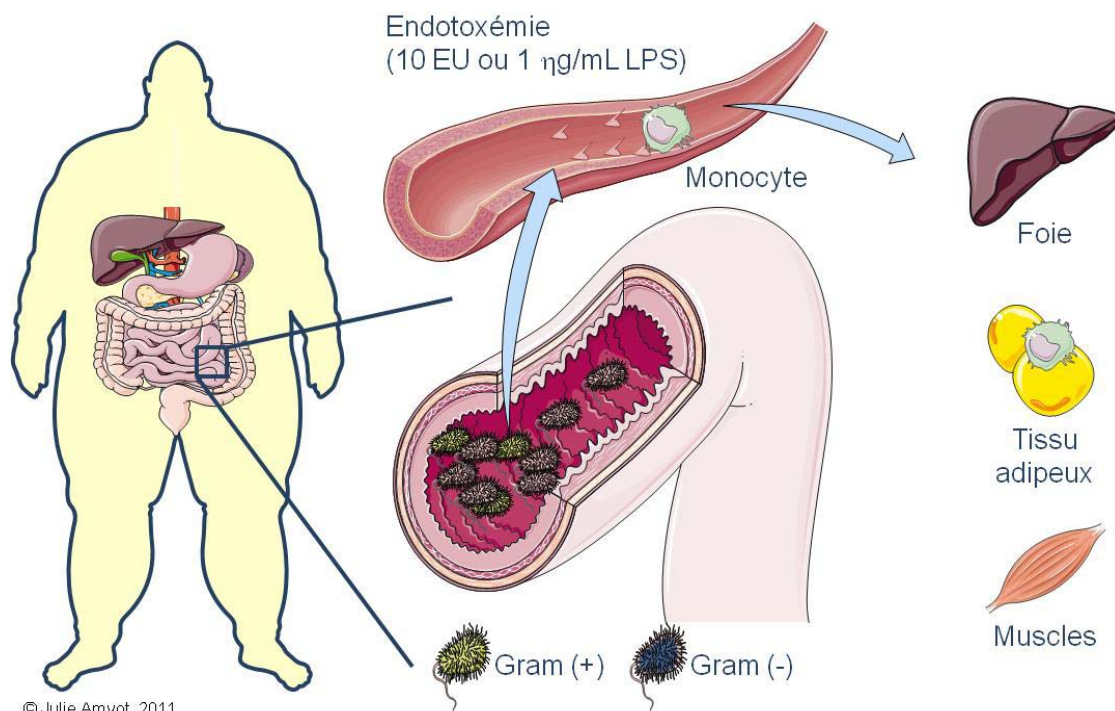
De nos jours, une attention particulière est portée vers la flore bactérienne intestinale suite à la découverte récente du rôle des lipopolysaccharides bactériens dans le développement de l'obésité et du DT2 (Figure 17). En effet, l'état chronique inflammatoire de faible intensité chez les individus diabétiques comprend une endotoxémie métabolique de faible intensité. Cette endotoxémie provient du microbiome intestinal, qui comprend chez l'Homme entre 10 à 100 trillions de microorganismes [325] provenant de plus de 1000 espèces [326]. Une

---

<sup>1</sup> Les acides gras non-complexés à l'albumine sérique sont très cytotoxiques et exercent un effet détergent sur les membranes cellulaires. À noter que seule la fraction non-liée à l'albumine sérique est responsable des effets médiés par les acides gras.



alimentation riche en lipides ainsi que le DT2 et l'obésité sont associés à une réduction du ratio de bactéries intestinales à Gram positif sur les bactéries à Gram négatif [327-333], ratio qui est rétabli suite à une perte de poids [328]. Or, les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane cellulaire composée de LPS. Par un phénomène d'absorption [334, 335] et par un phénomène dépendant des chylomicrons sécrétés par les entérocytes [336], ces LPS atteignent la circulation sanguine [337, 338] à une dose 10 à 50 fois inférieure à celle rencontrée dans un choc septique [339]. Chez l'Homme, la concentration des LPS circulants est plus élevée chez les individus diabétiques en comparaison aux sujets non-diabétiques [340]. Cette endotoxémie métabolique de faible intensité a été rapportée pour induire la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les adipocytes [340-342], contribuant ainsi à l'état inflammatoire rencontré chez les individus diabétiques. En outre, cette endotoxémie est également associée à l'augmentation du risque de développer une résistance à l'insuline [342, 343] ainsi qu'un diabète [344].



### Figure 17: L'endotoxémie et le DT2.

Les individus obèses et diabétiques de type 2 sont caractérisés par une altération de leur flore bactérienne intestinale, enrichie en bactéries à Gram négatif. Ces bactéries possèdent à leur surface des LPS qui, par un phénomène d'absorption et par un mécanisme dépendant des lipoprotéines sécrétées par les entérocytes, atteignent la circulation sanguine et créent un état inflammatoire systémique. Ces LPS pourraient également activer certaines réponses pro-inflammatoires dans les tissus périphériques impliqués dans la résistance à l'insuline.

## Chapitre 6 – Mise en contexte de la thèse

*« Quand on fait des recherches, il faut avoir une hypothèse en tête. Sans cela, on marche à l'aventure. Ce n'est pas avoir une idée préconçue; c'est seulement avoir un plan, une cache de recherche, une méthode, ce qui est bien différent »*

- Claude Bernard

### Problématique

Le DT2 est caractérisé par une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline ainsi que par une insuffisance de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. Plusieurs études longitudinales ont clairement démontré que la sécrétion d'insuline diminue au cours des années qui suivent le diagnostic de DT2, conséquence de la détérioration progressive de la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques qui précède le diagnostic et se poursuit au cours des années suivantes [28, 57]. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la perte de fonction de la cellule  $\beta$  du pancréas sont partiellement identifiés [62]. Les études antérieures de notre laboratoire ont montré que ceci pouvait être dû, au moins en partie, à l'hyperglycémie et les dyslipidémies présentes chez les individus diabétiques. En effet, dans plusieurs modèles expérimentaux, l'excès combiné de glucose et d'acides gras entraîne une diminution de la transcription du gène de l'insuline *via* une diminution de la liaison de PDX-1 et MafA, deux facteurs de transcription essentiels à la régulation du gène de l'insuline, à la région promotrice du gène de l'insuline [215, 216]. Également, d'autres facteurs tels que le stress du RE (RE) et l'immunité innée ont été rapportés comme étant des agents causals de la dysfonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques (révisé dans [228, 345]). Toutefois, leur implication dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline demeure imprécise.

### But de la thèse

Le but de la thèse était d'identifier et caractériser le rôle du stress du RE (RE) et de l'immunité innée dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline.

## Hypothèses de la thèse

*Implication du stress du RE, plus particulièrement de la voie ATF6 de la réponse UPR, dans la régulation du gène de l'insuline*

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques ont un RE très développé, conséquence de leur fonction spécialisée de production d'insuline en réponse au glucose et aux nutriments. Cette caractéristique les rend très susceptibles au stress du RE. En réponse à la résistance à l'insuline, les cellules  $\beta$  augmentent de façon très importante la production et la sécrétion d'insuline. Ce flux de protéines dans le RE est élevé et dépasse la capacité de RE à replier correctement toutes ces nouvelles protéines. Dans ce premier travail nous avons évalué la contribution de la réponse du RE au stress. Celle-ci se met en place suite à l'activation de trois protéines transmembranaires du RE: PERK, IRE1 et ATF6. Il a récemment été rapporté que la surexpression d'un marqueur du stress du RE, ATF6, réprime indirectement l'expression du gène de l'insuline *via* entre autres, une diminution des niveaux de PDX-1 et MafA [346].

Notre hypothèse de travail était qu'une liaison directe d'ATF6 sur la région promotrice du gène de l'insuline entraîne également la répression de celui-ci.

*Rôle de l'immunité innée, plus spécifiquement du récepteur TLR4, dans la régulation du gène de l'insuline*

Les sujets diabétiques de type 2 présentent une flore intestinale enrichie en bactéries à Gram négatif, dont les LPS à leur surface atteignent la circulation sanguine par un mécanisme d'absorption et/ou par un mécanisme dépendant des lipoprotéines sécrétées par les entérocytes. Ces LPS circulants créent une endotoxémie de faible intensité qui serait à l'origine de l'état inflammatoire modéré chronique rencontré chez les individus diabétiques. Or, ces LPS exercent plusieurs effets métaboliques et s'avèrent délétères pour la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. L'exposition des îlots de Langerhans et des lignées de cellules  $\beta$ -pancréatiques aux LPS entraîne une réduction de la sécrétion et de l'expression du gène de l'insuline par des mécanismes moléculaires non identifiés jusqu'ici.

L'hypothèse de travail que nous avons proposée est que l'exposition d'îlots de Langerhans isolés humains et de souris à des doses croissantes de LPS entraîne non seulement une diminution de la sécrétion d'insuline, mais altère également l'expression de son gène via un mécanisme dépendant du récepteur TLR4 et de la voie NF- $\kappa$ B.

## Objectifs de la thèse

1. Déterminer si ATF6 est un répresseur du gène de l'insuline.
2. Identifier les mécanismes moléculaires responsables des effets délétères des LPS dans la régulation du gène de l'insuline.

## Publications

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

1. **Amyot J**, Benterki I, Fontés G, Hagman D, Ferdaoussi M, Teodoro T, Volchuk A, Joly E and Poitout V. *Binding of Activating Transcription Factor 6 to the A5/Core of the Rat Insulin II Gene Promoter does not Mediate its Transcriptional Repression*. J Mol Endocrinol, 2011. 47(3): p. 273-283.
2. **Amyot J**, Semache M, Ferdaoussi M, Fontés G and Poitout V. *Lipopolysaccharides Impair Insulin Gene Expression via Toll-Like Receptor 4 and NF- $\kappa$ B Signalling*. Sera soumis pour publication au journal PLoS ONE.

Cette thèse a également mené à la publication d'un article de revue à titre de coauteure, publication qui est présentée en annexe à cette thèse :

3. Poitout V, **Amyot J**, Semache M, Zarrouki B, Hagman DK et Fontés G. *Glucolipotoxicity of the Pancreatic Beta-Cell*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1801(3): p. 289-98. (Annexe 1)

Il est à noter que lors de sa soutenance, la candidate au grade de Ph.D. ne présentera pas les concepts de l'article de revue publié en 2010 dans le journal *Biochimica et Biophysica*

*Acta*, mais présentera seulement les deux articles dont elle est la première auteure, soit l'article publié en août 2011 dans le *Journal of Molecular Endocrinology* et l'article qui sera soumis en décembre 2011 dans le journal *PLoS ONE*.

## **RÉSULTATS**

## Article 1

**Titre: Binding of activating transcription factor 6 to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter does not mediate its transcriptional repression**

**Auteurs:** Julie Amyot, Isma Benterki, Ghislaine Fontés, Derek K. Hagman, Mourad Ferdaoussi, Tracy Teodoro, Allen Volchuk, Érik Joly et Vincent Poitout.

**Article publié dans:** Journal of Molecular Endocrinology (2011); 47: 273-83. (doi: 10.1530/JME-11-0016)

### **Contribution des auteurs:**

**Julie Amyot:** Auteure principale ayant élaboré les hypothèses, effectué toutes les expériences (à l'exception de la mutagenèse dirigée et de la création du vecteur d'expression d'ATF6 $\alpha$ -p50), analysé les résultats et rédigé le papier.

**Isma Benterki:** Coauteure ayant participé aux expériences de mutagenèse dirigée et de la mesure de l'activité du promoteur du gène de l'insuline.

**Ghislaine Fontés:** Coauteure ayant élaboré la stratégie de mutagenèse dirigée.

**Derek K. Hagman:** Coauteur ayant élaboré les hypothèses et les expériences en début de projet; participation à la correction du manuscrit.

**Mourad Ferdaoussi:** Coauteur ayant participé aux mesures de viabilité cellulaire.

**Tracy Teodoro:** Coauteure ayant créé le vecteur d'expression d'ATF6 $\alpha$ -p50.

**Allen Volchuk:** Coauteur et collaborateur; participation à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

**Érik Joly:** Coauteur ayant identifié le site de liaison d'ATF6 sur le promoteur du gène de l'insuline; participation à l'interprétation des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

**Vincent Poitout:** Directeur de thèse et investigateur principal. A dirigé et supervisé l'ensemble de ce projet de la genèse d'hypothèses à la rédaction du manuscrit.



## Mise en contexte de l'article 1

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques sont très susceptibles au stress du RE. En conditions d'hyperglycémie et de dyslipidémies associées à la pathogenèse du DT2, la demande en biosynthèse d'insuline surpasse la capacité de repliement des protéines du RE et active la réponse UPR. Le but de cette réponse vise principalement à atténuer la traduction des protéines afin de permettre le repliement adéquat de l'insuline mal repliée dans la lumière du RE (discuté dans le chapitre 4). Toutefois, la cellule  $\beta$ -pancréatique exprime des niveaux élevés de molécules d'ARNm de l'insuline, soit jusqu'à 100 000 molécules en conditions stimulantes de glucose [178]. Il est donc raisonnable de penser qu'en plus de l'atténuation de la traduction des protéines, la réponse UPR pourrait également atténuer l'expression du gène de l'insuline.

Plusieurs évidences suggèrent que la réponse UPR est associée à une répression du gène de l'insuline. D'une part, l'activation de la voie IRE1 dans la cellule  $\beta$ -pancréatique, en conditions stimulantes de glucose, est non seulement associée à une réduction des niveaux d'ARNm de l'insuline, mais entraîne également une dégradation de ces derniers [347-349]. D'autre part, la surexpression de la forme active de XBP-1 (XBP-1s) entraîne une réduction des niveaux d'ARNm de l'insuline ainsi que des niveaux d'ARNm de PDX-1 et de MafA, deux facteurs de transcription essentiels à la régulation du gène de l'insuline (discuté dans le chapitre 3) [350]. Finalement, et alors que nous avons déjà entamé cette étude, un article a rapporté que la surexpression d'une autre composante de la réponse UPR, soit la forme active d'ATF6 $\alpha$  (ATF6 $\alpha$ -p50), réprime le gène de l'insuline via un mécanisme indirect qui implique une réduction des niveaux protéiques de PDX-1 et de MafA, et une régulation à la hausse de la protéine SHP (de l'anglais, *small heterodimer partner*) [346]. Cet effet partiel d'ATF6 $\alpha$ -p50 suggère que d'autres mécanismes, possiblement directs, pourraient être impliqués dans les effets délétères d'ATF6 dans la régulation du gène de l'insuline.

Nous avons effectué une analyse de bio-informatique qui nous a révélé un site potentiel de liaison d'ATF6 dans la région promotrice du gène de l'insuline. Cette région identifiée

correspond à la boîte A5 du promoteur de l'insuline, une région connue pour lier PDX-1, MafA et un facteur de liaison de type A2 (de l'anglais, *A2-like binding factor*) [351]. Dans ce premier article de ma thèse publié dans le *Journal of Molecular Endocrinology*, nous avons tout d'abord évalué la contribution du stress du RE à l'inhibition de la transcription du gène de l'insuline dans des îlots de Langerhans isolés de rat. Pour ce faire, nous avons employé un agent chimique, la thapsigargine, qui induit un stress du RE en diminuant la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE *via* l'inhibition spécifique de la pompe SERCA. Dans le but d'évaluer la liaison possible d'ATF6 sur la région promotrice du gène de l'insuline, nous avons effectué des expériences de retardement sur gel (EMSA; de l'anglais, *electrophoretic mobility shift assay*) et d'immunoprécipitations de la chromatine (ChIP; de l'anglais, *chromatin immunoprecipitation*) dans des îlots de Langerhans isolés de rat et exposés à la thapsigargine. Nous avons également cotransfecté la forme active d'ATF6 $\alpha$  (ATF6 $\alpha$ -p50) ou d'ATF6 $\beta$  (ATF6 $\beta$ -p60) avec un vecteur d'expression de la luciférase sous le contrôle de promoteur du gène de l'insuline dans une lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques, puis nous avons mesuré l'activité du promoteur de l'insuline. Finalement, nous avons mesuré l'activité promotrice du gène de l'insuline suite à la mutation, par mutagenèse dirigée, de la boîte A5.

## **Binding of Activating Transcription Factor 6 to the A5/Core of the Rat Insulin II Gene Promoter does not Mediate its Transcriptional Repression**

Julie Amyot<sup>a, b</sup>, Isma Benterki<sup>a, b</sup>, Ghislaine Fontés<sup>a</sup>, Derek K. Hagman<sup>a,\*</sup>, Mourad Ferdaoussi<sup>a</sup>, Tracy Teodoro<sup>c</sup>, Allen Volchuk<sup>c</sup>, Érik Joly<sup>a</sup>, Vincent Poitout<sup>a, b, d, e\*</sup>

*<sup>a</sup>Montreal Diabetes Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Technopole Angus, 2901 Rachel Est, Montréal, QC, Canada, H1W 4A4*

*Departments of <sup>b</sup>Biochemistry <sup>d</sup>Medicine, and <sup>e</sup>Nutrition, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, QC, Canada, H3C 3J7*

*<sup>c</sup>Division of Cellular and Molecular Biology, Toronto General Research Institute, University Health Network, 101 College Street, TMDT 10-706, Toronto, ON, Canada, M5G1L7*

Running title: ATF6 Binds to the Rat Insulin II Gene Promoter

Keywords: Type 2 diabetes; pancreatic  $\beta$ -cell; insulin gene promoter; endoplasmic reticulum stress; activating transcription factor 6.

---

\* Present address: D. K. Hagman, Cancer Prevention Program, Division of Public Health Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA.

\* Corresponding author: Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Technopole Angus, 2901 Rachel Est, Montréal, QC, H1W 4A4, Canada, Tel: +1 514 890-8000 Ext: 23603, Fax: +1 514 412-7648.

**ABSTRACT**

Pancreatic  $\beta$ -cells have a well-developed endoplasmic reticulum (ER) due to their highly specialized secretory function to produce insulin in response to glucose and nutrients. It has been previously reported that overexpression of activating transcription factor 6 (ATF6) reduces insulin gene expression in part via upregulation of small heterodimer partner. In this study, we investigated whether ATF6 directly binds to the insulin gene promoter, and whether its direct binding represses insulin gene promoter activity. A bioinformatics analysis identified a putative ATF6 binding site in the A5/Core region of the rat insulin II gene promoter. Direct binding of ATF6 was confirmed using several approaches. Electrophoretic mobility shift assays in nuclear extracts from MCF7 cells, isolated rat islets and insulin-secreting HIT-T15 cells showed ATF6 binding to the native A5/Core of the rat insulin II gene promoter. Antibody-mediated supershift analyses revealed the presence of both ATF6 isoforms, ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$ , in the complex. Chromatin immunoprecipitation assays confirmed the binding of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  to a region encompassing the A5/Core of the rat insulin II gene promoter in isolated rat islets. Overexpression of the active (cleaved) fragment of ATF6 $\alpha$ , but not ATF6 $\beta$ , inhibited the activity of an insulin promoter-reporter by 50%. However, the inhibitory effect of ATF6 $\alpha$  was insensitive to mutational inactivation or deletion of the A5/Core. Therefore, although ATF6 binds directly to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter, this direct binding does not appear to contribute to its repressive activity.

## INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is characterized by impaired insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells and peripheral insulin resistance. As the disease progresses, insulin secretion inexorably declines, presumably due to the metabolic perturbations associated with diabetes, such as chronic hyperglycemia and dyslipidaemia (Poitout & Robertson 2008). The mechanisms underlying the deterioration of  $\beta$ -cell function are complex and only partly understood. In recent years, endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) have emerged as potentially important contributors to  $\beta$ -cell dysfunction under a variety of stress conditions (reviewed in (Eizirik *et al.* 2008)). The pancreatic  $\beta$ -cell is particularly sensitive to ER stress because of its specialized secretory function and highly developed ER. Under conditions of insulin resistance or elevated circulating levels of glucose or fatty acids associated with T2D, the increased demand for insulin biosynthesis overcomes the protein folding capacity of the ER and triggers the UPR (Scheuner & Kaufman 2008) in an attempt to 1) attenuate global protein synthesis, 2) increase transcription of molecular chaperones and foldases, and 3) activate ER-associated protein degradation (Eizirik *et al.* 2008). When this adaptive response fails to alleviate ER stress, the cell undergoes apoptosis.

The UPR involves the activation of 3 ER-localized stress sensors: PKR-like kinase (PERK), inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) and activating transcription factor 6 (ATF6). Activation of the PERK pathway leads to transient translational attenuation, and both the PERK and IRE1 pathways mediate gene expression changes associated with the UPR via induction of activating transcription factor 4 (ATF4) and X-box binding protein-1 (XBP-1). ATF6 is implicated in transcriptional upregulation of molecular chaperones to increase the folding capacity and reduce protein aggregation (Scheuner & Kaufman 2008). In mammalian cells, ATF6 is expressed as two isoforms, ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  (Haze *et al.* 2001). Both ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  are respectively synthesized constitutively as ubiquitous 90 kDa and 110 kDa transmembrane proteins located in the ER (Zhu *et al.* 1997; Haze *et al.* 1999; Haze *et al.* 2001) interacting with the molecular chaperone Binding immunoglobulin protein (BIP) under basal conditions. When unfolded proteins accumulate, BIP dissociates

from the ATF6 luminal domain, revealing two ER export signals (Shen *et al.* 2002). This enables ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  to translocate to the Golgi compartment (Haze *et al.* 1999; Haze *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002) where they are respectively cleaved into 50 and 60 kDa cytosolic basic leucine zipper (bZIP) transcription factors by the Golgi-resident Site-1 (S1P) and Site-2 proteases (S2P) (Ye *et al.* 2000; Haze *et al.* 2001). This regulated intramembrane proteolysis enables ATF6 $\alpha$ -p50 and ATF6 $\beta$ -p60 to translocate into the nucleus (Haze *et al.* 1999; Haze *et al.* 2001) where they directly activate transcription of molecular chaperones and foldases (Haze *et al.* 1999; Haze *et al.* 2001).

In addition to translation attenuation in response to ER stress, it is reasonable to expect that in highly secretory active endocrine cells, the UPR should also encompass some degree of inhibition of expression of the genes encoding secreted proteins. In the  $\beta$ -cell, insulin is expressed at extremely high levels, up to 100,000 molecules of insulin mRNA under stimulatory glucose conditions (Tillmar *et al.* 2002), and several lines of evidence are consistent with the possibility that the UPR is associated with reduced expression of the insulin gene. First, activation of the IRE1 branch of the UPR under glucotoxic conditions in  $\beta$ -cells is associated with decreased insulin mRNA levels (Lipson *et al.* 2006). Second, the ER stress response in insulin-secreting INS1 cells involves early degradation of insulin mRNA transcripts (Pirrot *et al.* 2007; Lipson *et al.* 2008). Third, overexpression of the spliced/active form of XBP-1 (XBP-1s) leads to a decrease in insulin mRNA levels concomitant with decreased mRNA levels of two transcription factors controlling the expression of the insulin gene, pancreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1) and mammalian homologue of avian MafA/L-Maf (MafA) (Allagnat *et al.* 2010). Finally, Seo *et al.* (Seo *et al.* 2008) have demonstrated that ATF6 represses insulin gene transcription in INS-1 cells under glucotoxic conditions. This effect is partially mediated by upregulation of small heterodimer partner (SHP) and decreased levels of PDX-1 and MafA. The partial implication of SHP suggests that other mechanisms might be involved by which ATF6 represses insulin gene transcription. This prompted us to examine whether ATF6 directly

binds to the insulin gene promoter and whether this contributes to its transcriptional repression.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Reagents**

RPMI-1640 and foetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen (Burlington, ON). DMSO was obtained from Sigma and thapsigargin was from Calbiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA). All other reagents (analytical grade) were from Sigma unless otherwise noted.

### **Rat islets isolation and cell culture**

All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. 250-275 g male Wistar rats (Charles River, St.-Constant, QC) were housed under controlled temperature (21°C) and a 12 h light-dark cycle with free access to water and standard laboratory chow. Rats were anesthetised by IP injection of a 100 mg/ml Ketamine Hydrochloride (Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON) / 20 mg/ml Xylazine (Bayer Inc., Toronto, ON) mixture and islets were isolated by collagenase digestion and dextran density gradient centrifugation as described (Briaud *et al.* 2001). Isolated islets were cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS and exposed for 6 h to 2.8 or 16.7 mM glucose in the presence or the absence of 1 µM thapsigargin. HIT-T15 cells (passages 74 to 86) (obtained from R.P. Robertson (Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, WA, USA)) were maintained in RPMI 1640 media containing 10% FBS and 11.1 mM glucose as described (Zhang *et al.* 1989).

### **Plasmids, transient transfections and reporter gene studies**

All plasmids were subcloned in DH5α bacterial strain and purified with a Qiagen maxiprep kit (Mississauga, Ontario, Canada). The insulin promoter reporters INS(-327)Luc

and INS(-230)Luc encoding *Luciferase* (Luc) under the control of the human insulin gene sequences -327/+30 and -230/+30, respectively, were kindly provided by L.K. Olson (Michigan State University, East Lansing, MI, USA) (Pino *et al.* 2005). The expression vector encoding rat ATF6 $\alpha$ -p50 (amino acids 1-377) was generated as described (Thuerauf *et al.* 2004; Vellanki *et al.* 2010). The expression vector coding for rat ATF6 $\beta$ -p60 (amino acids 1-392) was kindly provided by C.C. Glembotski (San Diego State University, San Diego, CA, USA) (Thuerauf *et al.* 2004). A mINS(-327)Luc reporter containing a site-specific mutation of the A5/Core was generated by PCR amplification using the following primer: 5'-CTCTCTCCTGGTCTAATGT***T***GAAAGTGGCCCAG-3' (mutated base is bolded and italicized). Accuracy of mutagenesis was confirmed by sequence analysis on a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). For transient transfections, HIT-T15 cells (passage 74 to 86) were seeded in 12-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells per well the day before transfection. Cells were co-transfected with a total of 1.6  $\mu$ g DNA of either pcDNA3.1, ATF6 $\alpha$ -p50 or ATF6 $\beta$ -p60 with INS(-327)Luc, INS(-230)Luc or mINS(-327)Luc, and 4  $\mu$ L of Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000. Cells were harvested 48 h later for electrophoretic mobility shift (EMSA) or luciferase assay. Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter assays (Promega, Madison, WI) were performed according to manufacturer's instructions. *Firefly* luciferase activity was normalized by *Renilla* luciferase activity or  $\beta$ -galactosidase activity (absorbance at 450 nm after 30 minutes incubation with orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyrannoside (ONPG)) of internal control plasmids.

### **RNA extraction and real-time RT-PCR**

Total RNA was extracted from aliquots of 150 islets each using the RNeasy Qiagen micro-kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON), reverse transcribed, and RT-PCR was carried out using the Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON), as previously described (Hagman *et al.* 2008). To amplify preproinsulin pre-mRNA (Ins2 pre-mRNA), a forward primer was designed against a sequence in exon 2 and a reverse primer designed against a sequence in intron 2, as described (Briaud *et al.* 2001; Iype *et al.* 2005). Primers used for RT-PCR were designed using Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) and are listed in



Supplementary Table 1. Results are expressed as the ratio of target mRNA to  $\beta$ -actin mRNA.

### **Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Nuclear extracts of isolated rat islets or HIT-T15 cells were prepared as described previously (Hagman *et al.* 2005). MCF7 nuclear extracts were obtained from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Double-stranded oligodeoxynucleotide probes corresponding to the A5/Core of the rat insulin promoter or to the intron 1 (listed in Supplementary Table 1) were  $^{32}$ P-labeled and column-purified (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Nuclear extracts (10  $\mu$ g) were incubated with 60,000 cpm of labeled probe with or without cold competitors in a final volume adjusted to 25  $\mu$ L with binding buffer (15 mM HEPES, pH 7.5, 60 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 12% glycerol, 3.3 mM dithiothreitol, and 100 ng of poly(dI-dC)) at room temperature for 30 min. Binding reactions were resolved on 4.5% acrylamide gels run in 0.5% TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) for 2 h at 4°C and visualized by autoradiography. The identity of the protein in the binding complexes was determined by supershift using 5  $\mu$ g of two antibodies directed against ATF6 $\alpha$  ((Zhang *et al.* 2009) and anti-ATF6 $\alpha$  kindly provided by Hideo Shinagawa (BioAcademia Inc., Osaka, Japan) or 5  $\mu$ g ATF6 $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

### **Quantitative Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays**

ChIP assays were performed as described previously (Chakrabarti *et al.* 2002) with some modifications. Briefly, 500 islets were crosslinked in 1% formaldehyde for 10 min at room temperature, and reaction was stopped with 125 mM glycine. After washing in cold PBS, cells were allowed to swell on ice for 10 min in ChIP sonication buffer and 1X complete mini protease inhibitor (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The chromatin was fragmented by sonication using Misonix sonicator 3000 (30 sec pulse and 30 sec cool-down (output 4) repeated 10 times) to shear DNA into 100-400 bp fragments. Debris was removed by centrifugation, and supernatants were cleared for 1 h at 4°C with Protein A/G

Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). For each immunoprecipitation, 250  $\mu$ L aliquots of clarified extracts were diluted with the sonication buffer containing 50  $\mu$ L Protein A/G Agarose and 10  $\mu$ g of herring sperm DNA, and then incubated with 5  $\mu$ g of anti-ATF6 $\alpha$  or anti-ATF6 $\beta$  overnight at 4°C. Immune complexes were successively washed in sonication buffer, high-salt buffer, LiCl buffer, and 1X Tris-EDTA. Protein-DNA complexes were eluted twice from Protein A/G in 1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, supplemented with 2 ng/mL CMV  $\beta$ -Galactosidase control plasmid and reverse-crosslinked at 65°C for 4 h. DNA and protein were ethanol-precipitated overnight at -20°C. Precipitated samples were dissolved in proteinase K buffer (0.1 M Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 5% SDS) and digested for 1 h at 55°C with proteinase K (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). DNA was extracted with phenol/ChCl<sub>3</sub>/isoamyl alcohol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) and ethanol-precipitated overnight at -20°C. Samples were washed in 70% ethanol and then dissolved in 100  $\mu$ L of 1X Tris/EDTA. 5  $\mu$ L of each sample was quantified in triplicate by SYBR Green I-based real-time PCR using the primers listed in Supplementary Table 1. Data were expressed as fold-differences relative to control conditions, in which normal rabbit serum was used instead of specific antibody in the CHIP, and normalized to the amount of  $\beta$ -galactosidase recovered from each individual sample at the elution step.

### **Western blot analyses**

Total proteins (10  $\mu$ g) from isolated rat islets or HIT-T15 cells were subjected to 10% SDS-PAGE as previously described (Hagman *et al.* 2005). Immunoblots were performed with anti-ATF6 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and anti-Tubulin (Abcam inc., Cambridge, MA, USA) antibodies. Signals were detected using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (BioRad) and enhanced chemiluminescence (ECL, PerkinElmer Las Canada Inc., Woodbridge, ON) on Kodak films (Kodak, Rochester, NY).

## Cell Viability Assay

Viability of primary islet cells exposed to 16.7 mM glucose  $\pm$  1 $\mu$ M thapsigargin for 6 h was assessed after dispersion of isolated islets. Approximately 150 islets were washed with 1 ml of HBSS-Hepes containing 1 mM EGTA and 5 mM glucose, resuspended in 300  $\mu$ l, and incubated at 37 °C for 3 min. The islets were then pipetted up and down until loosely dissociated, 1 ml PBS was added, and the dispersed cells were washed again and resuspended in 50  $\mu$ l of PBS containing 10  $\mu$ g/ml Hoechst 33342. Scoring of apoptosis was performed on 20  $\mu$ l of the stained cells under a fluorescence microscope (Olympus IX71 using a DAPI filter) by counting the cells displaying picnotic nuclei (approximately 400 cells per condition).

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test or by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc adjustment for multiple comparisons.  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Thapsigargin inhibits insulin pre-mRNA expression in isolated rat islets

We examined the effects of the ER stress-inducer thapsigargin on expression of the ER stress markers BIP, XBP1s, ATF4, and ATF6 and of insulin pre-mRNA in isolated rat islets (Fig. 1). Thapsigargin markedly increased the expression of all ER stress markers examined (Fig. 1A;  $p < 0.05$ ;  $n = 4-5$ ), whereas glucose alone did not affect their expression levels. Under these conditions we measured insulin gene expression, along with mRNA expression of PDX-1 and MafA (Fig. 1B). Given that the long half-life of mature insulin mRNA species makes it difficult to examine early changes in transcriptional rates, we used a set of primers against the short-lived pre-mRNA species (Ins2 pre-mRNA), as described by Iype et al. (Iype *et al.* 2005). As expected, insulin pre-mRNA levels were increased after a 6 h exposure to glucose (Fig. 1B;  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ). In contrast, thapsigargin markedly decreased

glucose-induced insulin pre-mRNA expression (Fig. 1B;  $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ), but not that of PDX-1 or MafA (Fig. 1B;  $n = 6$ ). The relatively short (6h) thapsigargin treatment did not induce detectable apoptosis under these conditions ( $1.05 \pm 0.22$  fold increase in percentage of picnotic nuclei vs. control,  $n = 4$ , NS). These results are consistent with the possibility that ER stress in  $\beta$ -cells inhibits insulin gene expression via a direct transcriptional effect.

### **ATF6 $\alpha$ and $\beta$ bind to the A5/Core of the insulin gene promoter**

A bioinformatics analysis using the software rVISTA (Loots *et al.* 2002) revealed a putative ATF6 binding site overlapping with the highly conserved A5/Core at position (-311 TGATGTGG -304) in the rat II and (-316 TGATGTGG -309) in the human promoters (Fig. 2). We first examined by EMSA whether ATF6 can bind to the A5/Core of the insulin gene promoter. Incubation of MCF7 cell nuclear extracts, which express high levels of ATF6, with a radiolabeled DNA probe containing the A5/Core (Fig. 3A) resulted in the formation of a complex whose intensity increased with increasing concentrations of nuclear extracts (Fig. 3A, lanes 1-3) and which was competed by excess cold probe (Fig. 3A, lane 7). Although the addition of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  antisera did not shift the mobility of the complex to a higher molecular weight, the intensity of the band was greatly reduced, indicating that co-incubation of nuclear extracts with two different ATF6 $\alpha$  antisera (Fig. 3A, lanes 4-5) and with an ATF6 $\beta$  antisera (Fig. 3A, lane 6) inhibited the DNA-protein complex formation, as observed in other studies (Martel *et al.* 2010). This confirmed that the complex contains both isoforms. A complex of similar migration pattern was also detected in nuclear extracts from isolated islets (Fig. 3B, lane 1) albeit of much lower intensity presumably due to the relatively lower levels of expression of ATF6 in islets as compared to MCF7 cells. The intensity of the complex was slightly increased in response to thapsigargin (Fig. 3B, lane 2). As in MCF7 extracts, the complex at the A5/Core was reduced in the presence of ATF6 $\alpha$  (Fig. 3B, lane 3) or ATF6 $\beta$  (Fig. 3B, lane 4) antibodies and competed in excess of unlabeled probe (Fig. 3B, lane 5). Incubation of islet nuclear extracts with a radiolabeled probe to the intron 1 of the insulin II gene, used as a negative control, yielded a complex of faster mobility (Fig. 3C, lane 1) which was not altered in the

presence of ATF6 $\alpha$  (Fig. 3C, lane 2) or ATF6 $\beta$  (Fig. 3C, lane 3) antibodies. To circumvent the low levels of endogenous ATF6 in  $\beta$ -cells (Seo *et al.* 2008), we repeated the EMSA analysis using nuclear extracts of HIT-T15 overexpressing ATF6 $\alpha$ -p50 (Fig. 3D). Here again, a complex of similar migration profile was detected (Fig. 3D, lanes 1-3) and its intensity decreased in the presence of ATF6 $\alpha$  (Fig. 3D, lane 4) or ATF6 $\beta$  (Fig. 3D, lane 5) antibodies.

We then used ChIP assays to confirm the ability of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  to bind to the endogenous insulin promoter (Fig. 4). Isolated rat islets cultured for 6 h at 2.8 mM and 16.7 mM glucose in the presence or the absence of 1  $\mu$ M thapsigargin were subjected to chromatin immunoprecipitation and a region of the insulin promoter spanning the A5/Core was amplified by PCR as described in Materials and Methods. As shown in Fig. 4, a 6 h exposure to glucose and to thapsigargin stimulated the binding of ATF6 $\alpha$  (Fig. 4A). However, only thapsigargin, but not glucose, stimulated the binding of ATF6 $\beta$  (Fig. 4B) to the endogenous insulin promoter. The increased binding of ATF6 $\alpha$  to the insulin promoter upon high glucose or thapsigargin treatment was associated with cleavage of ATF6 $\alpha$  (Fig. 4C).

Overall, these results indicate that both isoforms of ATF6 can directly bind to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter and prompted us to investigate whether this interaction modulates insulin promoter activity.

### **Overexpression of ATF6 $\alpha$ -p50, but not ATF6 $\beta$ -p60, represses insulin gene promoter activity independently from its binding to the A5/Core**

Since ATF6 expression and cleavage are increased, while insulin pre-mRNA levels are decreased, in islets exposed for 6 h to thapsigargin, it is conceivable that binding of ATF6 to the A5/Core represses insulin promoter activity. To test this possibility, HIT-T15 cells were co-transfected with increasing doses of ATF6 $\alpha$ -p50 or ATF6 $\beta$ -p60 expression vectors and a human insulin-promoter reporter gene containing 327 bp of the proximal regulatory region (INS(-327)Luc), including the A5/Core. As shown in Fig. 5A, overexpression of

ATF6 $\alpha$ -p50, confirmed by an increase in the intensity of a 50 kDa band reacting with the anti-ATF6 antibody, dose-dependently decreased human insulin promoter activity, while overexpression of the active form of ATF6 $\beta$  had no effect. We then examined the ability of ATF6 $\alpha$ -p50 to repress the activity of a reporter bearing a mutation in the A5/Core (mINS(-327)Luc) or of a truncated reporter devoid of the A5/Core (INS(-230)Luc) (Fig. 5B). Surprisingly, the activity of both the mutated and the truncated constructs was inhibited to the same degree as the INS(-327)Luc reporter upon overexpression of ATF6 $\alpha$ -p50. Overall, these data suggest that the A5/Core is not required for ATF6 $\alpha$  repression of human insulin gene promoter activity.

## DISCUSSION

This study was designed to determine whether ATF6, a transcription factor involved in the UPR and ER stress, binds to the insulin gene promoter. We found that both isoforms of ATF6 can indeed bind to the A5/Core of the insulin gene promoter in response to the ER stress inducer thapsigargin and that ATF6 $\alpha$  represses the insulin promoter, but that direct binding does not contribute to this repressing activity.

The pancreatic  $\beta$ -cell has a high protein-folding load: proinsulin represents up to 20% of the total mRNA and 30–50% of the total protein synthesis in the  $\beta$ -cell (Schuit *et al.* 1988; Schuit *et al.* 1991; Van Lommel *et al.* 2006). This renders  $\beta$ -cells particularly susceptible to metabolic stress due to their highly specialized secretory function to produce insulin in response to glucose and nutrients (Poitout 2004). Several recent studies have provided evidence in favour of the involvement of ER stress in  $\beta$ -cell dysfunction and T2D (reviewed in (Eizirik *et al.* 2008; Scheuner & Kaufman 2008)). We observed that thapsigargin, an ER stress inducer, impairs insulin gene pre-mRNA expression in isolated islets, suggesting that the UPR in  $\beta$ -cells encompasses transcriptional repression of the insulin gene in addition to the classical translational inhibition as shown in previous studies (Lipson *et al.* 2006; Pirot *et al.* 2007; Lipson *et al.* 2008; Seo *et al.* 2008; Allagnat *et al.* 2010). This appears to occur both via IRE1-mediated insulin mRNA degradation (Pirot *et*

*al.* 2007; Lipson *et al.* 2008) and transcriptional inhibition ((Seo *et al.* 2008; Allagnat *et al.* 2010) and our results). It is unlikely that the observed impairment of insulin gene expression in response to thapsigargin merely results from  $\beta$ -cell death, since cell viability was unchanged under the experimental conditions.

ATF6 is a member of the ATF/CREB basic-leucine zipper (bZIP) DNA-binding protein family (Hai *et al.* 1989). It regulates gene expression of a number of ER chaperones, such as BIP, glucose-regulated protein 94 (GRP94) and protein disulfide isomerase (PDI), among others (Okada *et al.* 2002), by interacting with nuclear factor-Y (NF-Y) and subsequent binding to a consensus ER stress response element (ERSE), CCAATN<sub>9</sub>CCACG (Yoshida *et al.* 1998; Haze *et al.* 1999). ATF6 can also bind to a consensus UPR element (UPRE) (Yoshida *et al.* 2001), (G)(G)TGACGTG(G/A), where the nucleotides in parentheses are more or less conserved (Wang *et al.* 2000). A bioinformatics analysis of the rat insulin II promoter revealed that the sequence -311 TGATGTGG -304 was similar to an UPRE and could therefore possibly bind ATF6. The insulin promoter is a highly conserved region spanning approximately ~400 bp upstream of the transcription start site. Expression of the insulin gene, essentially restricted to the pancreatic  $\beta$ -cells, is tightly regulated by several transcription factors. The coordinated and synergistic activation of insulin gene expression is mainly controlled by PDX-1, MafA and BETA2/NeuroD, which bind respectively to the AT-rich A3 box, C1 and E1 cis-acting DNA elements on the insulin gene promoter (reviewed in (Poitout 2004)). Farther upstream, a region containing the A5 element resembles a consensus PDX-1 binding site and is part of the highly conserved enhancer core sequence (German *et al.* 1995), which binds a nuclear factor complex enriched in  $\beta$ -cells (Ohlsson & Edlund 1986). PDX-1, MafA and an A2-like binding factor have been reported to bind to the A5/Core (Pino *et al.* 2005). The putative UPRE identified on the rat insulin II promoter maps to the A5/Core. In fact, we demonstrated binding of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  to the A5/Core using several approaches and cell types. EMSA performed with oligonucleotides to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter confirmed the formation of a DNA-protein complex with MCF7 cells, insulin-secreting HIT-T15 cells and isolated rat islets. The weaker signal intensity observed with islet

nuclear extracts might be due to the poor stability and solubility of the protein (Fonseca *et al.* 2010) and / or to its low levels of endogenous expression in  $\beta$ -cells (Seo *et al.* 2008). CHIP assays confirmed the recruitment of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  to the endogenous A5/Core within the rat insulin II gene promoter in response to thapsigargin in isolated rat islets, with a stronger enrichment for ATF6 $\beta$ . This is consistent with the role of ATF6 $\beta$  acting as a negative regulator of ATF6 $\alpha$  expression (Thuerlauf *et al.* 2007), but can also be explained by the different characteristics of the two isoforms. ATF6 $\beta$  is 10 to 15 times more expressed than ATF6 $\alpha$  and has a longer half-life (Thuerlauf *et al.* 2004), both of which could account for the differences in enrichment in CHIP assays. In contrast to thapsigargin, glucose stimulated only the binding of ATF6 $\alpha$ , consistent with previous observations by Seo *et al.* (Seo *et al.* 2008) who showed activation of ATF6 $\alpha$  under glucotoxic conditions in INS1 cells. The increased binding of ATF6 $\alpha$  to the endogenous promoter suggests that this isoform is more rapidly activated by glucose than ATF6 $\beta$ , consistent with the known differences in the activation kinetics of the two isoforms (Thuerlauf *et al.* 2004). Our observations however reveal an apparent paradox: On the one hand, high glucose induces cleavage of ATF6 $\alpha$  and its binding to the insulin promoter, and ATF6 $\alpha$  represses insulin gene expression. On the other hand, high glucose increases insulin gene expression. The reasons for this discrepancy are unknown, although we speculate that the repression of the insulin promoter by endogenous ATF6 $\alpha$  might be overridden by other transcriptional activators (e.g. PDX-1, MafA) under high glucose conditions.

We observed that the activity of a human insulin promoter reporter construct containing the A5/Core was reduced by overexpressing an active form of ATF6 $\alpha$ , confirming previous observations (Seo *et al.* 2008). This repressive effect seems to be specific to ATF6 $\alpha$ -p50 since overexpression of ATF6 $\beta$ -p60 did not alter insulin gene promoter activity. To determine the role of the A5/Core, we mutated the G flanking the TGATGT core, which is critical for ATF6 binding (Wang *et al.* 2000). This, however, did not prevent the ability of overexpressed active ATF6 $\alpha$  to repress insulin promoter activity. In contrast to the rat insulin II and mouse insulin I and II genes in which the consensus sequence TGATGTG of



the A5/Core is well conserved, the human A5/Core has a 1 nucleotide difference (TAATGTGG) which introduces a putative PDX-1 binding site (TAAT). The proximity of the introduced mutation to the PDX-1 binding site (TAATGTTG) could explain the repressive activity observed in the mutated plasmid. On the other hand, the fact that a truncated reporter which does not contain the A5/Core was repressed by overexpressed ATF6 $\alpha$  to the same extent as the A5/Core-containing construct suggests other possibilities. First, given the limitations of bioinformatics predictions of transcription factor binding sites, it is possible that other ATF6 binding sites may be present in the -230/+30 region of the human insulin promoter. For example, the rat insulin II promoter contains a c-AMP-response element (CRE) (Crowe & Tsai 1989) which might bind ATF6 (Hai *et al.* 1989). Second, ATF6 $\alpha$  repression of the insulin gene might be indirect and involve either induction of other transcriptional repressors, or competition with other factors at the same binding sites. In fact, exposure of isolated islets to thapsigargin increased SHP mRNA expression (Suppl. Fig. 1), consistent with the possibility that ATF6 indirectly affects the insulin gene by stimulating SHP expression, as shown in glucotoxic conditions in INS1 cells (Seo *et al.* 2008). Also, thapsigargin moderately increased mRNA expression levels of the transcription factor CREB (Suppl. Fig. 1), which might compete for binding with ATF6 at the CRE (contained within the shorter -230/+30 construct (Pino *et al.* 2005)), as shown in hepatocytes (Seo *et al.* 2010). Third, it has been previously reported that overexpression of ATF6 or XBP-1s occurs concomitantly with a decrease in PDX-1 and MafA expression levels in INS-1 cells and in dispersed islets (Seo *et al.* 2008; Allagnat *et al.* 2010). It is therefore conceivable that the levels of these transcription factors were affected by thapsigargin in isolated rat islets. However, Pdx-1 and MafA mRNA levels were not altered in isolated rat islets exposed for 6 h to thapsigargin (Fig. 1B), suggesting that ATF6 repression of the insulin gene does not involve a titration of PDX-1 and MafA transcription factors at that time point, although protein levels were not directly measured. Finally, ATF6 is known to regulate gene expression by interacting with partners such as serum response factor (SRF), NF-Y and BIP (Zhu *et al.* 1997; Yoshida *et al.* 2001; Shen *et al.* 2002), which can affect its transcriptional activity.

A question arising from these observations is what is the functional importance of ATF6 $\alpha$  repression of the insulin gene under conditions of ER stress? First, it is interesting to note that in most cases ATF6 $\alpha$  acts as a transcriptional activator (Yamamoto *et al.* 2007). In this context, however, it appears that ATF6 $\alpha$  acts as a repressor of the insulin gene, although the contribution, if any, of its direct binding to the insulin promoter remains to be demonstrated (Crowe & Tsai 1989).

In conclusion, we propose that the early repression of insulin gene transcription by the ATF6 branch of the UPR might represent a protective mechanism which contributes to reducing the protein load to the ER. Our results show that ATF6 binds to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter and therefore represents a novel transcription factor of the insulin gene. However, the binding of ATF6 $\alpha$  does not appear to contribute to its repressive activity, and its functional importance remains to be ascertained. Further studies are needed to determine the mechanisms and the physiological relevance of the repression of insulin gene expression by ATF6 $\alpha$ .

### **Declaration of interest**

The authors have nothing to disclose.

### **Funding**

This work was supported by the National Institutes of Health (R01DK58096 to VP and F32DK070406 to DKH). VP holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. J.A. is supported by a training award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and received support from Diabète Québec, the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and the Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal. I.B. received support from Diabète Québec.

### **Acknowledgements**

We thank L.K. Olson (Michigan State University, East Lansing, MI, USA) for the insulin promoter reporters, Hideo Shinagawa (BioAcademia Inc., Osaka, Japan) for the anti-ATF6 $\alpha$ , C.C. Glembotski (San Diego State University, San Diego, CA, USA) for the ATF6 $\beta$  expression vector, and R.P. Robertson (Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, WA, USA) for the HIT-T15 cell line. We are grateful to M. Ethier, G. Fergusson and C. Tremblay for valuable technical assistance.

**REFERENCES**

- Allagnat, F., F. Christulia, F. Ortis, P. Pirot, S. Lortz, S. Lenzen, *et al.* (2010). Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia* **53**(6): 1120-1130.
- Briaud, I., J. S. Harmon, C. L. Kelpe, V. B. Segu & V. Poitout (2001). Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* **50**(2): 315-321.
- Briaud, I., J. S. Harmon, C. L. Kelpe, V. B. Segu & V. Poitout (2001). Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* **50**: 315-321.
- Chakrabarti, S. K., J. C. James & R. G. Mirmira (2002). Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem* **277**(15): 13286-13293.
- Chen, X., J. Shen & R. Prywes (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* **277**(15): 13045-13052.
- Crowe, D. T. & M. J. Tsai (1989). Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol* **9**(4): 1784-1789.
- Eizirik, D. L., A. K. Cardozo & M. Cnop (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* **29**(1): 42-61.
- Fonseca, S. G., S. Ishigaki, C. M. Osowski, S. Lu, K. L. Lipson, R. Ghosh, *et al.* (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* **120**(3): 744-755.
- German, M., S. Ashcroft, K. Docherty, H. Edlund, T. Edlund, S. Goodison, *et al.* (1995). The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes* **44**(8): 1002-1004.

- Hagman, D. K., L. B. Hays, S. D. Parazzoli & V. Poitout (2005). Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* **280**(37): 32413-32418.
- Hagman, D. K., M. G. Latour, S. K. Chakrabarti, G. Fontes, J. Amyot, C. Tremblay, *et al.* (2008). Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* **57**(2): 424-431.
- Hai, T. W., F. Liu, W. J. Coukos & M. R. Green (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* **3**(12B): 2083-2090.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura & K. Mori (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**(11): 3787-3799.
- Haze, K., T. Okada, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, *et al.* (2001). Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* **355**(Pt 1): 19-28.
- Iype, T., J. Francis, J. C. Garmey, J. C. Schisler, R. Nesher, G. C. Weir, *et al.* (2005). Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *J Biol Chem* **280**(17): 16798-16807.
- Lipson, K. L., S. G. Fonseca, S. Ishigaki, L. X. Nguyen, E. Foss, R. Bortell, *et al.* (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* **4**(3): 245-254.
- Lipson, K. L., R. Ghosh & F. Urano (2008). The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PLoS One* **3**(2): e1648.
- Loots, G. G., I. Ovcharenko, L. Pachter, I. Dubchak & E. M. Rubin (2002). rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res* **12**(5): 832-839.

- Martel, G., P. Hamet & J. Tremblay (2010). GREBP, a cGMP-response element-binding protein repressing the transcription of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1/GCA). *J Biol Chem* **285**(27): 20926-20939.
- Ohlsson, H. & T. Edlund (1986). Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. *Cell* **45**(1): 35-44.
- Okada, T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi & K. Mori (2002). Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* **366**(Pt 2): 585-594.
- Pino, M. F., D. Z. Ye, K. D. Linning, C. D. Green, B. Wicksteed, V. Poitout, *et al.* (2005). Elevated Glucose Attenuates Human Insulin Gene Promoter Activity in INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cells via Reduced Nuclear Factor Binding to the A5/Core and Z Element. *Mol Endocrinol* **19**(5): 1343-1360.
- Pirot, P., N. Naamane, F. Libert, N. E. Magnusson, T. F. Orntoft, A. K. Cardozo, *et al.* (2007). Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs. *Diabetologia* **50**(5): 1006-1014.
- Poitout, V., Stein R, Rhodes CJ. (2004). Insulin gene expression and biosynthesis. International textbook of diabetes mellitus. F. E. DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, eds., John Wiley & Sons.
- Poitout, V. & R. P. Robertson (2008). Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* **29**(3): 351-366.
- Rozen, S. & H. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386.
- Scheuner, D. & R. J. Kaufman (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* **29**(3): 317-333.
- Schuit, F. C., P. A. In't Veld & D. G. Pipeleers (1988). Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(11): 3865-3869.

- Schuit, F. C., R. Kiekens & D. G. Pipeleers (1991). Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release. *Biochem Biophys Res Commun* **178**(3): 1182-1187.
- Seo, H. Y., Y. D. Kim, K. M. Lee, A. K. Min, M. K. Kim, H. S. Kim, *et al.* (2008). Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocrinology* **149**(8): 3832-3841.
- Seo, H. Y., M. K. Kim, A. K. Min, H. S. Kim, S. Y. Ryu, N. K. Kim, *et al.* (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases cAMP-stimulated hepatic gluconeogenesis via inhibition of CREB. *Endocrinology* **151**(2): 561-568.
- Shen, J., X. Chen, L. Hendershot & R. Prywes (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* **3**(1): 99-111.
- Thuerauf, D. J., L. Morrison & C. C. Glembotski (2004). Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *J Biol Chem* **279**(20): 21078-21084.
- Thuerauf, D. J., M. Marcinko, P. J. Belmont & C. C. Glembotski (2007). Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* **282**(31): 22865-22878.
- Tillmar, L., C. Carlsson & N. Welsh (2002). Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J Biol Chem* **277**(2): 1099-1106.
- Van Lommel, L., K. Janssens, R. Quintens, K. Tsukamoto, D. Vander Mierde, K. Lemaire, *et al.* (2006). Probe-independent and direct quantification of insulin mRNA and growth hormone mRNA in enriched cell preparations. *Diabetes* **55**(12): 3214-3220.
- Vellanki, R. N., L. Zhang, M. A. Guney, J. V. Rocheleau, M. Gannon & A. Volchuk (2010). Old Astrocyte Specifically Induced Substance Induces Expression of Genes Involved in Extracellular Matrix Production But Not Classical Endoplasmic Reticulum Stress Response Genes in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Endocrinology*.

- Wang, Y., J. Shen, N. Arenzana, W. Tirasophon, R. J. Kaufman & R. Prywes (2000). Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* **275**(35): 27013-27020.
- Yamamoto, K., T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, *et al.* (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* **13**(3): 365-376.
- Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, *et al.* (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**(6): 1355-1364.
- Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura & K. Mori (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* **273**(50): 33741-33749.
- Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada & K. Mori (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**(7): 881-891.
- Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, *et al.* (2001). Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **21**(4): 1239-1248.
- Zhang, H. J., T. F. Walseth & R. P. Robertson (1989). Insulin secretion and cAMP metabolism in HIT cells. Reciprocal and serial passage-dependent relationships. *Diabetes* **38**: 44-48.
- Zhang, L., E. Lai, T. Teodoro & A. Volchuk (2009). GRP78, but Not Protein-disulfide Isomerase, Partially Reverses Hyperglycemia-induced Inhibition of Insulin Synthesis and Secretion in Pancreatic [352]-Cells. *J Biol Chem* **284**(8): 5289-5298.
- Zhu, C., F. E. Johansen & R. Prywes (1997). Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol Cell Biol* **17**(9): 4957-4966.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Thapsigargin-induced ER-stress in isolated rat islets inhibits insulin pre-mRNA expression.** (A) Expression of BIP, XBP-1s, ATF4 and ATF6 mRNA in isolated islets exposed to 2.8 and 16.7 mM glucose in the presence or absence of 1  $\mu$ M thapsigargin for 6 h. (B) Expression of insulin pre-mRNA, PDX-1 and MafA mRNA in isolated islets exposed to 2.8 and 16.7 mM glucose in the presence or absence of 1  $\mu$ M thapsigargin for 6 h. Pre-mRNA and mRNA levels were measured by RT-PCR and normalized by  $\beta$ -actin mRNA levels. Data are mean  $\pm$  SEM of 4-6 independent experiments. \* $p < 0.05$

**Figure 2: Identification of a putative ATF6 binding site on the A5/Core of the *Insulin* gene promoter region.** Alignment of nucleotide sequences of the 5'-flanking region of the insulin I and II genes from mouse, rat and human. A box indicates a putative ATF6 binding site. The arrow indicates the previously described transcription start site (+ 1) (TSS). Asterisks indicate nucleotide homology across species. Flanking the A5/Core, sequences recognized by forward and reverse primers used for ChIP analysis are underlined (sequences shown in Supplementary Table 1). Bioinformatics analysis shows one putative conserved ATF6 binding site located within the A5/Core.

**Figure 3: ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  bind to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter.** Nuclear extracts from MCF7 cells, isolated rat islets and HIT-T15 cells were tested by EMSA for their ability to bind to DNA probe containing the A5/Core. (A) EMSA of  $^{32}$ P-labeled A5/Core probe. Increasing concentrations of nuclear extracts (2.5, 5 and 10  $\mu$ g) isolated from MCF7 cells (Lanes 1 to 3). Two different anti-ATF6 $\alpha$  antibodies were added to lanes 4 and 5, and anti-ATF6 $\beta$  was added to lane 6. Competition was done with 50-fold molar excess of unlabeled A5/Core probe (lane 7). (B) EMSA of  $^{32}$ P-labeled A5/Core probe. Nuclear extracts were isolated from rat islets exposed for 6 h to 11.1 mM glucose in the absence or the presence of 1  $\mu$ M thapsigargin (lanes 1 and 2). Anti-ATF6 $\alpha$  and anti-ATF6 $\beta$  antibodies were added respectively to lanes 3 and 4. Competition was done with 100-fold molar excess of unlabeled A5/Core probe (lane 5). (C) EMSA of  $^{32}$ P-labeled

Intron 1 probe. Nuclear extracts were isolated from rat islets exposed for 6 h to 11.1 mM glucose in the presence of 1  $\mu$ M thapsigargin. Anti-ATF6 $\alpha$  and anti-ATF6 $\beta$  antibodies were added respectively to lanes 2 and 3. Competition was done with 100-fold molar excess of unlabeled Intron 1 probe (lane 4). (D) EMSA of  $^{32}$ P-labeled A5/Core probe. Nuclear extracts isolated from immortalized pancreatic  $\beta$ -cells HIT-T15 transfected with increasing amount of ATF6 $\alpha$ -p50 (0, 0.5 and 1.0  $\mu$ g) (Lanes 1 to 3). Anti-ATF6 $\alpha$  and anti-ATF6 $\beta$  antibodies were added respectively to lanes 4 and 5. Competition was done with 100-fold molar excess of unlabeled A5/Core probe (lane 6). EMSA probe sequences are indicated in Supplementary Table 1. Data shown are representative gels of at least three independent experiments.

**Figure 4: Binding of ATF6 to the endogenous rat insulin II gene promoter, as assessed by ChIP analysis.** Isolated rat islets were exposed to 2.8 or 16.7 mM glucose in the presence or absence of 1  $\mu$ M thapsigargin for 6 h. Chromatin was immunoprecipitated with ATF6 $\alpha$  antiserum (A), ATF6 $\beta$  antiserum (B), or normal rabbit serum. Data are expressed as the fold increase of the immunoprecipitated sample relative to the control and normalized to the amount of  $\beta$ -galactosidase recovered at the elution step. Data are mean  $\pm$  SEM of 2-5 separate experiments. (C) Representative immunoblot from 3 independent experiments probed for antibodies against cleaved (ATF6 $\alpha$ -p50) and uncleaved (ATF6 $\alpha$ -p90) ATF6 $\alpha$  and  $\alpha$ -tubulin.

**Figure 5: Overexpression of ATF6 $\alpha$ -p50, but not ATF6 $\beta$ -p60, represses human insulin promoter activity.** (A) HIT-T15 cells were cotransfected with the INS(-327)Luc with increasing amounts of the ATF6 $\alpha$ -p50 or ATF6 $\beta$ -p60 expression vector or an empty vector (pcDNA3.1). Total DNA amount was identical amongst conditions. *Firefly* luciferase activity was corrected with *Renilla* or  $\beta$ -galactosidase activity. (B) Schematic representation of the different constructs used to assess the role of the A5/Core in INS(-327)Luc, INS(-230)Luc and mINS(-327)Luc containing a site-specific mutation of the A5/Core. (C) HIT-T15 cells were cotransfected with 0.5  $\mu$ g ATF6 $\alpha$ -p50 or the empty expression vector (pcDNA3.1), and INS(-327)Luc, mINS(-327)Luc or INS(-230)Luc.

Transfection efficacy was corrected by normalizing *Firefly* luciferase activity to *Renilla* activity. Data are mean  $\pm$  SEM of 3-4 separate experiments. \* $p < 0.05$

**Suppl. Fig.1: Thapsigargin increases CREB1 and SHP mRNA expression in isolated rat islets.** Isolated islets were exposed to 2.8 and 16.7 mM glucose in the presence or absence of 1  $\mu$ M thapsigargin for 6 h. CREB1 and SHP mRNA levels were measured by RT-PCR and normalized by  $\beta$ -actin mRNA levels. Data are mean  $\pm$  SEM of 3-5 independent experiments. \* $p < 0.05$

Figure 1 – Amyot et al.

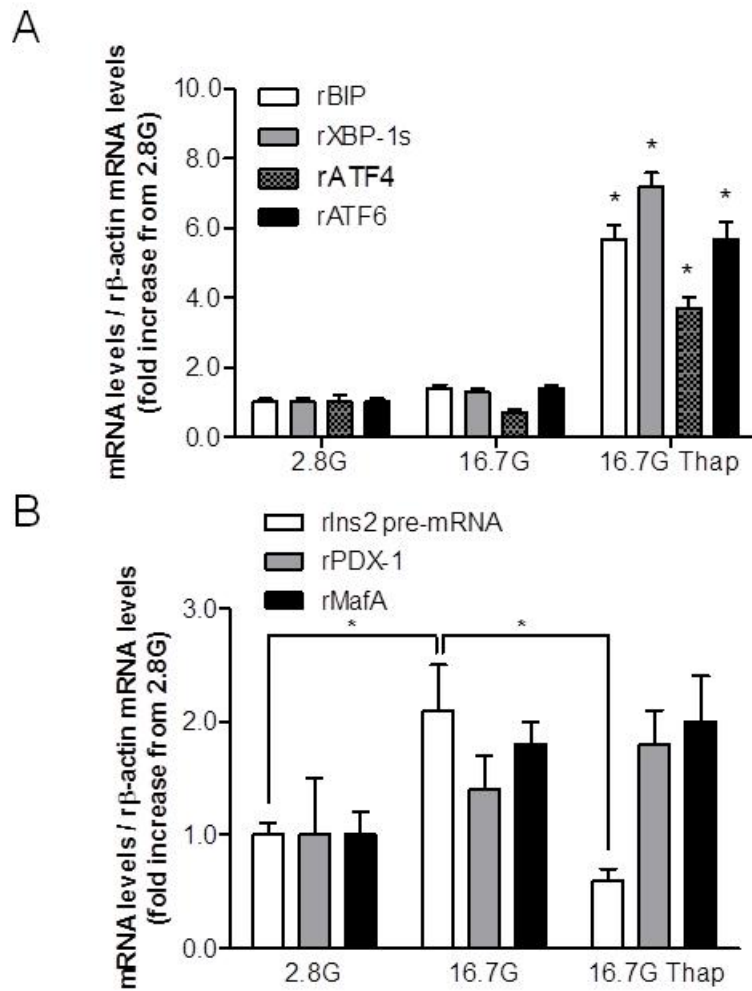


Figure 2 – Amyot et al.

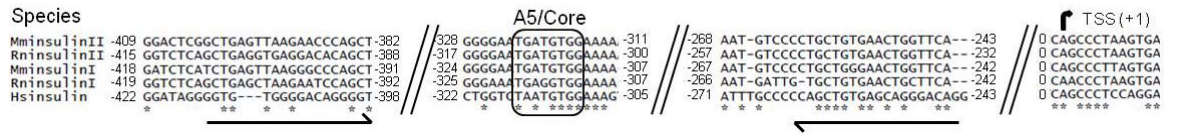


Figure 3 – Amyot et al.

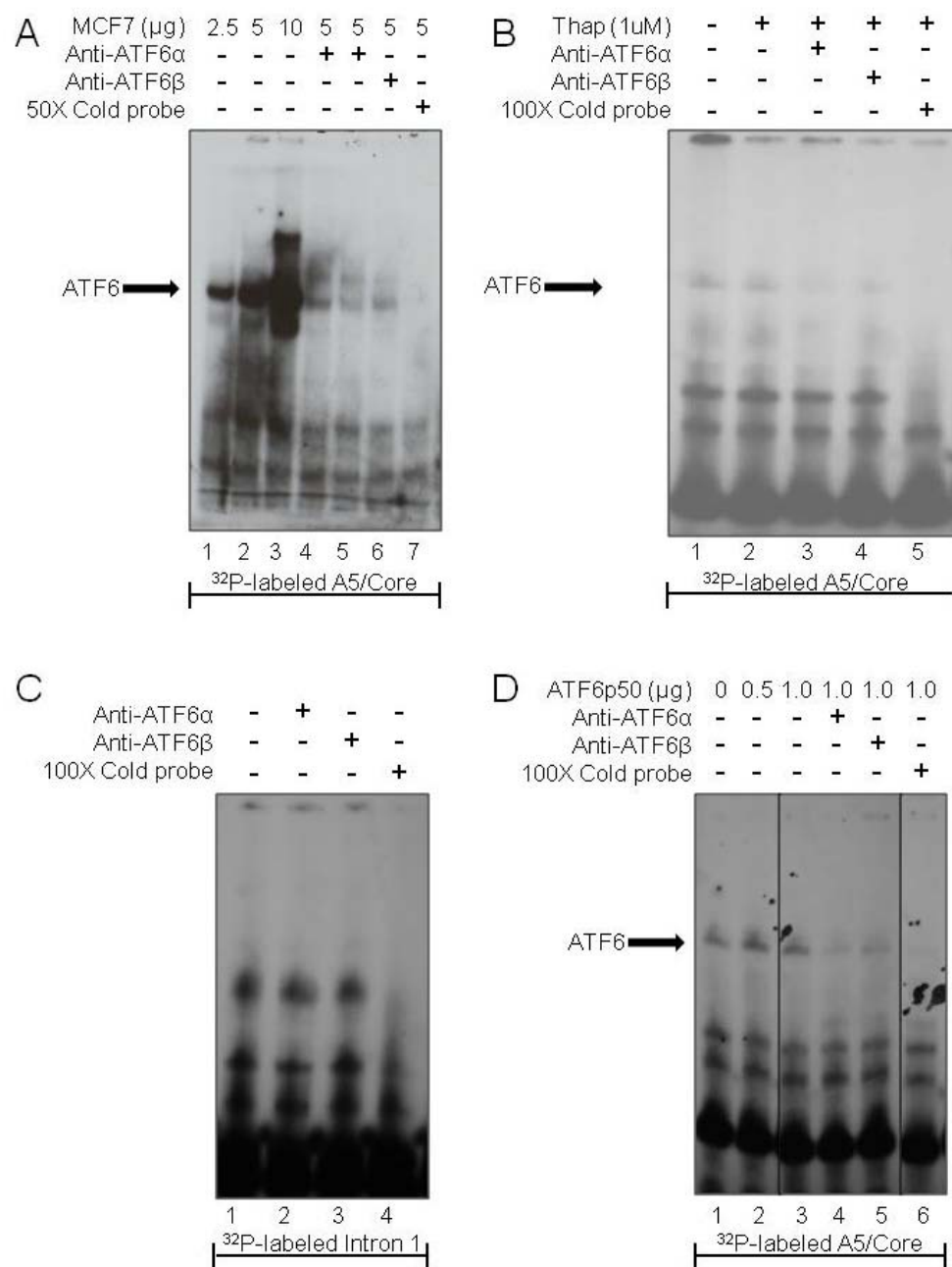


Figure 4 – Amyot et al.

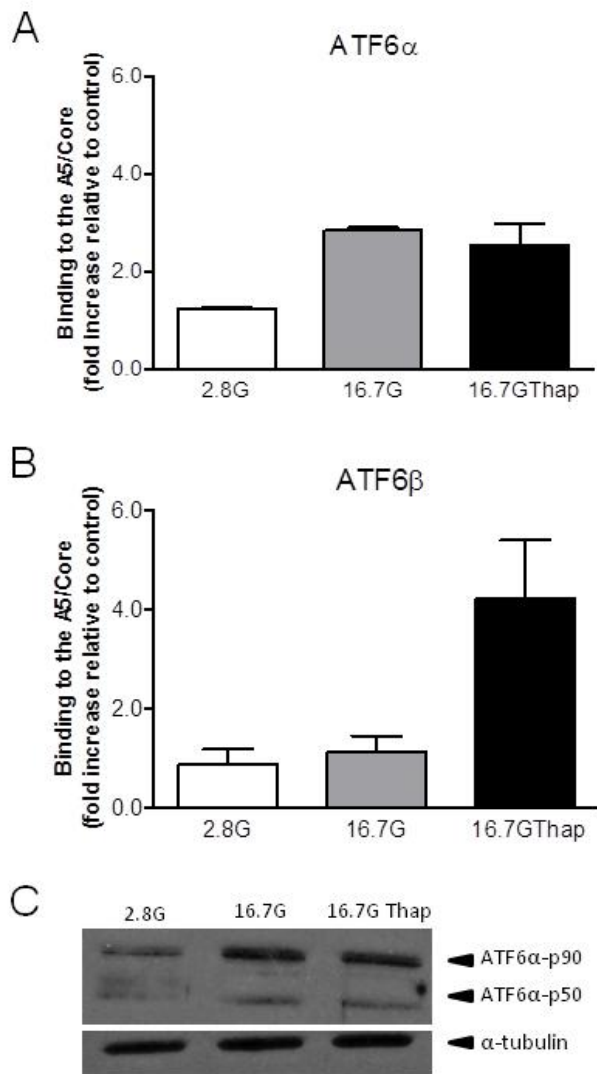
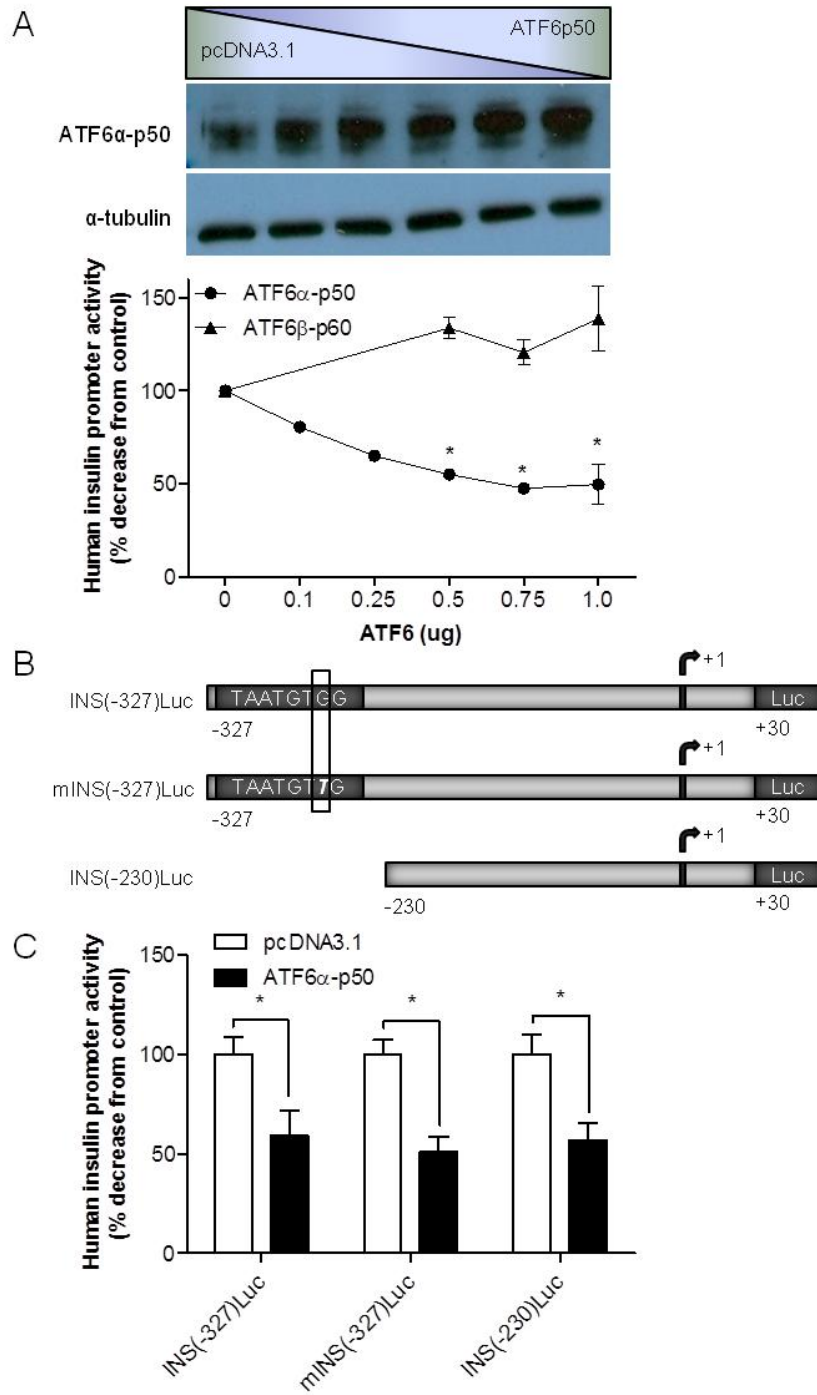
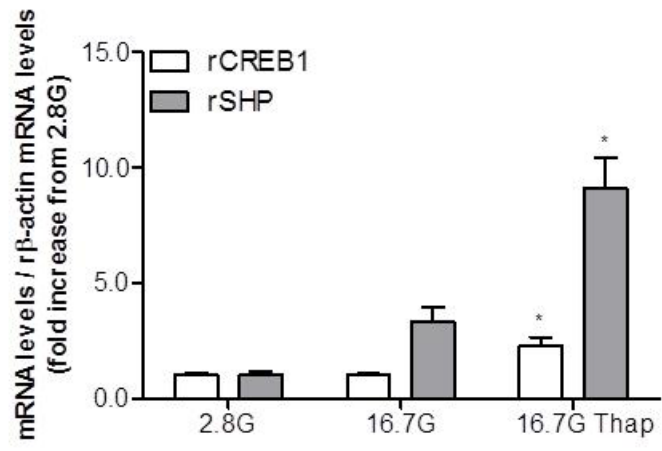


Figure 5 – Amyot et al.





Supplemental Figure 1 – Amyot et al.



## Discussion de l'article 1

### *Rappel des résultats*

Dans ce premier article publié, nous avons tout d'abord identifié, par une analyse de bio-informatique, un site potentiel de liaison d'ATF6 à la boîte A5 du promoteur du gène de l'insuline. La liaison directe d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à cet élément du promoteur de l'insuline a été démontrée par différentes approches de biologie moléculaire. Des expériences de retardement sur gel effectuées dans des îlots de Langerhans isolés de rat ainsi que dans la lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques HIT-T15 ont confirmé la liaison d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à la boîte A5 du promoteur du gène de l'insuline. De plus, nos expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré qu'ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$  se lient à la boîte A5 du promoteur endogène du gène de l'insuline et que cette liaison augmente en présence de thapsigargine, un agent qui induit un stress du RE. De plus, la surexpression d'ATF6 $\alpha$ -p50, mais pas ATF6 $\beta$ -p60, a entraîné la réduction de près de 50 % de l'activité du promoteur de l'insuline. Toutefois, la mutation ou l'absence de la boîte A5 réduit également l'activité promotrice du gène de l'insuline. Ces résultats montrent qu'ATF6 peut directement se lier sur la boîte A5 du promoteur du gène de l'insuline, mais que cette liaison ne semble pas contribuer à son activité répressive.

### *Interprétation des résultats*

Le but de cette étude était de déterminer si ATF6, un facteur de transcription impliqué dans la réponse UPR, lie directement la région promotrice du gène de l'insuline et réprime son activité.

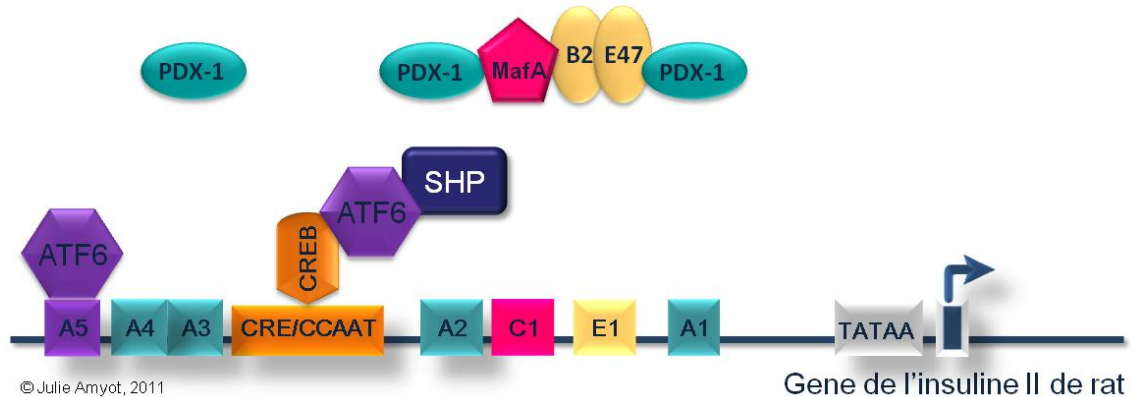
Nous avons montré que le stress du RE, induit par la thapsigargine, réprime le gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans isolés de rat. Ces résultats suggèrent que le stress du RE dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques entraîne une répression du gène de l'insuline, en plus de l'inhibition de la traduction des protéines tel que montré par d'autres groupes [346, 347,

349, 350]. Nous pouvons par ailleurs conclure que l'inhibition du gène de l'insuline que nous avons observée ne résulte pas d'une mort cellulaire en réponse à la thapsigargine puisque la viabilité cellulaire des îlots dans ces conditions demeure inchangée.

Deuxièmement, l'analyse de bio-informatique effectuée dans le cadre de cette étude a révélé un site potentiel de liaison d'ATF6 sur la boîte A5 de la région promotrice du gène de l'insuline. Les expériences de retardement sur gel ont montré la liaison *in vitro* d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à un oligonucléotide dont la séquence correspond à la boîte A5 et ce, dans trois modèles cellulaires distincts, soient les cellules MCF7 (enrichies en ATF6), les cellules  $\beta$ -pancréatiques de hamster HIT-T15 et les îlots de Langerhans isolés de rat. Nous avons confirmé le recrutement d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à la boîte A5 du promoteur endogène du gène de l'insuline de rat par immunoprécipitation de la chromatine. Alors qu'ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$  sont tous deux recrutés à la boîte A5 du promoteur endogène du gène de l'insuline de rat en réponse à la thapsigargine, nos expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont également montré que l'enrichissement d'ATF6 $\beta$  était plus important. Ces résultats confirment certaines observations rapportées par d'autres groupes selon lesquelles ATF6 $\beta$  est 10 à 15 fois plus exprimé qu'ATF6 $\alpha$ , possède une plus longue demi-vie et agit à titre de répresseur d'ATF6 $\alpha$  [243, 244]. Toutefois, nos résultats révèlent également un paradoxe : d'une part, l'exposition des îlots à des concentrations élevées de glucose entraîne le clivage d'ATF6 $\alpha$ , mais augmente également sa liaison au promoteur de l'insuline. D'autre part, ces conditions de glucose sont stimulantes et activent la transcription du gène de l'insuline. Ces disparités sont équivoques, mais il est toutefois possible que la répression du gène de l'insuline par ATF6 $\alpha$  en présence de conditions de glucose stimulatrices soit assurée par d'autres activateurs transcriptionnels, tels que PDX-1 et MafA.

Alors qu'ATF6 $\alpha$  a initialement été caractérisé comme étant un activateur de la transcription des gènes impliqués dans le repliement des protéines (discuté au chapitre 4), nous montrons qu'il peut également agir à titre de répresseur transcriptionnel du gène de l'insuline. La surexpression d'ATF6 $\alpha$ -p50, mais pas celle d'ATF6 $\beta$ -p60, réprime l'activité

transcriptionnelle du gène de l'insuline. Toutefois, la mutation et l'absence de la boîte A5 n'empêchent pas la répression de l'activité promotrice du gène de l'insuline. Le vecteur d'expression présentant un site de liaison pour PDX-1 (TAAT), la mutation de la boîte A5 pourrait empêcher ce dernier de se lier au promoteur de l'insuline et ainsi en réprimer l'activité transcriptionnelle. Outre sa liaison directe à la boîte A5 du promoteur de l'insuline, il est possible qu'ATF6 $\alpha$ -p50 exerce également une inhibition allostérique de la transcription du gène de l'insuline par son interaction directe avec d'autres protéines. En effet, ATF6 est connu pour interagir avec plusieurs protéines dont BIP, NF-Y et CREB [236, 353-355], et ces interactions pourraient affecter la capacité de transcription du gène de l'insuline. De plus, l'exposition des îlots de Langerhans à la thapsigargine entraîne une augmentation des niveaux messagers de SHP et de CREB, ce qui fait de ces facteurs de transcription des candidats potentiels pour former un complexe d'inhibition allostérique avec ATF6. Un élément CRE pouvant lier à la fois ATF6 et CREB est présent dans la région promotrice endogène du gène de l'insuline, ainsi que dans les trois vecteurs d'expression de la luciférase utilisés dans notre étude. Ainsi, les effets répresseurs d'ATF6 pourraient s'expliquer tel qu'illustré sur la figure 18. En réponse à la thapsigargine, CREB pourrait compétitionner avec ATF6 pour le site CRE tel qu'observé dans les hépatocytes [356]. Il est également possible que CREB lie à la fois l'élément CRE du promoteur ainsi qu'ATF6, formant ainsi un complexe qui empêcherait la liaison de PDX-1 et de MafA au promoteur de l'insuline et entraînerait l'inhibition de la transcription du gène de l'insuline. Il est possible que ce complexe d'inhibition inclut la protéine SHP, dont l'expression est augmentée par ATF6 [346].



**Figure 18: Mécanisme potentiel de l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline par ATF6.**

ATF6 se lie directement à la boîte A5 du promoteur de l'insuline. Toutefois, cette liaison directe ne semble pas contribuer à son activité répressive. Parmi les mécanismes potentiels par lesquels ATF6 $\alpha$  réprime la transcription du gène de l'insuline, citons une interaction protéique avec le facteur de transcription CREB et/ou la protéine SHP, formant de cette façon un complexe d'inhibition allostérique qui empêche la liaison des facteurs de transcription clés de la transcription du gène de l'insuline, soient PDX-1 et MafA.

#### *Forces et limites de l'étude*

Plusieurs forces, mais également plusieurs limites sont associées à cette étude. Premièrement, l'utilisation de cellules primaires par rapport à l'utilisation de lignées de cellules  $\beta$ -pancréatiques transformées augmente la pertinence de l'étude. En effet, l'utilisation d'îlots de Langerhans comme modèle d'étude permet l'observation de mécanismes dans un modèle cellulaire plus représentatif de la physiologie, et dans lequel l'ultrastructure des îlots, et donc les interactions entre les différents types cellulaires et la matrice qui sont essentiels au bon fonctionnement de l'îlot, sont maintenus (discuté dans le chapitre 2). Par contre, il est important de mentionner que ces îlots sont en partie maintenus hors de leur contexte physiologique et exposés au glucose par la périphérie de l'îlot, plutôt que par les artérioles, situées au centre de l'îlot, puis dans les capillaires qui s'étendent vers la périphérie perfusant ainsi les cellules  $\beta$  avant les autres types cellulaires, tel qu'observé *in vivo*. Ainsi, nos méthodes de culture ne permettent peut-être pas la perfusion complète

des cellules  $\beta$  situées au centre de l'îlot. Évidemment, cette étude a été effectuée dans des îlots de Langerhans de rongeurs, et non dans des îlots humains qui comportent de nombreuses différences (discuté au chapitre 2). La liaison d'ATF6 au promoteur de l'insuline dans les îlots humains devrait par conséquent être évaluée dans un futur rapproché.

Une seconde force de l'étude réside dans l'utilisation de deux méthodes distinctes pour confirmer la liaison d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à la boîte A5. Les expériences de retardement sur gel ont montré la liaison *in vitro* d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à un oligonucléotide dont la séquence correspond à la boîte A5 et ce, dans trois modèles cellulaires distincts, soit les cellules MCF7 (enrichies en ATF6), les cellules  $\beta$ -pancréatiques de hamster HIT-T15 et les îlots de Langerhans isolés de rat. La technique de retardement sur gel est une méthode relativement sensible, dû à l'utilisation d'acides nucléiques marqués avec un isotope radioactif incubés en présence d'extraits nucléaires soumis à différentes conditions de culture. Les complexes protéines-ADN formés sont ensuite soumis à une électrophorèse non dénaturante puis la distribution des complexes est déterminée par autoradiographie. Cette méthode comporte toutefois plusieurs limites. D'une part, la mobilité électrophorétique du complexe formé entre les protéines et l'ADN dépend de sa taille et n'identifie pas toutes les protéines qui sont présentes dans ce complexe. L'utilisation d'anticorps spécifiques permet de contourner ce problème *via* l'observation de la formation d'un complexe plus volumineux et retardé dans le gel, une technique appelée « *supershift* ». Par contre, ce ne sont pas tous les anticorps qui permettent ce genre d'expérience et les conditions de sels qui permettent la liaison de ces anticorps aux complexes protéines-ADN formés doivent être finement optimisées. Également, l'épitope reconnu par les anticorps dans ce type d'expérience est d'une importance cruciale. Dans notre étude, nous n'avons pas pu visualiser un « *supershift* » puisque les anticorps dirigés contre les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  reconnaissaient l'épitope de la protéine qui contenait le domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, l'incubation des anticorps avec les extraits nucléaires entraînait plutôt une séquestration des protéines ATF6 $\alpha$  ou ATF6 $\beta$  selon l'anticorps employé, d'où la présence d'un complexe de

plus faible intensité en présence de ces anticorps, et l'absence de « *supershift* ». D'autre part, l'oligonucléotide marqué correspond à une séquence nue, hors de son contexte d'histones. De ce fait, la méthode de retardement sur gel est moins pertinente que la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine, une technique qui a l'immense avantage de mesurer quantitativement les interactions protéine-ADN qui ont lieu dans le noyau de la cellule vivante. Dans le but de confirmer la liaison d'ATF6 à la boîte A5 du promoteur de l'insuline et afin de pallier aux limitations inhérentes à la technique de retardement sur gel, nous avons effectué des expériences d'immunoprécipitations de la chromatine dans les îlots de Langerhans isolés de rat. Brièvement, la liaison endogène de complexes protéines à une région d'ADN génomique est fixée puis la chromatine est fragmentée par les ultra-sons afin de scinder l'ADN en petits fragments. Par la suite, les complexes protéine-ADN sont immunoprécipités puis l'ADN est élué. La région d'intérêt, la boîte A5 du promoteur de l'insuline dans notre cas, est amplifiée par une méthode de PCR en temps réel *via* l'utilisation d'amorces spécifiques qui ciblent la région d'intérêt. Cette technique très sensible a permis la confirmation de la liaison endogène d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  à la boîte A5. Toutefois, cette technique est également limitée par l'efficacité de l'immunoprécipitation des complexes qui dépend des anticorps utilisés. En plus, la méthode de CHIP n'est pas un essai fonctionnel et ne peut pas démontrer la signification fonctionnelle de la liaison d'une protéine à l'ADN sur une région génomique d'intérêt. Cette limite est particulièrement problématique puisqu'un certain nombre d'études ont rapporté l'association de protéines à certaines régions génomiques d'intérêt sans qu'elle n'ait de fonction particulière [357-359].

Une troisième force de l'étude comprend la mesure de l'activité du promoteur de l'insuline afin de mesurer les effets de la liaison d'ATF6 sur l'activité transcriptionnelle du gène de l'insuline. Quoique le système employé soit moins pertinent dû à l'utilisation d'une lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques (car les îlots sont difficilement transfectables) et dû à la surexpression de protéines, nous avons tout de même mesuré l'activité du promoteur du gène de l'insuline en réponse à la surexpression d'ATF6 $\alpha$ -p50 et d'ATF6 $\beta$ -p60 par essai luciférase qui a révélé que seule la liaison d'ATF6 $\alpha$  à la région promotrice du gène de

l'insuline entraînait un effet fonctionnel qui se traduisait par l'inhibition de l'activité promotrice de l'insuline. Puisque ces effets répresseurs ont également été observés lorsque la boîte A5 est mutée ou tronquée, notre étude n'a pas permis d'élucider la contribution de la liaison directe d'ATF6 à la région promotrice du gène de l'insuline.

### *Travaux futurs*

Plusieurs travaux restent à accomplir pour compléter cette étude. Toutefois, les outils actuels disponibles commercialement limitent l'étude d'ATF6. Dans un premier temps, il serait intéressant d'inhiber l'expression d'ATF6 $\alpha$  et/ou d'ATF6 $\beta$  par la technologie de l'ARN interférant et de mesurer l'expression du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans suite à une exposition à la thapsigargine. Nous avons tenté cette approche, mais les ARNs interférants commerciaux que nous avons testés n'ont pas réduit les niveaux d'expression protéiques d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  dans la lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques HIT-T15. Dans un deuxième temps, et puisque ATF6 $\alpha$  et ATF6 $\beta$  hétérodimérisent et exercent divers niveaux de régulation transcriptionnelle suite à cette hétérodimérisation [243], il serait important de répéter la mesure de l'activité luciférase du promoteur de l'insuline en réponse à la cotransfection d'ATF6 $\alpha$ -p50 et d'ATF6 $\beta$ -p60 dans un ratio fidèle à leurs niveaux d'expression endogène, c'est-à-dire où l'expression d'ATF6 $\beta$  est 10 à 15 fois plus élevée que l'expression d'ATF6 $\alpha$  [243, 244].

### *Conclusions*

Malgré les limites qui y sont associées, cette étude a permis d'identifier ATF6 comme nouveau facteur de régulation de l'expression du gène de l'insuline. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline par la voie ATF6 de la réponse UPR pourrait représenter un mécanisme protecteur diminuant la charge de protéines dans le RE en conditions d'excès de nutriments et sera discuté plus en détail dans la section « Discussion » de la thèse.



## Article 2

**Titre: Lipopolysaccharides Impair Insulin Gene Expression in Isolated Islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- $\kappa$ B Signalling.**

**Auteurs:** Julie Amyot, Meriem Semache, Mourad Ferdaoussi, Ghislaine Fontés et Vincent Poitout.

**Cet article sera soumis dans:** PLoS ONE

### **Contribution des auteurs:**

**Julie Amyot:** Auteure principale ayant élaboré les hypothèses, effectué toutes les expériences à l'exception de l'immunohistochimie, analysé les résultats et rédigé le papier.

**Meriem Semache:** Coauteure ayant effectué les expériences d'immunohistochimie.

**Mourad Ferdaoussi:** Coauteur ayant participé à l'élaboration des hypothèses; participation à l'interprétation des résultats.

**Ghislaine Fontés:** Coauteure ayant généré le plasmide PDX-1-GFP.

**Vincent Poitout:** Directeur de thèse et investigateur principal. A dirigé et supervisé l'ensemble de ce projet de la genèse d'hypothèses à la rédaction du manuscrit.

## Mise en contexte de l'article 2

L'étiologie du DT2 est multifactorielle. Très récemment, un rôle pour le microbiome intestinal dans le développement de la résistance à l'insuline, du DT2 et de l'obésité a été suggéré. En effet, il a été rapporté que les individus diabétiques et les individus obèses présentent une flore intestinale altérée, enrichie en bactéries Gram négatif, qui présentent à leur surface des lipopolysaccharides (LPS) hautement immunogènes [327-333]. Ces LPS atteignent la circulation sanguine et vont entre autres affecter divers organes cibles tels que le foie, le tissu adipeux et les muscles, impliqués dans la résistance à l'insuline. Ces LPS se fixent au récepteur TLR4 et activent une réponse innée inflammatoire. Des études effectuées dans des modèles animaux soumis à une diète riche en gras et insulino-résistants ont démontré un rôle essentiel pour le récepteur TLR4. En effet, l'inactivation ou la mutation du gène *tlr4* entraîne une protection partielle contre la résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras et une obésité induite par la diète [273, 274, 318, 320, 321]. Également, il a été rapporté que les LPS affectent la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique *via* une suppression de la sécrétion d'insuline et de l'expression de son gène dans les îlots de Langerhans ainsi que dans une lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques [275, 276, 352]. Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent les effets délétères des LPS dans la régulation du gène de l'insuline sont, à ce jour, inconnus.

Dans cette étude qui sera soumise peu après le dépôt initial de cette thèse, nous avons tout d'abord évalué les effets des LPS sur la régulation du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans isolés de rat et humains *via* la mesure de l'ARN pré-messager de l'insuline. Dans le but d'évaluer l'importance du récepteur TLR4 dans les effets délétères des LPS sur la régulation du gène de l'insuline, les niveaux d'ARN pré-messagers de l'insuline ainsi que les niveaux d'ARNm de PDX-1 et de MafA ont été mesurés dans les îlots de Langerhans isolés de souris sauvages et de souris déficientes pour le récepteur TLR4 et exposés aux LPS. Ces souris présentent une mutation ponctuelle par substitution dans le 3<sup>e</sup> exon du gène *tlr4* (Pro<sup>712</sup>His) au niveau du domaine TIR. Cette mutation les rend très peu sensibles aux LPS puisque le récepteur TLR4 dans ces souris ne peut transmettre le signal.

La capacité de ces îlots à sécréter l'insuline en réponse au glucose, ou sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG), suite à une exposition aux LPS a été mesurée. Nous avons également effectué des expériences d'immunohistochimie afin d'évaluer la localisation subcellulaire de PDX-1 en réponse à l'exposition aux LPS dans une lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques. Enfin, par une approche pharmacologique, nous avons inhibé les voies NF- $\kappa$ B et p38, puis avons mesuré l'expression des niveaux d'ARN pré-messagers de l'insuline et les niveaux d'ARNm de PDX-1 et de MafA en réponse à une exposition aux LPS.

Ce second manuscrit était en préparation finale lors du dépôt initial de cette thèse. Les résultats présentés sont significatifs et reproductibles. Toutefois, nous préférons effectuer quelques expériences supplémentaires avant la soumission officielle dans le journal *PLoS ONE*. Ces expériences seront discutées dans la section « Discussion de l'article 2 » qui suit la présentation de ce manuscrit.

## **Lipopolysaccharides Impair Insulin Gene Expression in Isolated Islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- $\kappa$ B Signalling.**

Julie Amyot<sup>a,b</sup>, Meriem Semache<sup>a,b</sup>, Mourad Ferdaoussi<sup>a</sup>, Ghislaine Fontés<sup>a</sup> and Vincent Poitout<sup>a,b,c2</sup>

<sup>a</sup>*Montreal Diabetes Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Technopole Angus, 2901 Rachel Est, Montréal, QC, Canada, H1W 4A4*

*Departments of <sup>b</sup>Biochemistry and <sup>c</sup>Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, QC, Canada, H3C 3J7*

---

<sup>1</sup> Corresponding author: CRCHUM, Technopole Angus, 2901 Rachel Est, Montréal, QC, H1W 4A4, Canada, Tel: +1 514 890-8000 Ext: 23603, Fax: +1 514 412-7648

**Abstract**

**Background:** Type 2 diabetes is characterized by pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and is associated with low-grade inflammation. Recent observations suggest that the signalling cascade activated by lipopolysaccharides (LPS) binding to Toll-Like Receptor 4 (TLR4) exerts deleterious effects on pancreatic  $\beta$ -cell function; however, the molecular mechanisms of these effects are incompletely understood. In this study, we tested the hypothesis that LPS alters insulin gene expression via TLR4 and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) in islets.

**Methodology/Principal findings:** A 24-h exposure of isolated human, rat and mouse islets of Langerhans to LPS dose-dependently reduced insulin gene expression. This was associated in mouse and rat islets with decreased mRNA expression of pancreas-duodenum homebox-1 (PDX-1) and mammalian homologue of avian MafA/l-Maf (MafA). The observed decrease in glucose-induced insulin secretion in response to LPS was mostly due to a reduction in intracellular insulin stores resulting from defective insulin gene expression. LPS repression of insulin, PDX-1 and MafA expression was not observed in islets from TLR4-deficient mice and was completely prevented in rat islets by inhibition of the NF- $\kappa$ B, but not the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), pathway.

**Conclusions/Significance:** Our findings demonstrate that LPS inhibits  $\beta$ -cell gene expression in a TLR4-dependent manner and via NF- $\kappa$ B signaling in pancreatic islets, suggesting a novel mechanism by which the gut microbiota might affect pancreatic  $\beta$ -cell function.

## Introduction

The prevalence of diabetes mellitus is rising across the world, closely associated with a dramatic increase in obesity rates. Type 2 diabetes (T2D) is characterized by defective insulin secretion from the pancreatic  $\beta$ -cell and loss of insulin sensitivity in peripheral tissues. According to the “metainflammation” hypothesis, T2D is also considered as a state of chronic, systemic and low-grade inflammation [1]. Several inflammatory mediators such as acute-phase protein, cytokines and markers of endothelial activation are elevated in the circulation of T2D patients (reviewed in [2]). Pancreatic  $\beta$ -cells are capable, under certain pathological circumstances, of producing the inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) which can in turn impair  $\beta$ -cell function and induce apoptosis [3,4]. The proof-of-concept that inflammation plays a role in the pathogenesis of T2D has been provided by the results of a clinical trial showing that administration of an IL-1-receptor antagonist (IL-1Ra) improves glycemic control in T2D patients [5]. However, the molecular origin of the inflammatory condition observed in T2D remains largely unknown.

In recent years, the gut microbiota has been proposed as an environmental factor increasing the risk of metabolic disorders such as T2D, leading to the endotoxemia concept [6]. Accordingly, subjects with T2D present an altered microbiota reported to be enriched in gram-negative bacteria [7,8] which express lipopolysaccharides (LPS). This is associated with increased circulating levels of LPS and low-grade endotoxemia which plays a role, at least in part, in the onset of metabolic diseases. In support of this, modulation of the gut microflora in rodents reduces circulating levels of LPS and protects against diet-induced glucose intolerance, insulin resistance and inflammation [11-15]. Importantly, evidence for this concept is emerging in humans [9,10].

Circulating LPS bind Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and its co-receptors CD14 and MD-2. TLR4 homodimerizes and recruits the adaptor proteins Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) and Toll-IL-1 receptor (TIR) domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF) through their TIR domains, and activate nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), p38 mitogen-activated protein kinases

(p38 MAPK), activator protein 1 (AP-1) and interferon-inducible inflammatory gene expression. TLR4 is present in antigen-presenting cells, but also in non-immune cells such as adipocytes [16], myocytes [17] and pancreatic  $\beta$ -cells [18-20]. Interestingly, recent evidence suggests that activation of TLR4 signalling can induce both insulin resistance and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. Thus, deletion or mutation of TLR4 were shown to protect against fatty acid-induced insulin resistance and diet-induced obesity [16,17,21-23]. In addition, LPS inhibits insulin secretion and insulin gene expression in isolated islets of Langerhans and in  $\beta$ -cell lines [18-20]. However, the precise molecular and signalling mechanisms by which LPS affect  $\beta$ -cell function are unknown.

The aim of this study was to determine the molecular mechanisms by which LPS impairs insulin gene expression, and to test the hypothesis that this effect involves TLR4 and NF- $\kappa$ B signalling.

## **Results**

### **LPS impairs insulin pre-mRNA expression in isolated rat and human islets.**

First we examined the effects of LPS on insulin pre-mRNA expression in isolated islets. Isolated rat (Fig. 1A) and human (Fig.1B) islets were exposed for 24 h to increasing concentrations of LPS and insulin pre-mRNA (which reflects more accurately the transcription rates [24]) were measured. LPS dose-dependently decreased insulin 2 pre-mRNA expression in rat isolated islets (Fig. 1A; n=3-6; p<0.05), whereas human islets seemed much more sensitive to LPS, with a significant decrease in human insulin pre-mRNA expression observed at 0.1 ng/mL (Fig 1B; n=2-6; p<0.05). These results indicate that LPS inhibits insulin gene expression in isolated islets.

### **Exposure to LPS represses insulin, pancreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1) and mammalian homolog of avian MafA/L-Maf (MafA) gene expression via TLR4**

To investigate the role of TLR4 in the inhibitory effects of LPS on the insulin gene, islets from TLR4-deficient C3H/HeJ mice, which harbour a missense mutation in the *tlr4*

gene rendering TLR4 unable to signal in response to LPS, and wild-type (WT) littermates C3H/HeOuJ mice were isolated and exposed for 24h to 2.8 and 16.7 mM glucose in the presence or absence of the maximal concentration of 5000 ng/mL LPS, palmitate (0.5 mM) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 5 ng/mL) were used as positive controls. As expected, exposure to glucose increased insulin 2 pre-mRNA levels, and this was greatly reduced in the concomitant presence of palmitate or IL-1 $\beta$ , both in WT and TLR4-deficient islets. Consistent with the results shown in Fig. 1A, LPS reduced insulin 2 pre-mRNA expression in WT islets (Fig. 2A; n=6; p<0.05). However, no significant reduction in insulin 2 pre-mRNA was observed in response to LPS in TLR4-deficient islets (Fig. 2A).

Insulin gene expression in adult  $\beta$ -cells is regulated, amongst others, by the glucose-responsive transcription factors Pdx-1 and MafA [25]. To examine whether the mechanisms by which LPS inhibits insulin gene expression involve changes in expression of these transcription factors, we measured their mRNA levels in islets from WT and TLR4-deficient mice under the same conditions as described above. As expected, both palmitate and IL-1 $\beta$  suppressed PDX-1 and MafA mRNA expression in both WT and TLR4-deficient mice (Fig. 2B & C). LPS inhibited both PDX-1 and MafA mRNA levels in islets isolated from WT mice, but not in islets isolated from TLR4-deficient mice. Taken together, these data demonstrate that LPS represses insulin, PDX-1 and MafA gene expression and that this effect requires TLR4.

### **Exposure to LPS reduces PDX-1 protein expression but not its nuclear localization**

Chronic exposure to palmitate inhibits insulin gene expression in islets in part via exclusion of PDX-1 from the nuclear compartment [26-28]. To examine whether LPS acts via a similar mechanism, a PDX-1-GFP construct was overexpressed in HIT-T15 insulin-secreting cells and exposed to 0.1 mM glucose or 5.0 mM glucose in the presence or absence of 0.5 mM palmitate or increasing doses of LPS for 24 h. PDX-1 expression and subcellular localization was visualized using GFP fluorescence under a confocal microscope (Fig. 3A-F). Nuclei were visualized using DAPI staining (Fig. 3G-L). As expected, PDX-1 expression at 0.1 mM glucose was low in intensity and restricted to the



cytosol (Fig. 3A&G). In response to high (5.0 mM) glucose, PDX-1 was more intensely expressed and predominantly localized in the nucleus (Fig. 3B&H). As we previously observed [27,28], addition of palmitate both diminished the intensity of the PDX-1 signal and restricted its localization to the cytosolic compartment (Fig. 3C&I). In contrast, exposure of HIT-T15 cells to increasing doses of LPS did not affect PDX-1 nuclear localization, although the intensity of the signal was reduced (Fig. 3D-F&J-L).

### **The decrease in insulin secretion in response to LPS mostly results from a reduction in intracellular insulin content**

LPS has been reported to inhibit glucose-induced insulin secretion (GSIS) in isolated islets [18,20]. To assess the role of TLR4 in the impairment of GSIS by LPS, islets from WT and TLR4-deficient mice were cultured for 24 h at 16.7 mM glucose in the presence or absence of 5000 ng/mL LPS, after which GSIS was measured in 1-h static incubations (Fig. 4). Basal insulin secretion was not significantly different between WT and TLR4-deficient islets in the absence or presence of LPS. Stimulated insulin release (in response to 16.7 mM glucose) from WT islets was slightly but significantly lower in the presence of LPS (Fig. 4A; n=5; p<0.05). Moreover, this effect appeared to be dependent upon the presence of TLR4 since GSIS from islets isolated from TLR4-deficient mice was not affected by LPS (Fig. 4A; n=5; ns). However, insulin content from islets isolated from both genotypes trended lower after LPS exposure (Fig.4B), such that when normalized to intracellular insulin content, the difference in GSIS between LPS-exposed and control WT islets was no longer significant (Fig. 4C). These results suggest that the decrease in GSIS in response to LPS mostly results from a decrease in intracellular insulin stores, consistent with the observed repression of insulin gene expression by LPS (Figs. 1&2), rather than from a bone fide impairment of insulin exocytosis.

### **LPS inhibition of insulin, PDX-1, and MafA gene expression is prevented by inhibition of NF- $\kappa$ B but not p38 MAPK.**

TLR4 signalling involves both the NF $\kappa$ B and p38 MAPK pathways. To examine the implication of these pathways in LPS inhibition of  $\beta$ -cell gene expression, we used the soluble p38 MAPK inhibitor SB202190 (10  $\mu$ M) and the NF- $\kappa$ B inhibitor IKK-2 Inhibitor IV (10  $\mu$ M) (Fig. 4) in isolated rat islets cultured for 24h at 16.7 mM glucose in the presence or absence of 10 ng/mL LPS. IL-1 $\beta$  (5 ng/mL) was used as a positive control known to signal via NF- $\kappa$ B [3]. As observed in Fig. 2 in mouse islets, both LPS and IL1  $\beta$  decreased insulin 2 pre-mRNA expression in rat islets (Fig. 5A). This was completely prevented in the presence of the NF- $\kappa$ B inhibitor, but not of the p38 MAPK inhibitor (Fig. 5C; n=3-4; p<0.05). In addition, the NF- $\kappa$ B inhibitor, but not the p38 MAPK inhibitor, completely prevented the decrease in PDX-1 (Fig. 5B; n=4; p<0.05) and MafA (Fig. 5C; n=4; p<0.05) expression in response to LPS. Using nuclear extracts, we also examined NF- $\kappa$ B nuclear expression by immunoblotting in rat and human isolated islets exposed for 24 h to 16.7 mM glucose in the presence or the absence of 50 or 100 ng/mL LPS. Consistent with these observations, nuclear extracts for both rat and human islets exposed to LPS were enriched in the p65 subunit of NF- $\kappa$ B (Supp. Fig. 1A&B; n=3; p<0.05). In addition, expression of the NF- $\kappa$ B target gene TNF- $\alpha$  was increased in rat islets after a 24-h exposure to 10 ng/mL LPS (Supp.Fig.1C; n=4; p<0.05), confirming activation of the pathway. These data therefore demonstrate that the TLR4-dependent impairment of insulin, PDX-1, and MafA gene expression in islets requires NF- $\kappa$ B signalling.

## Discussion

TLRs are one of the most ancient and conserved components of the innate immune system and play key roles in recognizing pathogen-associated molecules such as LPS. As many as 12 and 10 different isoforms of TLRs have been identified in human and rodents, respectively. Pancreatic  $\beta$ -cells express significant levels of TLR4 which render them sensitive to LPS [18-20]. This study was designed to identify the molecular mechanisms underlying the deleterious effects of LPS on pancreatic  $\beta$ -cell function. Our results

uniquely demonstrate the requirement for TLR4 and NF- $\kappa$ B signalling in LPS impairment of  $\beta$ -cell gene expression.

Insulin gene expression, essentially restricted to pancreatic  $\beta$ -cells in adults, is tightly regulated by a highly sophisticated transcriptional network. In response to stimulatory glucose conditions, PDX-1, MafA and BETA2/NeuroD bind respectively to the A3, C1 and E1 cis-acting DNA elements on the proximal insulin gene promoter region and activate insulin transcription in a synergistic and coordinated manner (reviewed in [25,29]). In addition to its major effects on the binding of PDX-1 and MafA to the insulin gene promoter, glucose also stimulates MafA expression [30] and promotes PDX-1 translocation from the cytoplasm to the nucleus [31]. On the other hand, insulin gene expression is altered under some pathological circumstances, such as chronically excessive levels of glucose or fatty acids [32]. Thus, elevated fatty acids inhibit insulin gene expression via impaired PDX-1 nuclear localization and decreased binding of PDX-1 and MafA to the proximal insulin gene promoter region [27,28,33].

In the present study, we confirmed that LPS impairs insulin gene expression in human islets [18]. Importantly, we found human islets to be much more sensitive to LPS than rat islets, as insulin pre-mRNA levels were significantly decreased in human islets at the lowest dose of LPS used in this study (0.1 ng/mL). Since circulating LPS concentrations are reported to be in the ng/mL range in endotoxemia associated with metabolic diseases [10], our results suggest that LPS inhibition of insulin gene expression might occur in vivo in humans.

Using isolated islets from a mouse model harboring a TLR4 mutation that renders it unresponsive to LPS, we further showed, to our knowledge for the first time, that TLR4 is required for the effects of LPS, but not those of palmitate, on insulin gene expression. This is in contrast to a recent study reporting a role for TLR4 in mediating palmitate-induced apoptosis in insulin-secreting INS1 cells [35], a discrepancy which might be explained by different mechanisms underlying fatty-acid cytotoxicity vs. their effects on the insulin gene, and/or differences between cell lines and primary islets. We have previously shown that exposure of isolated islets to exogenous palmitate leads to an increase in intracellular ceramide content via *de novo* synthesis [33]. Ceramide generation has recently been shown

to mediate saturated fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle via TLR4 signalling [34]. In contrast, our results showing that palmitate inhibition of insulin gene expression still occurs in the absence of a functional TLR4 indicate that TLR4 signalling is dispensable for fatty-acid-induced  $\beta$ -cell dysfunction. Our results also show that LPS reduces PDX-1 and MafA mRNA expression in a TLR4-dependent manner without affecting PDX-1 nuclear localization. This mechanism of action is therefore different from that of palmitate, which affects MafA and PDX-1 expression as well as PDX-1 nuclear translocation ([27,28] and Fig. 3).

It has been previously shown that exposure of isolated islets or  $\beta$ -cell lines to LPS decreases insulin secretion [18,20]. Here we confirmed that GSIS was reduced in isolated mouse islets in response to LPS and that this requires a functional TLR4. However, our data suggest that when expressed as a percentage of intracellular insulin content GSIS was no longer significantly altered by LPS, suggesting that the main inhibitory effect of LPS is on insulin biosynthesis rather than on insulin secretion per se. Our results are consistent with a recent report by Kiely et al. [19] but not with other studies [18,20], a discrepancy which might be explained by differences in the protocol used for measuring GSIS. Thus, Garay-Malpartida et al. [18] measured cumulative insulin secretion in the culture media after a 48-h LPS exposure rather than the acute  $\beta$ -cell capacity to secrete insulin in response to glucose, and the observed decrease in these conditions which could indirectly result from cell death and/or decreased insulin biosynthesis. On the other hand, Vives-Pi et al. [20] reported that LPS modestly decreased insulin secretion without affecting insulin content in isolated islets, but used a lower dose of LPS (100 ng/mL) and a shorter exposure time (18 h).

The transcription factor NF- $\kappa$ B plays a central role in the innate immune response and in inflammatory processes [36]. In resting cells, NF- $\kappa$ B is retained in the cytoplasm via its binding to the inhibitor protein  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). In response to stimuli such as IL-1 $\beta$  and LPS, the interaction between inhibitor kinase (IKK) complex and I $\kappa$ B leads to its phosphorylation. I $\kappa$ B is subsequently ubiquitinated and degraded, enabling the release and translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus and subsequent activation of its target genes such as TNF- $\alpha$  [37,38].

In this study, we demonstrate that LPS exposure increases NF- $\kappa$ Bp65 nuclear localization in both rat and human islets. We further showed that pharmacological suppression of the NF- $\kappa$ B pathway completely restores insulin, PDX-1 and MafA gene expression upon LPS exposure. The question then arises as to how does NF- $\kappa$ B repress insulin gene expression in response to LPS? In pancreatic  $\beta$ -cells, NF- $\kappa$ B is a key regulator of  $\beta$ -cell survival and function [39-42]. Cytokine-induced NF- $\kappa$ B activation has been reported to decrease PDX-1 mRNA expression [43]. Here, we report that LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B reduces insulin, PDX-1 and MafA mRNA levels. Thus, the reduction in insulin gene expression by NF- $\kappa$ B can be indirectly due to its inhibition of two key transcription factors, PDX-1 and MafA (Figure 6). Since there are no known NF- $\kappa$ B binding sites on the insulin, PDX-1 or MafA promoters, inhibition of these genes by NF- $\kappa$ B might be mediated through interactions with other proteins. For instance, we observed that LPS increase C/EBP $\beta$  (CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$ ) mRNA expression in isolated islets from WT mice, but not in TLR4-deficient mice (data not shown). It is therefore conceivable that the p65 subunit of NF- $\kappa$ B might interact with C/EBP $\beta$ , a known repressor of the insulin gene [44-46], and increase C/EBP $\beta$  binding to the insulin promoter, as seen in other cell types [47,48], thereby repressing insulin gene transcription. Another factor known to interact with NF- $\kappa$ Bp50 is the cAMP response element (CRE)-binding protein (CREB) [49]. Since CREB induces insulin gene transcription (reviewed in [50]), it is conceivable that an interaction between CREB and NF- $\kappa$ B might prevent the binding of CREB to the insulin promoter.

Our results reveal a role for TLR4 in LPS-mediated  $\beta$ -cell dysfunction. TLR4 signalling has recently been reported to impair insulin secretion and insulin mRNA expression in human islets via its activation by the chemokine CXCL10 [51], but the effects of LPS were not examined in that study. On the other hand TRIF, a critical molecule in the TLR signalling pathway, was recently shown to be important for normal  $\beta$ -cell function [52]. Thus, TRIF<sup>-/-</sup> mice exhibit hyperglycemia, impaired glucose tolerance, and defective GSIS [52]. This suggests that TRIF might be required for normal  $\beta$ -cell function but might

become deleterious when chronically activated in response to LPS. A similar dual effect has been reported for NF- $\kappa$ B [53].

Finally, pancreatic  $\beta$ -cells express significant levels of TLR2 [20] which can recognize bacterial lipopeptides [54], including LPS [55,56]. Moreover, TLR2 expression is induced by LPS [57] and it has been recently proposed that up-regulation of TLR2 by low levels of bacterial products can participate in the mechanisms by which the immune system increases its response to an infection [58]. It is therefore possible that TLR2 amplifies TLR4 signalling in response to LPS and might have contributed in some of the effects observed in this study, although this remains to be directly examined.

In conclusion, this study uniquely demonstrates that impairment of insulin gene expression by LPS involves decreased PDX-1 and MafA mRNA levels and requires TLR4 and NF- $\kappa$ B signalling. Importantly, the effects of LPS on the insulin gene in human islets were observed at concentrations similar to the circulating levels achieved during endotoxemia, suggesting that direct repression of the insulin gene might contribute to the metabolic disturbances associated with alterations of the microbiota.

## **Material and methods**

### **Reagents**

RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). PBS was obtained from Multicell. Fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) was from Equitech-Bio (Kerrville, TX, USA). SB202190 and IKK-2 Inhibitor IV were from Calbiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Palmitate (sodium salt), LPS (from *Escherichia Coli* O111:B4) and all other reagents (analytical grade) were from Sigma unless otherwise noted.

### Islets isolation and culture

Human islets - The use of human islets was approved by the Institutional Ethics Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Isolated islets from non-diabetic human cadaveric donors were obtained from the NIH/NIDDK-supported Integrated Islet Distribution Program (<http://www.iidp.coh.org>), and from the Clinical Islet Laboratory at the University of Alberta.

Rodent islets - All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. 8 week-old WT (C3H/HeO<sub>u</sub>J) and TLR4-deficient (C3H/HeJ) mice (harboring a missense mutation in the *tlr4* gene rendering TLR4 unable to signal in response to LPS) were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA). 250-275 g male Wistar rats were obtained from Charles River (St.-Constant, QC, Canada). Animals were housed under controlled temperature (21°C) and a 12-h light-dark cycle with free access to water and standard laboratory chow. Mice and rats were anesthetized by IP injection of a Ketamine Hydrochloride (Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON) / Xylazine (Bayer Inc., Toronto, ON) mixture and islets were isolated by collagenase digestion and dextran density gradient centrifugation as described previously [59].

Culture - Isolated islets were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum and exposed for 24 h to 2.8 or 16.7 mM glucose in the presence or the absence of palmitate, IL-1 $\beta$  or LPS. The preparation of culture media containing palmitate was as described previously [33] with a final molar ratio of palmitate/BSA of 5:1. HIT-T15 cells (passages 75-78; obtained from R.P. Robertson (Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, WA, USA)) were maintained in RPMI-1640 media containing 10% FBS and 11.1 mM glucose as described [60].

### RNA extraction and Real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from aliquots of 150 islets each using the RNeasy Qiagen micro-kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON), reverse transcribed, and real-time RT-PCR was carried out using the Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON), as previously described [28]. To amplify preproinsulin pre-mRNA (Ins pre-mRNA), a forward primer was designed against a sequence in exon 2 and a reverse primer designed against a

sequence in intron 2, as described [59,61]. Primers used for real-time RT-PCR are listed in Supplementary Table 1. All primer sets were designed using Primer3 [62]. Results are expressed as the ratio of target mRNA to  $\beta$ -actin mRNA.

#### PDX-1-GFP plasmids, transient transfections and immunohistochemistry

The expression vector encoding PDX-1-GFP was generated as follows: A vector encoding a PDX-1-GFP fusion protein was generated from a PDX1-cMyc construct [31]. Briefly, after stop codon removal from the initial PDX1-cMyc sequence, the amplified 906-nucleotide fragment was restricted by HindIII and KpnI, and ligated into the mammalian expression vector pcDNA3.1-GFP in line with the open-reading frame. For transient transfections, HIT-T15 cells (passages 75 to 78) were seeded in 24-well plates at a density of 80 000 cells/well 2 days before transfection. Cells were transfected with a total of 0.8  $\mu$ g PDX-1-GFP DNA and 2  $\mu$ L Lipofectamine 2000. Cells were fixed 24 h following various treatments (see results) with 3.7% formaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min and cold methanol for 20 min. After blocking with 5% normal horse serum, cells were incubated with 10  $\mu$ g/mL DAPI. Cells were observed under a Leica TCS SP5 confocal microscope (63X Oil) (Leica Microsystems [Canada], Richmond Hill, ON).

#### Nuclear protein preparation and Western blot analyses

Nuclear proteins (10  $\mu$ g) from isolated rat or human islets were prepared and subjected to 10% SDS PAGE as previously described [27]. Immunoblots were performed with anti-NF-KBp65 (Cell signalling, Boston, MA, USA) and anti-HDAC1 (Millipore, Billerica, MA, USA) antibodies. Signals were detected using a horseradish peroxidase-labeled anti-rabbitIgG (BioRad) and enhanced chemiluminescence (ECL, PerkinElmer Las Canada Inc., Woodbridge, ON) on Kodak films (Kodak, Rochester, NY, USA).

#### Insulin secretion in isolated islets



Insulin secretion was assessed in 1-h static incubations as described [63]. Briefly, batches of 10 islets were washed twice in Krebs-Ringer buffer containing 0.1% BSA and 2.8 mM glucose for 20 min at 37°C, then incubated for 1 h at 37°C in either 2.8 or 16.7 mM glucose. Each condition was run in triplicate. Intracellular insulin content was determined after acidified-ethanol extraction. Insulin was measured by radioimmunoassay (LINCO Research, St. Charles, MO, USA).

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc adjustment for simple comparisons or by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc adjustment for multiple comparisons.  $p < 0.05$  was considered significant.

#### Acknowledgements

We thank Drs James Shapiro and Tatsuya Kin from the University of Alberta as well as the Coordinating Center of the NIH/NIDDK-supported Integrated Islet Distribution Program for providing isolated human islets. We also thank R. P. Robertson (Pacific Northwest Diabetes Research Institute, Seattle, WA, USA) for the HIT-T15 cell line. We are grateful to B. Zarrouki for helpful discussions and to M. Ethier and G. Fergusson for valuable technical assistance.

## References

1. Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867.
2. Kolb H, Mandrup-Poulsen T (2005) An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48: 1038-1050.
3. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, et al. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110: 851-860.
4. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, et al. (2001) Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50: 1683-1690.
5. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, et al. (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356: 1517-1526.
6. Cani PD, Delzenne NM (2007) Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 729-734.
7. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, et al. (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5: e9085.
8. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, et al. (2010) Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol* 61: 69-78.
9. Anderson PD, Mehta NN, Wolfe ML, Hinkle CC, Pruscino L, et al. (2007) Innate immunity modulates adipokines in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2272-2279.
10. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, et al. (2007) Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E740-747.
11. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, et al. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481.
12. Cani PD, Hoste S, Guiot Y, Delzenne NM (2007) Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br J Nutr* 98: 32-37.
13. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, et al. (2009) Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr* 90: 1236-1243.
14. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, et al. (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091-1103.

15. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, et al. (2008) Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J* 22: 2416-2426.
16. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, et al. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-3025.
17. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, et al. (2007) Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1986-1998.
18. Garay-Malpartida HM, Mourao RF, Mantovani M, Santos IA, Sogayar MC, et al. (2011) Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunol* 12: 18.
19. Kiely A, Robinson A, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P (2009) Toll-like receptor agonist induced changes in clonal rat BRIN-BD11 beta-cell insulin secretion and signal transduction. *J Endocrinol* 202: 365-373.
20. Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Alvarez J, Vargas F, Caro P, et al. (2003) Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 133: 208-218.
21. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME (2008) Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)* 16: 1248-1255.
22. Poggi M, Bastelica D, Gual P, Iglesias MA, Gremeaux T, et al. (2007) C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 50: 1267-1276.
23. Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, et al. (2007) Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 45-49.
24. Iype T, Francis J, Garmey JC, Schisler JC, Nesher R, et al. (2005) Mechanism of insulin Gene Regulation by the Pancreatic Transcription Factor Pdx-1: APPLICATION OF PRE-mRNA ANALYSIS AND CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION TO ASSESS FORMATION OF FUNCTIONAL TRANSCRIPTIONAL COMPLEXES. *J Biol Chem* 280: 16798-16807.
25. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, et al. (2006) Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136: 873-876.
26. Fontes G, Semache M, Hagman DK, Tremblay C, Shah R, et al. (2009) Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 58: 2048-2058.
27. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V (2005) Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 280: 32413-32418.
28. Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK, Fontes G, Amyot J, et al. (2008) Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 57: 424-431.

29. Poitout V, Stein R, Rhodes CJ. (2004) Insulin gene expression and biosynthesis. In: DeFronzo RA FE, Keen H, Zimmet P, eds., editor. International textbook of diabetes mellitus. 3rd ed. ed: John Wiley & Sons.
30. Zhao L, Guo M, Matsuoka TA, Hagman DK, Parazzoli SD, et al. (2005) The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem* 280: 11887-11894.
31. Rafiq I, Kennedy HJ, Rutter GA (1998) Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *J Biol Chem* 273: 23241-23247.
32. Poitout V, Robertson RP (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29: 351-366.
33. Kelpke CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, et al. (2003) Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem* 278: 30015-30021.
34. Holland WL, Bikman BT, Wang LP, Yuguang G, Sargent KM, et al. (2011) Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 121: 1858-1870.
35. Lee SM, Choi SE, Lee JH, Lee JJ, Jung IR, et al. (2011) Involvement of the TLR4 (Toll-like receptor4) signaling pathway in palmitate-induced INS-1 beta cell death. *Molecular and cellular biochemistry* 354: 207-217.
36. Barnes PJ, Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071.
37. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, et al. (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 84-91.
38. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183-190.
39. Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, et al. (2001) Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes* 50: 2219-2224.
40. Norlin S, Ahlgren U, Edlund H (2005) Nuclear factor-kappaB activity in beta-cells is required for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 54: 125-132.
41. Chang I, Kim S, Kim JY, Cho N, Kim YH, et al. (2003) Nuclear factor kappaB protects pancreatic beta-cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *Diabetes* 52: 1169-1175.
42. Kim S, Millet I, Kim HS, Kim JY, Han MS, et al. (2007) NF-kappa B prevents beta cell death and autoimmune diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1913-1918.

43. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, et al. (2001) A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276: 48879-48886.
44. Lawrence MC, McGlynn K, Park BH, Cobb MH (2005) ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol Chem* 280: 26751-26759.
45. Lu M, Seufert J, Habener JF (1997) Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem* 272: 28349-28359.
46. Seufert J, Weir GC, Habener JF (1998) Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 101: 2528-2539.
47. Zwergal A, Quirling M, Saugel B, Huth KC, Sydlik C, et al. (2006) C/EBP beta blocks p65 phosphorylation and thereby NF-kappa B-mediated transcription in TNF-tolerant cells. *J Immunol* 177: 665-672.
48. Cha-Molstad H, Young DP, Kushner I, Samols D (2007) The interaction of C-Rel with C/EBPbeta enhances C/EBPbeta binding to the C-reactive protein gene promoter. *Mol Immunol* 44: 2933-2942.
49. He B, Weber GF (2004) Synergistic activation of the CMV promoter by NF-kappaB P50 and PKG. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 13-20.
50. Docherty K, Clark AR (1994) Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J* 8: 20-27.
51. Schulthess FT, Paroni F, Sauter NS, Shu L, Ribaux P, et al. (2009) CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling. *Cell Metab* 9: 125-139.
52. Hutton MJ, Soukhatcheva G, Johnson JD, Verchere CB (2010) Role of the TLR signaling molecule TRIF in beta-cell function and glucose homeostasis. *Islets* 2: 104-111.
53. Hammar EB, Irminger JC, Rickenbach K, Parnaud G, Ribaux P, et al. (2005) Activation of NF-kappaB by extracellular matrix is involved in spreading and glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 280: 30630-30637.
54. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, et al. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274: 33419-33425.
55. Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 188: 2091-2097.
56. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, et al. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395: 284-288.
57. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, et al. (2000) The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 275: 24255-24263.

58. Nilsen N, Nonstad U, Khan N, Knetter CF, Akira S, et al. (2004) Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88. *J Biol Chem* 279: 39727-39735.
59. Briaud I, Harmon JS, Kelpe CL, Segu VB, Poitout V (2001) Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 50: 315-321.
60. Zhang HJ, Walseth TF, Robertson RP (1989) Insulin secretion and cAMP metabolism in HIT cells. Reciprocal and serial passage-dependent relationships. *Diabetes* 38: 44-48.
61. Evans-Molina C, Garmey JC, Ketchum R, Brayman KL, Deng S, et al. (2007) Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets. *Diabetes* 56: 827-835.
62. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
63. Poitout V, Rouault C, Guerre-Millo M, Briaud I, Reach G (1998) Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans. *Endocrinology* 139: 822-826.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Exposure to LPS dose-dependently represses insulin pre-mRNA expression in isolated rat and human islets.** Insulin pre-mRNA levels in response to increasing doses of LPS (0.1 to 1000 or 5000 ng/mL) in isolated rat (A) and human (B) islets. Pre-mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Data are mean  $\pm$  S.E.M. of 2-6 independent experiments; \* $p$ <0.05 vs 0 ng/mL.

**Figure 2: Exposure to LPS decreases insulin, PDX-1 and MafA gene expression in isolated islets via TLR4.** (A) Insulin pre-mRNA expression (B) PDX-1 mRNA expression and (C) MafA mRNA expression in islets isolated from WT and TLR4-deficient mice exposed for 24 h to 2.8 (2.8G) and 16.7 mM (16.7G) glucose in the presence or absence of 0.5 mM palmitate (PA), 5 ng/mL IL-1 $\beta$  or 5000 ng/mL LPS. mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to  $\beta$ -actin mRNA levels. Data are mean  $\pm$  S.E.M. of 6 independent experiments; \* $p$ <0.05.

**Figure 3: PDX-1 protein expression and localization in response to LPS. HIT-T15 cells were transfected with a construct encoding a PDX-1-GFP fusion protein.** PDX-1 localization (green) (A-F) was visualized by GFP fluorescence using a laser-scanning confocal microscope in cells cultured in 0.1 and 5 mM glucose with or without 0.5 mM palmitate or increasing doses of LPS (50, 100 or 1000 ng/mL). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue) was used for nuclear staining (G-L).

**Figure 4: Insulin secretion in WT and TLR4-deficient mouse islets.** Insulin secretion (A), insulin content (B) and normalized insulin secretion (C) as assessed in 1-h static incubations of isolated WT and TLR4-deficient islets at basal (2.8 mM) and stimulatory (16.7 mM) glucose following a 24-h exposure to 16.7 mM glucose in the presence or absence of 5000 ng/mL LPS. Data are mean  $\pm$  S.E.M. from 5 independent experiments. \* $p$ <0.05.

**Figure 5: Inhibition of NF- $\kappa$ B, but not p38 MAPK, restores insulin, PDX-1, and MafA gene expression in rat islets exposed to LPS.** (A) Insulin pre-mRNA, (B) PDX-1 mRNA and (C) MafA mRNA expression in isolated rat islets exposed for 24 h to 16.7 mM (16.7G) glucose in the presence or absence of 10 ng/mL LPS or 5 ng/mL IL-1 $\beta$  with or without SB202190 (10  $\mu$ M) and IKK-2 Inh IV (10  $\mu$ M). Data are mean  $\pm$  S.E.M. of 3-4 independent experiments. \* $p$ <0.05.

**Figure 6: Potential mechanism by which LPS represses insulin gene expression in isolated islets.** Exposure to LPS activates the NF- $\kappa$ B pathway in isolated islets which leads to decreased expression levels of insulin, PDX-1 and MafA. The observed decrease in insulin expression might result from an indirect effect of LPS on PDX-1 and MafA expression. Since there are no known NF- $\kappa$ B sites on the insulin, PDX-1 and MafA promoters, NF- $\kappa$ B could also inhibit insulin gene expression by interacting with other proteins such as C/EBP $\beta$  and/or CREB, as observed in other cell types, and affect their binding to the insulin gene promoter, thus repressing the insulin gene.

**Supplementary figure 1: LPS activates NF- $\kappa$ B signaling and TNF- $\alpha$  mRNA expression in isolated rat islets.** (A) Representative immunoblot of nuclear extracts using antibodies against NF- $\kappa$ Bp65 and HDAC1 in rat islets exposed for 24 h to 16.7mM (16.7G) glucose in the presence or absence of 100 ng/mL LPS, or human islets exposed for 24 h to 16.7mM (16.7G) glucose in the presence or absence of 50 ng/mL LPS. (B) Quantification of NF- $\kappa$ Bp65 nuclear expression in rat islets exposed for 24 h to 16.7mM (16.7G) glucose in the presence or the absence of 100 ng/mL LPS (n=3) (C) TNF- $\alpha$  mRNA expression in rat isolated islets exposed for 24 h to 16.7 mM (16.7G) glucose in the presence or the absence of 10 ng/mL LPS or 5 ng/mL IL-1 $\beta$ . Data are mean  $\pm$  S.E.M. of 4 independent experiments. \* $p$ <0.05.



**Supplementary Table 1: Primer sequences for real-time RT-PCR.**

<b>Target</b>	<b>Sense primer (5'-3')</b>	<b>Anti-sense primer (5'-3')</b>
<b>Human</b>		
hIns pre-mRNA	tgactgtgtcctctctgtgtcc	acaatgccacgttctgc
h $\beta$ -actin	ggacttcgagcaagagatgg	agcactgtgttggcgtacag
<b>Rat</b>		
rIns2 pre-mRNA	agcgtggattcttctacacacc	aaggattctcactccttcttgg
r $\beta$ -actin	acgaggcccagagcaaga	ttggtacaatgccgtgttca
rPDX-1	gaaccggaggagaataagagg	agtcaagttgagcatcactgc
rMafA	aggaggaggtcatccgactg	cttctcgctctccagaatgtg
<b>Mouse</b>		
mIns2 pre-mRNA	tgtgtccatccatgaccagt	cagtgcccaaggtctgaaggt
mPDX-1	ggtatagccggagagatgc	ctggtccgtattggaacg
mMafA	atcaccatcaccaccatcac	tgacctcctccttgetgaag
m $\beta$ -actin	catggatgacgatatcgctgc	gtacgaccagaggcatacagg

Figure 1 – Amyot et al.

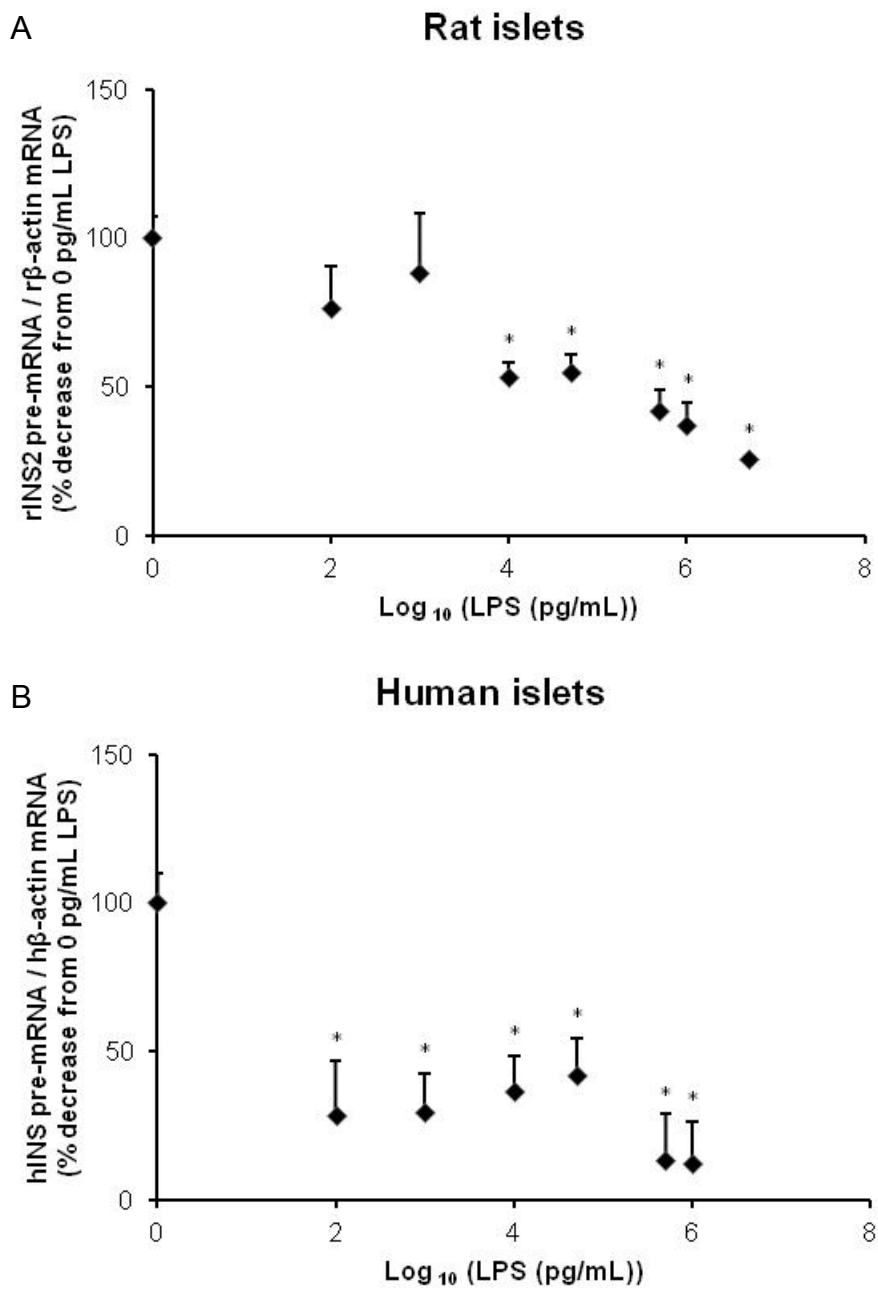


Figure 2 – Amyot et al.

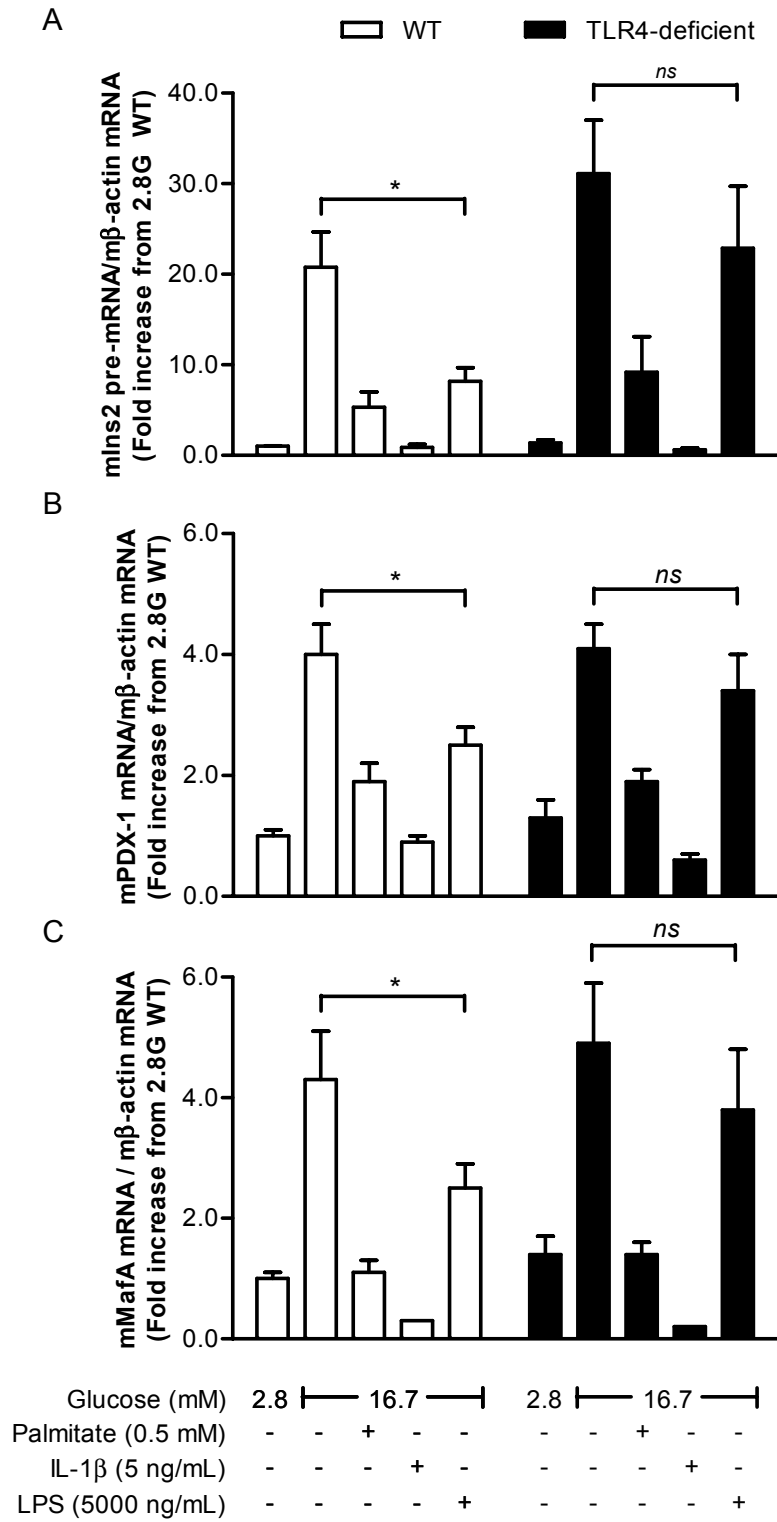


Figure 3 – Amyot et al.

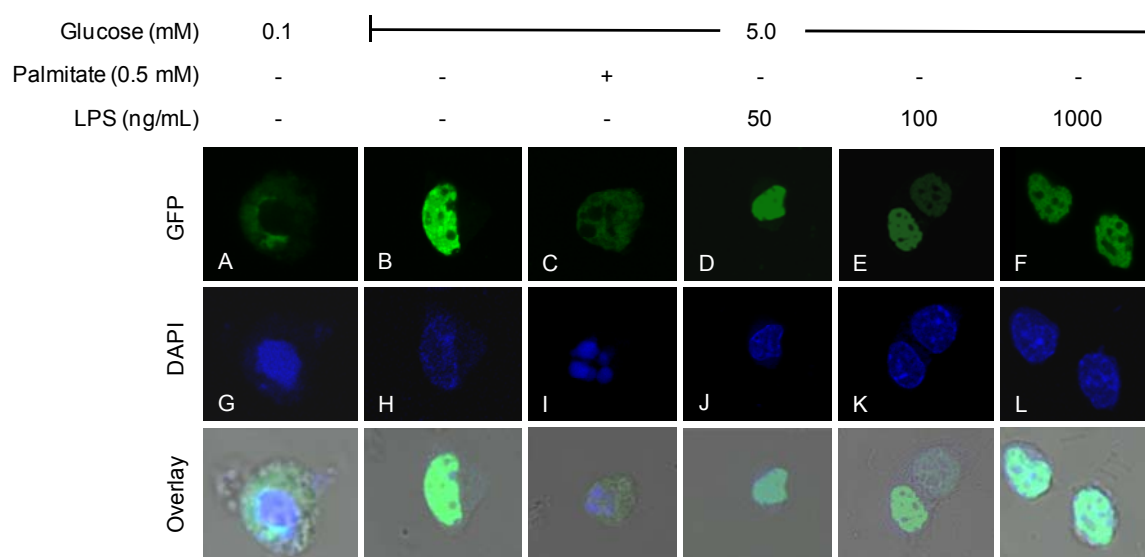


Figure 4 – Amyot et al.

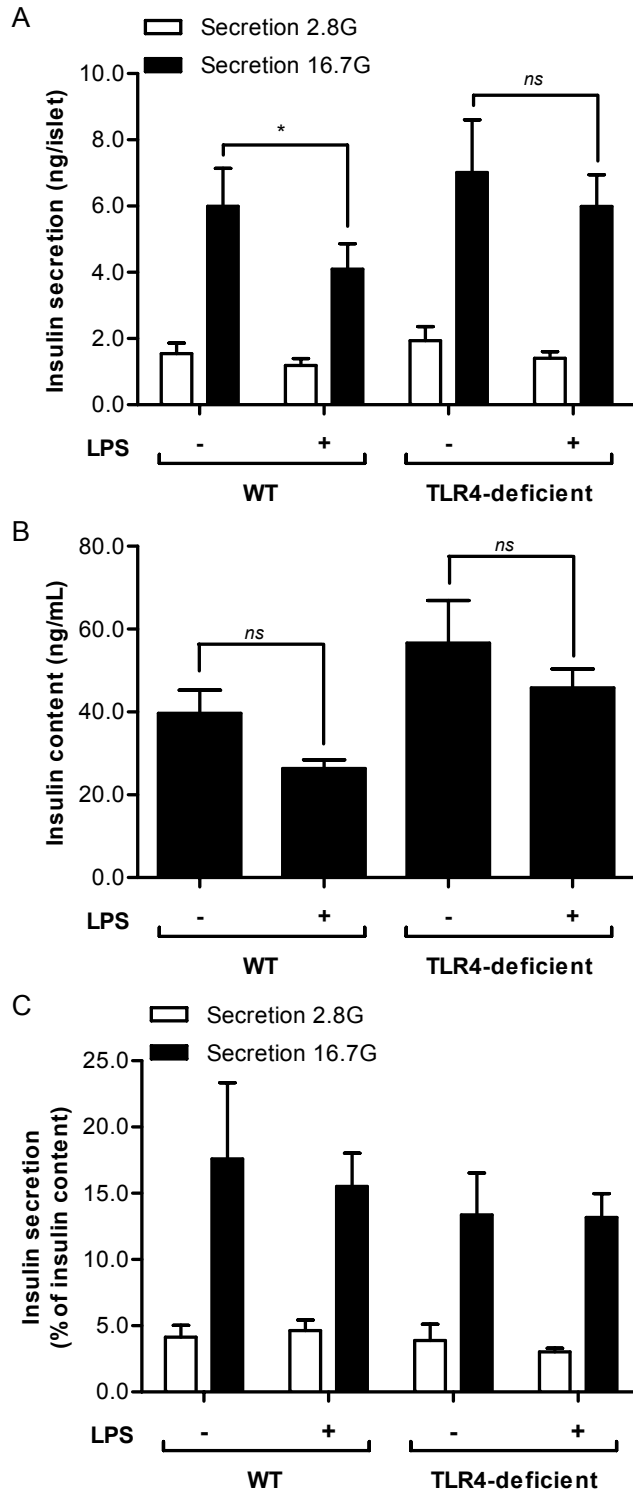


Figure 5 – Amyot et al.

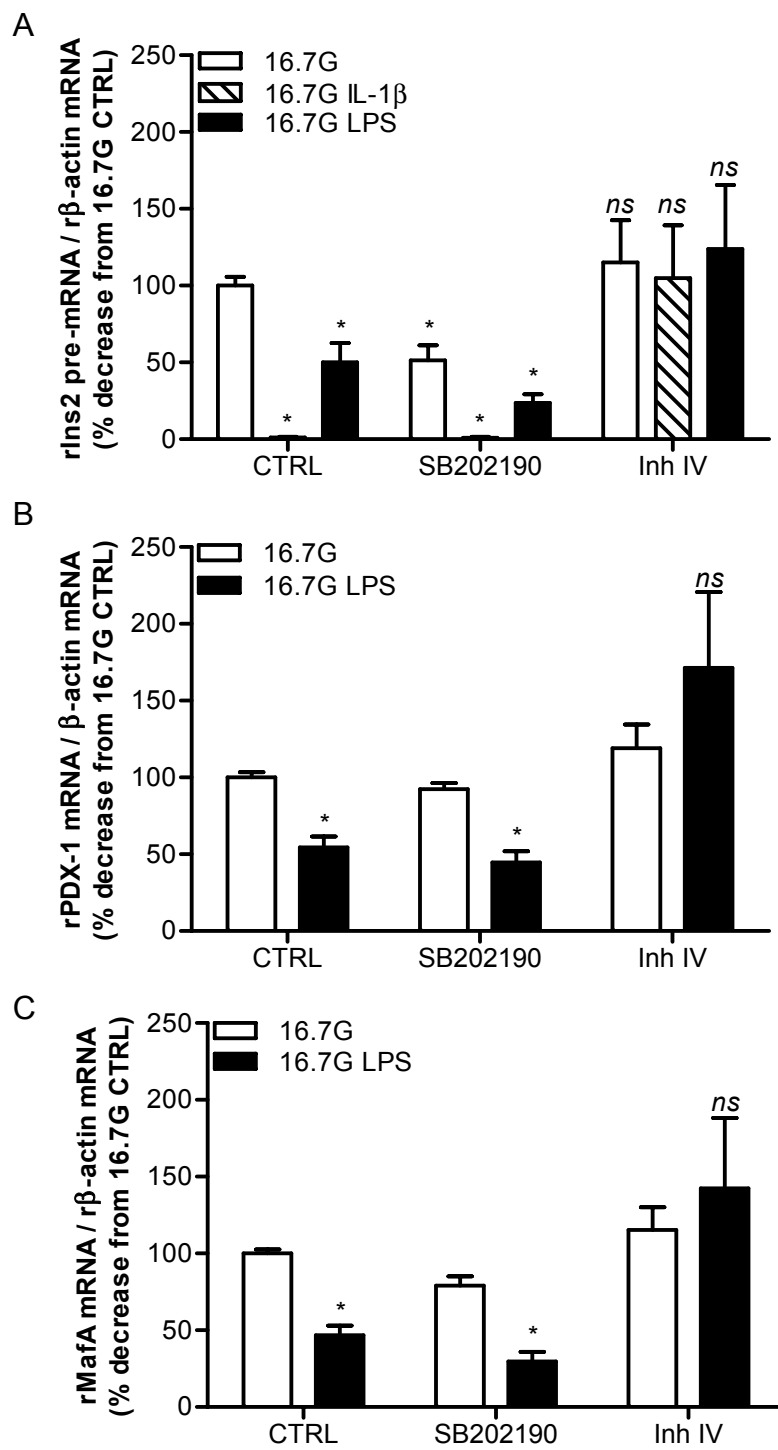
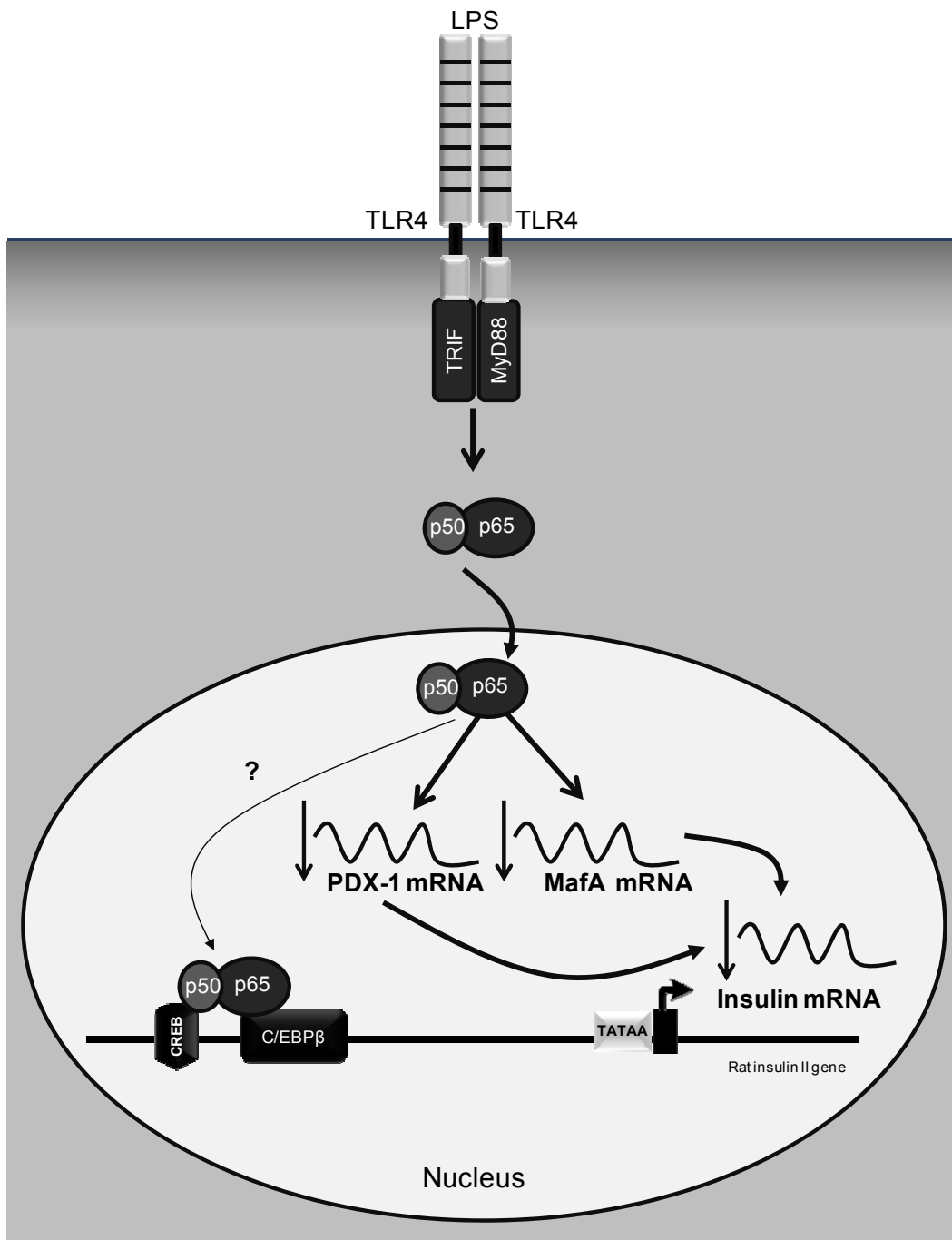
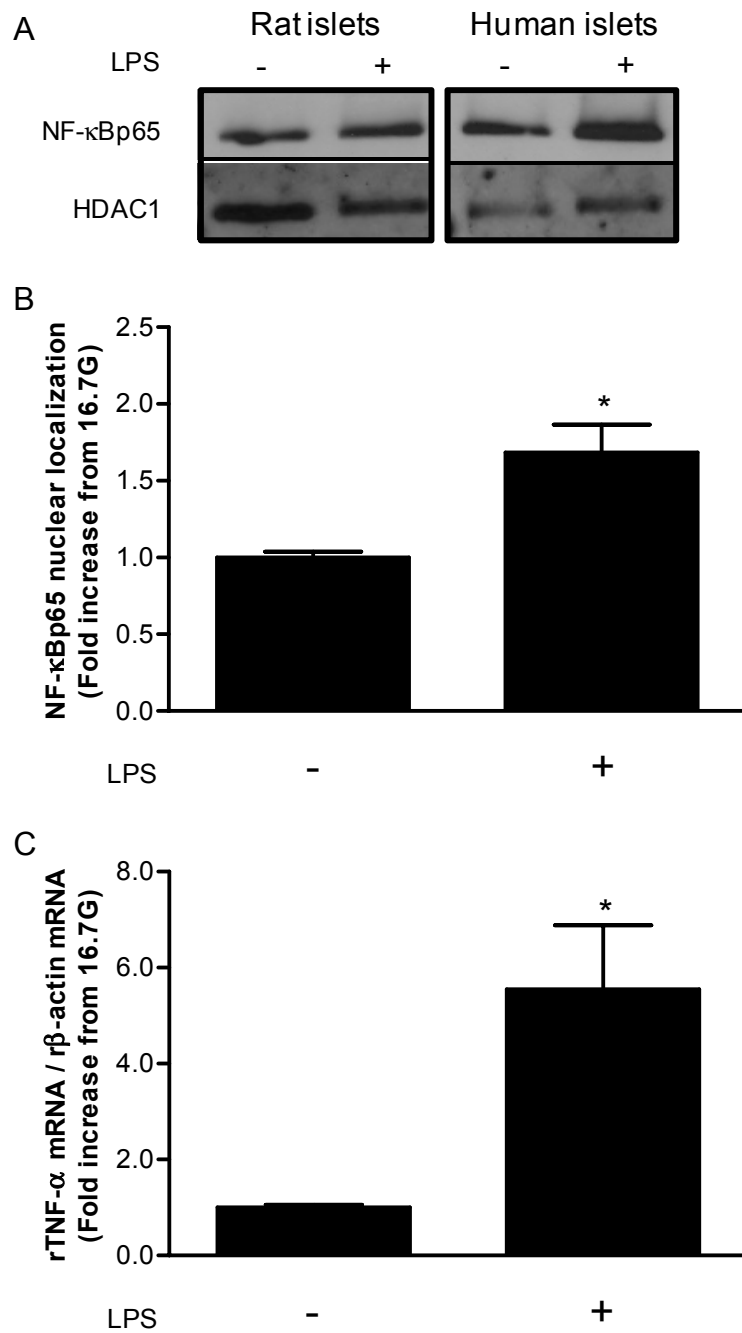


Figure 6 – Amyot et al.



Supplementary Figure 1 – Amyot et al.





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

### *Rappel des résultats*

Dans ce second article qui sera soumis dans le journal *PLoS ONE* peu après le dépôt initial de la thèse, nous avons tout d'abord démontré que l'exposition aux lipopolysaccharides (LPS) entraîne une réduction de la transcription du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans de rats, de souris et humains. Cette répression du gène de l'insuline par les LPS est associée à une diminution des niveaux messagers de PDX-1 et de MafA, dans les îlots isolés de rat et de souris. En utilisant un modèle de souris déficientes pour le récepteur TLR4, nous avons montré que les effets délétères des LPS sur l'expression du gène de l'insuline sollicitent le récepteur TLR4. Toutefois et à l'opposé de ce que nous nous attendions, la diminution de la SIIG observée dans les îlots de souris de type sauvage semble résulter indirectement d'une diminution des réserves en insuline en réponse à une exposition aux LPS. Nous avons également identifié certains des mécanismes sous-tendant les effets des LPS sur le gène de l'insuline. Nous avons montré par des expériences d'immunohistochimie que la localisation nucléaire de PDX-1 n'est pas affectée par l'exposition aux LPS. Nous avons également montré par immunobuvardages de type Western que les LPS activent la voie NF- $\kappa$ B dans les îlots de Langerhans de rat et humains. Puis, nous avons confirmé par une approche pharmacologique que l'activation de la voie NF- $\kappa$ B est essentielle à l'inhibition du gène de l'insuline, démontrant ainsi un rôle pour cette voie de signalisation dans la régulation du gène de l'insuline.

### *Interprétation des résultats*

Les cellules  $\beta$ -pancréatiques expriment des niveaux significatifs du récepteur TLR4 ce qui les rend susceptibles à son ligand endogène, les LPS [275, 276, 352]. Dans cette étude, nous avons montré que l'exposition à des doses croissantes de LPS réprime le gène de l'insuline dans les îlots isolés de rat et humains ce qui confirme les observations rapportées par une autre équipe [275]. Nous avons également observé que les îlots humains semblent beaucoup plus sensibles aux effets délétères des LPS que les îlots de rat. En effet,

l'exposition aux LPS réprime près de 70 % de l'expression du gène de l'insuline comparativement à 50 % chez le rat et ce, à une dose cent fois inférieure à celle employée chez le rongeur. Cette différence de sensibilité peut s'expliquer par les disparités anatomiques caractérisant les îlots de rongeur et humains (voir Chapitre 2). Entre autres, le nombre inférieur de cellules  $\beta$  ainsi que la dispersion plus homogène de ces dernières dans les îlots humains en comparaison avec les îlots de rongeurs peuvent influencer la fréquence, ou l'intensité de l'exposition aux LPS. Quoique les îlots de rongeur et humains expriment des niveaux significatifs du récepteur TLR4 et des molécules accessoires CD14 et MD2 [352], ces niveaux d'expression peuvent tout de même varier entre les deux espèces et ainsi expliquer les différences de sensibilité observées. D'un point de vue physiologique et puisque les niveaux d'endotoxémie rencontrés chez l'Homme sont de l'ordre des ng/mL, la répression du gène de l'insuline par les LPS dans les îlots humains à une dose de 0,1 ng/mL suggère que ce phénomène pourrait se manifester *in vivo* chez l'Homme.

Le récepteur TLR4 semble avoir une importance non négligeable dans la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Récemment, l'activation du récepteur TLR4 par la chimiokine CXCL10 (de l'anglais, *C-X-C motif chemokine 10*) a été rapportée pour altérer la sécrétion d'insuline et l'expression de son gène dans des îlots isolés humains [360]. Nos expériences effectuées dans un modèle de souris déficientes pour le récepteur TLR4 ont montré pour la première fois qu'un récepteur TLR4 fonctionnel est essentiel à la répression du gène de l'insuline par les LPS. En effet, la réduction de l'expression des gènes clés de la cellule  $\beta$ -pancréatique, soient l'insuline, PDX-1 et MafA, par les LPS est dépendante du récepteur TLR4.

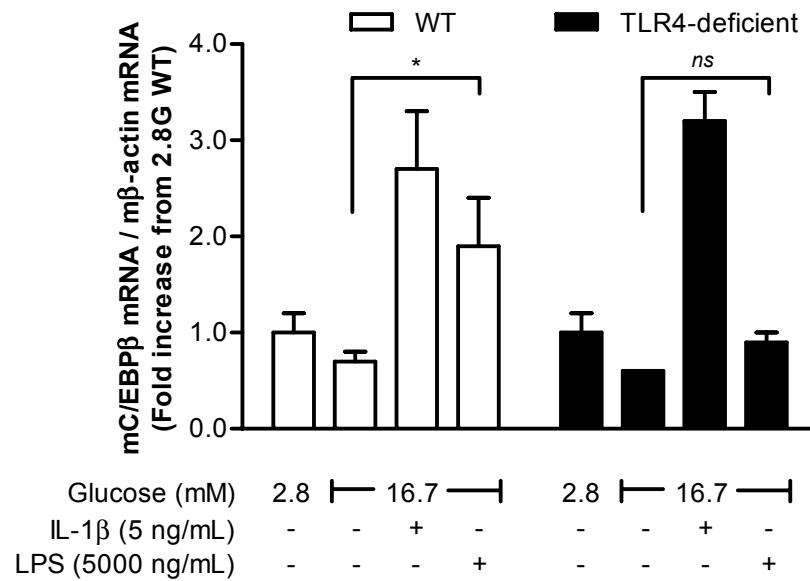
Nous avons déjà montré que les acides gras régulent négativement le gène de l'insuline *in vitro* et *in vivo* via plusieurs mécanismes qui incluent, entre autres, un défaut de localisation nucléaire de PDX-1 [215, 216]. Dans cette étude, nous rapportons que l'exposition des cellules  $\beta$ -pancréatiques HIT-T15 aux LPS réduit l'expression des niveaux protéiques de PDX-1 sans toutefois entraîner de défaut de localisation nucléaire du facteur de transcription.

Récemment, il a été montré que l'exposition d'îlots isolés ou de cellules  $\beta$ -pancréatiques aux LPS entraîne une diminution de la SIIG [275, 352]. Dans notre étude, nous avons confirmé que l'exposition des îlots aux LPS diminue la SIIG dans les îlots de souris sauvage, mais pas dans les îlots de souris déficientes pour le récepteur TLR4. Toutefois, le contenu en insuline dans les îlots de souris type sauvage exposés aux LPS était diminué, une observation rapportée par une autre équipe [276], et témoigne probablement de la diminution du gène de l'insuline observée dans ces conditions. Quoique cette diminution soit non significative, elle demeure tout de même assez importante pour rétablir la SIIG, lorsque normalisée au pourcentage du contenu en insuline. Ainsi, et en opposition à ce que d'autres ont rapporté [275, 352], la diminution de la SIIG dans notre étude résulte principalement d'une réduction d'un contenu intracellulaire en insuline.

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B exerce un rôle central dans la survie et la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique [361-363]. Nous avons montré que LPS augmentent les niveaux d'expression protéiques de la sous-unité p65 du facteur NF- $\kappa$ B dans le noyau des îlots isolés de rat et humains, et que l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, mais pas l'inhibition de la voie p38, entraîne non seulement la restauration des niveaux pré-messagers de l'insuline, mais également des niveaux d'ARNm de PDX-1 et de MafA. Ainsi, la voie NF- $\kappa$ B réprime le gène de l'insuline en réponse à une exposition des îlots de Langerhans isolés de rat aux LPS. Ces observations soulèvent toutefois une question très importante : comment la voie NF- $\kappa$ B entraîne-t-elle l'inhibition du gène de l'insuline? Nos résultats suggèrent un effet indirect de la réduction des niveaux d'ARNm de PDX-1 et de MafA sur l'expression du gène de l'insuline (figure 20). D'autre part, les membres de la famille NF- $\kappa$ B comprennent plusieurs sous-unités : p50, p52, p65, RelB et c-Rel qui reconnaissent les éléments  $\kappa$ B situés dans la région promotrice de leurs gènes cibles (révisé dans [364]). Puisqu'il n'existe pas de sites  $\kappa$ B connus sur le promoteur du gène de l'insuline, ni sur le promoteur de PDX-1 et de MafA, une liaison directe de NF- $\kappa$ B sur ces régions promotrices semble peu probable. Par contre, les sous-unités p65 et p50 du facteur de transcription NF- $\kappa$ B forment un certain nombre d'interactions avec d'autres facteurs de transcription, interactions qui peuvent influencer leur liaison à l'ADN, ou leur activité transcriptionnelle. Dans nos

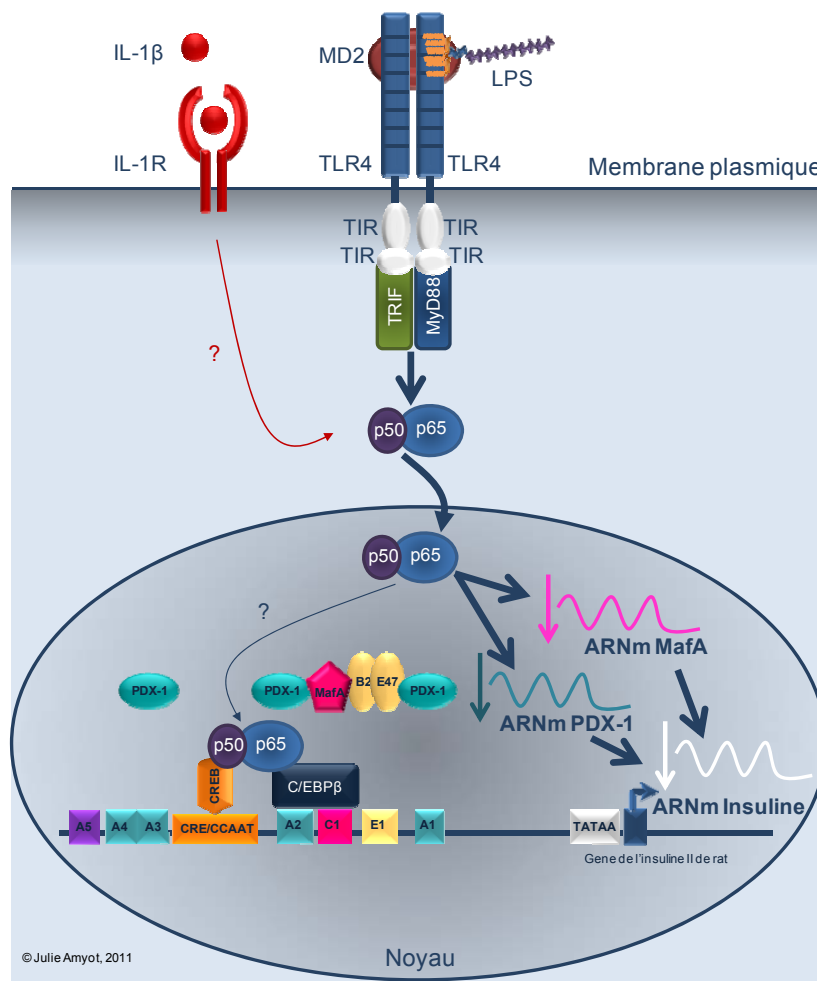
conditions de culture, nous avons montré que l'exposition aux LPS des îlots de Langerhans de souris de type sauvage, mais pas les souris déficientes pour le récepteur TLR4, entraîne une augmentation des niveaux messagers de C/EBP $\beta$  (Figure 19), un répresseur connu du gène de l'insuline [176, 191, 192]. Or, il s'avère que la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B peut former des interactions protéiques avec C/EBP $\beta$  et ainsi augmenter la liaison de ce dernier à la région promotrice du gène de l'insuline, tel qu'observé dans d'autres types cellulaires [365, 366]. Un autre partenaire protéique possible pouvant interagir avec la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B est le facteur de transcription CREB [367]. Il est ainsi possible que l'interaction entre ces deux facteurs de transcription nuise à la liaison de CREB sur les sites CRE du promoteur de l'insuline en réponse aux LPS, ou encore que cette interaction crée une inhibition allostérique empêchant la liaison de PDX-1 et de MafA au promoteur de l'insuline, et ainsi en réprimer l'activité (Figure 20). Puisque les cellules  $\beta$ -pancréatiques peuvent sécréter de l'IL-1 $\beta$  [309], il est également possible que l'exposition des îlots aux LPS puisse entraîner la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par ces derniers, et du même coup participer à l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et la répression du gène de l'insuline, de PDX-1 et de MafA.

Enfin, les cellules  $\beta$ -pancréatiques présentent non-seulement des niveaux d'expression significatifs du récepteur TLR4, mais également du récepteur TLR2 [352]. Or, certaines études ont rapporté un rôle pour ce dernier dans la reconnaissance des lipopeptides bactériens [368], incluant les LPS [369, 370]. Bien que la contribution indépendante du récepteur TLR2 dans la signalisation induite par les LPS ait été exclue par certains de façon très convaincante [371], il n'en demeure pas moins qu'il est possible que les effets observés dans notre étude soient également le résultat d'une participation partielle du récepteur TLR2, quoique des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer cette possible contribution.



**Figure 19: L'exposition aux LPS augmente les niveaux messagers de C/EBPβ via TLR4 dans les îlots isolés de souris.**

Les niveaux messagers de C/EBPβ dans les îlots isolés de souris de type sauvage et les souris déficientes pour le récepteur TLR4 exposés pendant 24 h à 2,8 mM et 16.7 mM glucose en présence ou en absence de 5 ng/mL d'IL-1β ou 5000 ng/mL de LPS. Les niveaux messagers ont été mesurés par PCR en temps réel et normalisés par les niveaux messagers de la β-actine. Moyenne ± S.E.M. de 6 expériences indépendantes; \*p<0,05.



**Figure 20: Mécanismes potentiels de l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline par les LPS.**

L'effet inhibiteur des LPS sur la régulation du gène de l'insuline implique la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et pourrait résulter d'un effet indirect de la diminution des niveaux messagers de PDX-1 et de MafA. Il est également possible que NF- $\kappa$ B recrute des partenaires protéiques tels que CREB et C/EBP $\beta$ . Ces interactions interprotéiques pourraient entraîner la liaison de C/EBP $\beta$ , un répresseur du gène de l'insuline, au promoteur de l'insuline. L'interaction de NF- $\kappa$ B avec CREB pourrait également prévenir la liaison de ce dernier au promoteur, ou encore former un complexe d'inhibition allostérique, tous deux réduisant l'activité du promoteur de l'insuline. Les cellules  $\beta$ -pancréatiques pourraient également sécréter de l'IL-1 $\beta$  en réponse aux LPS, activant du même coup la voie NF- $\kappa$ B et entraînant la répression du gène de l'insuline.

*Forces et limites de l'étude*

Une seule étude à ce jour a rapporté l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline dans des cellules  $\beta$  isolées d'îlots humains par les LPS [275]. Or, nous avons confirmé ces effets dans des îlots de Langerhans non dispersés et isolés de rat, de souris et humains. Ces résultats reproductibles et consistants, confirmés chez l'homme, représentent sans aucun doute une force de l'étude.

D'autre part, nous sommes, à notre connaissance, les premiers à identifier un mécanisme moléculaire impliqué dans les effets délétères des LPS sur la régulation du gène de l'insuline, c'est-à-dire l'implication directe du récepteur TLR4 et la voie NF- $\kappa$ B. Afin de déterminer la contribution relative du récepteur TLR4 dans les effets délétères des LPS sur l'expression du gène de l'insuline, il aurait été possible d'utiliser la technologie d'ARN interférant pour diminuer de façon significative les niveaux protéiques du récepteur TLR4 dans une lignée de cellules  $\beta$ -pancréatiques. Or, nous avons préféré effectuer cette étude dans des îlots isolés de souris déficientes pour le récepteur TLR4, modèle qui, à notre avis, consolide nos résultats démontrant de façon convaincante l'implication du récepteur TLR4 dans l'inhibition du gène l'insuline par les LPS. D'autre part, l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans la régulation du gène de l'insuline représente une observation originale et novatrice.

Plusieurs limites sont également associées à cette étude. Alors que nous avons observé une réduction de l'ARNm et de l'expression protéique de PDX-1, nous n'avons pas mesuré les niveaux d'expression protéique de MafA, dont l'ARNm est diminué en présence de LPS. Il serait par conséquent important de le faire par des expériences d'immunobuvardage de type Western. De plus, il serait important de consolider les résultats relatifs à l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans la régulation du gène de l'insuline et ce, en raison des nombreuses limites inhérentes à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques qui ont souvent des effets non spécifiques.

### *Travaux futurs*

L'activité de NF- $\kappa$ Bp65 est étroitement régulée par son interaction avec la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  (de l'anglais, *inhibitor of  $\kappa$ B  $\alpha$* ). À l'état basal, NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme par la formation d'un complexe avec I $\kappa$ B $\alpha$ . Lorsque stimulée, la voie NF- $\kappa$ B entraîne la phosphorylation des résidus sérine 32 et 36 de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  par la kinase IKK (de l'anglais, *inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) kinase*). La phosphorylation de ces sites mène à la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans le protéasome, entraînant ainsi la libération du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et sa migration au noyau [364]. Les prochaines expériences qui seront effectuées avant la soumission du manuscrit consisteront à mesurer l'expression du gène de l'insuline suite à la surexpression d'une forme non dégradabile de l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de rat INS832/13. Ce vecteur d'expression code pour la séquence de la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  dont les résidus sérine 32 et 36 ont été mutés, de sorte que la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  ne peut être phosphorylée et dégradée. Nous nous attendons à ce que la surexpression de cette forme non dégradabile d'I $\kappa$ B $\alpha$  prévienne l'inhibition du gène de l'insuline induite suite à l'exposition aux LPS. Ces résultats permettront de consolider l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans les effets délétères des LPS dans la régulation du gène de l'insuline.

Puisque l'activation de la voie NF- $\kappa$ B peut induire l'apoptose et puisque les doses de LPS employées dans le cadre de cette étude étaient parfois élevées, nous évaluerons si la mort cellulaire programmée est augmentée dans les îlots isolés et exposés à des doses croissantes de LPS. La mesure de l'apoptose s'effectuera par la mesure de l'activité enzymatique de la caspase-3 qui sera normalisée par le contenu en ADN des îlots. À titre alternatif, il sera possible de mesurer le clivage de la caspase-3 ou le clivage de la protéine PARP (de l'anglais, *poly(ADP-ribose) (PAR) polymerase*) par immunobuvardage de type Western.



### *Conclusions*

En résumé, cette étude démontre que les effets délétères des LPS dans la régulation du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans incluent une diminution des niveaux d'ARNm de PDX-1 et de MafA, et nécessitent l'activation du récepteur TLR4 et de la voie médiatrice de l'inflammation NF- $\kappa$ B. Les effets délétères des LPS sur la régulation du gène de l'insuline sont observés à des concentrations comparables à celles rencontrées au cours de l'endotoxémie chez l'Homme, suggérant qu'une répression directe du gène de l'insuline pourrait contribuer à la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique lors d'une altération du microbiome intestinal. Cet aspect sera discuté en détail dans la section « Discussion » de la thèse.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Les études menées dans le cadre de cette thèse visaient à identifier et caractériser la contribution du stress du RE et de l'immunité innée dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline. D'une part, nous avons montré qu'ATF6 se lie directement à la boîte A5 du promoteur du gène de l'insuline, mais que cette liaison ne semble pas contribuer à son activité répressive [372]. D'autre part, nous avons montré que les LPS entraînent des effets délétères sur la régulation du gène de l'insuline et que ces effets impliquent le récepteur TLR4 et la voie médiatrice de l'inflammation NF- $\kappa$ B (Amyot et al., Manuscrit en préparation). L'originalité de cette thèse réside dans l'identification du facteur de transcription ATF6 de la réponse UPR et du récepteur TLR4 de l'immunité innée à titre de modulateurs transcriptionnels du gène de l'insuline.

## **Le stress du RE et l'activation du système immunitaire inné entraînent une dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique : évidences.**

### **Généralités**

La cellule  $\beta$ -pancréatique exerce un rôle crucial dans la sécrétion d'insuline essentielle au maintien de la glycémie, mais stimule également la biosynthèse de l'insuline en augmentant la transcription du gène de l'insuline et la traduction de l'ARNm de l'insuline [61, 104, 373]. La dysfonction de la cellule  $\beta$  du pancréas découle d'une combinaison de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux qui contribuent au développement du DT2 [374]. De larges études prospectives effectuées chez l'Homme, tel que l'étude UKPDS (de l'anglais, *United Kingdom Prospective Diabetes Study*), ont montré que la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique se détériore dans les années suivant le diagnostic [28]. De façon importante, cette étude a également suggéré que la dysfonction de la cellule  $\beta$  survient avant l'apparition du DT2, et que cette perte de fonction est déjà réduite de moitié au moment du diagnostic [57]. Or, nous avons également montré qu'un défaut de l'expression du gène de l'insuline précède l'apparition d'un défaut de la SIIG dans les îlots de Langerhans de rat soumis à un régime d'infusions cycliques de lipides et

de glucose [216], suggérant que la diminution du gène de l'insuline représente un événement précoce dans la dysfonction de la cellule  $\beta$ . Plusieurs hypothèses ont été émises concernant la source de la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique et incluent, entre autres, le stress du RE et l'immunité innée.

### **Le stress du RE et la dysfonction de la cellule $\beta$ du pancréas**

Plusieurs facteurs, qui proviennent d'un défaut de la régulation métabolique associée à l'obésité et au diabète, peuvent induire un stress du RE : l'excès de nutriments tels que le glucose et les acides gras, les cytokines pro-inflammatoires et les dépôts d'amyloïde (révisé dans [375]). Ces conditions sont ainsi proposées pour activer la réponse UPR dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques qui peut ultimement mener à la dysfonction et à la mort cellulaire de ces dernières. Ainsi, l'activation de la réponse UPR active les mécanismes de survie ou de mort cellulaire de la cellule  $\beta$ , en fonction de l'intensité et de la durée du stress du RE [376] (Figure 21).

#### *PERK*

PERK est exprimé à des niveaux élevés dans la cellule  $\beta$ -pancréatique [377]. Son activation inhibe temporairement la biosynthèse de l'insuline *via* la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  [378] et active divers gènes codant pour différentes chaperonnes et foldases par la transcription préférentielle d'ATF4. Ces actions permettent un meilleur repliement des protéines, en l'occurrence de l'insuline, et protège ainsi la cellule  $\beta$  d'une accumulation exagérée de protéines dans le RE. Or, il a été rapporté que le traitement des îlots de souris déficientes pour la protéine PERK à des concentrations élevées de glucose augmente la biosynthèse de l'insuline comparativement aux souris contrôle [377]. Dans le même ordre d'idées, la mutation de PERK est associée à une forme rare de diabète soit le syndrome Wolcott-Rallison [258], témoignant de l'importance de PERK dans la fonction normale des cellules  $\beta$ -pancréatiques. À l'opposé, un stress du RE persistant entraîne une hyperactivation de la voie PERK qui, par la transcription de la protéine CHOP par ATF4 [230, 379] déclenche l'apoptose. La voie PERK est particulièrement importante dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques

puisque son inactivation ou l'inhibition de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  compromet le contrôle traductionnel des protéines et augmente la susceptibilité des cellules  $\beta$  à la mort cellulaire [377, 380, 381].

### *IRE1*

Tout comme PERK, IRE1 est fortement exprimé dans les cellules  $\beta$  [382]. Par son activité ribonucléase, l'activation modérée de la voie IRE1 aide au maintien de la cellule  $\beta$ -pancréatique *via* la dégradation de l'ARNm de l'insuline et ce, afin de réduire la charge des protéines qui pénètrent dans le RE [347, 348]. L'exposition des cellules  $\beta$ -pancréatiques à des concentrations élevées et persistantes de glucose entraîne l'hyperactivation de IRE1 et la mort cellulaire par l'activation de la voie JNK [245]. Également, l'hyperactivation de la voie IRE1 entraîne une augmentation de la forme épissée de XBP-1 (XBP-1s) et il a été montré que la surexpression de XBP-1s supprime l'expression du gène de l'insuline et inhibe la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique [350]. Enfin, une étude récente a rapporté que l'inactivation génique spécifique de XBP-1 dans la cellule  $\beta$  entraîne un défaut de la biosynthèse de l'insuline, une augmentation du ratio proinsuline sur insuline et une intolérance au glucose due à un défaut de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  [383].

### *ATF6*

Le rôle de la voie ATF6 dans la fonction de la cellule  $\beta$  est peu connu et il n'existe pas de modèles de souris dont ATF6 a spécifiquement été invalidé génétiquement dans la cellule  $\beta$ . Seuls des modèles de souris invalidées pour ATF6 dans tout l'organisme ont été générés. Alors que la double invalidation génique d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  est létale au cours de l'embryogenèse, les modèles de souris qui présentent une délétion homozygote pour ATF6 $\alpha$  (ATF6 $\alpha$ -/-) ou ATF6 $\beta$  (ATF6 $\beta$ -/-) ont une homéostasie du glucose normale, lorsque soumis à une diète régulière [238]. Ces manipulations génétiques chez la souris montrent d'une part que les deux isoformes présentent des fonctions complémentaires dans le développement. D'autre part, l'absence de conséquences phénotypiques majeures de l'inactivation d'une seule des deux isoformes suggère que les deux isoformes d'ATF6 présentent des fonctions redondantes dans l'homéostasie métabolique. En opposition avec

les fibroblastes embryonnaires isolés de souris ATF6 $\beta$ <sup>-/-</sup>, l'analyse des fibroblastes embryonnaires de souris ATF6 $\alpha$ <sup>-/-</sup> (MEFs; de l'anglais, *mouse embryonic fibroblasts*) a montré un défaut de l'induction de gènes codant pour les chaperonnes et une réduction de la dégradation associée au RE (ERAD; de l'anglais *ER-associated degradation*) [238, 384]. Ainsi, l'inactivation d'ATF6 $\alpha$ , mais pas ATF6 $\beta$ , entraîne un défaut de la réponse UPR en réponse au stress du RE.

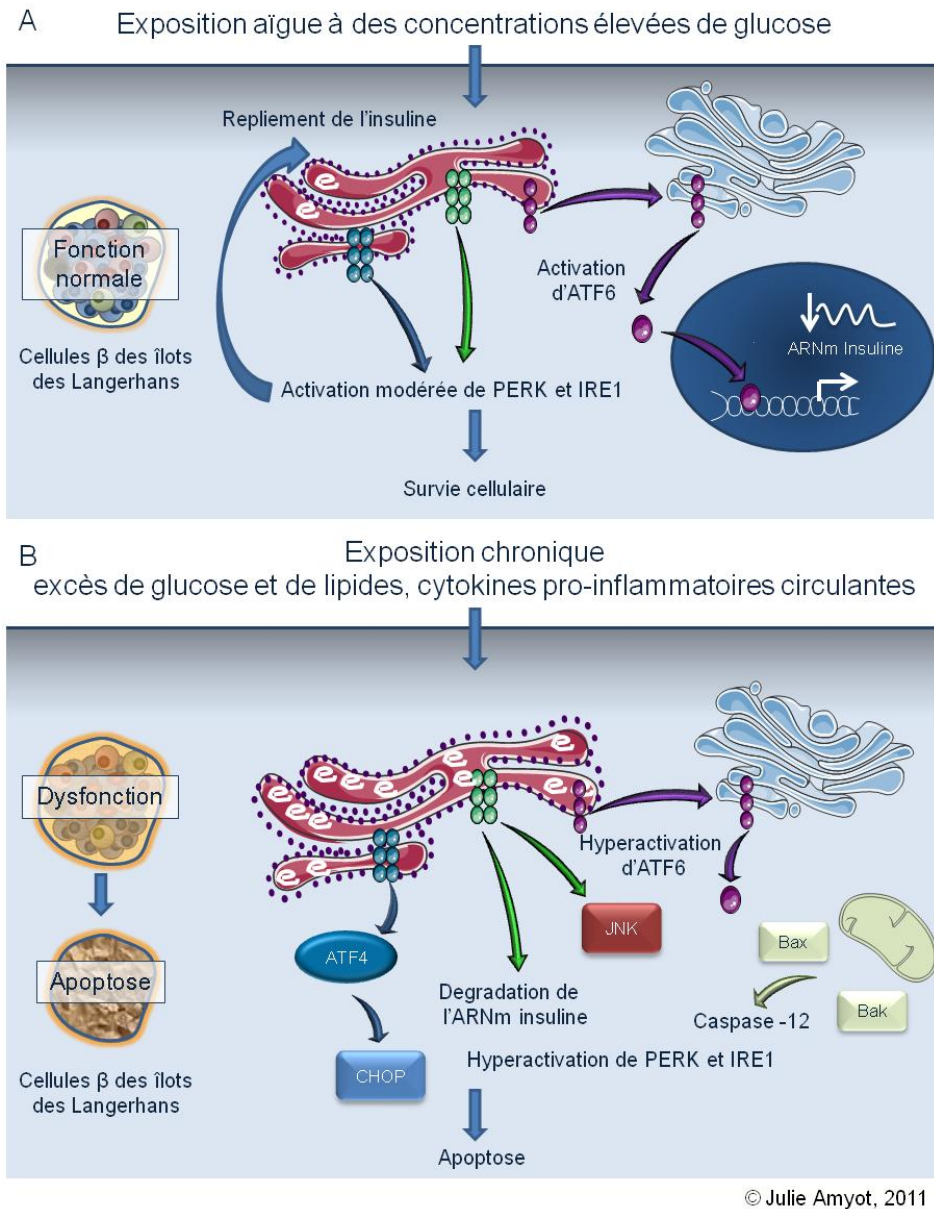
Un groupe a rapporté un rôle possible pour ATF6 $\alpha$  dans la fonction de la cellule  $\beta$  [346]. Dans leur étude, Seo et al. ont montré que l'exposition de cellules  $\beta$ -pancréatiques INS-1 à des concentrations supraphysiologiques de glucose (30 mM) entraîne le clivage et la localisation nucléaire d'ATF6 $\alpha$ , de même que l'épissage alternatif de XBP-1, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'induction de CHOP. L'infection des cellules INS-1 avec un adénovirus codant pour la forme active d'ATF6 a non seulement entraîné une diminution de l'activité du promoteur de l'insuline d'une façon dépendante de la dose, mais a également réduit les niveaux d'ARNm de l'insuline et altéré la SIIG. Le groupe de Seo et al. rapporte également une diminution des niveaux messagers de PDX-1 et de MafA en réponse à la surexpression d'ATF6 $\alpha$ -p50, de même qu'une augmentation des niveaux messagers de SHP. Or, il semblerait que SHP réprime l'expression du gène de l'insuline [385] et l'inactivation de SHP par la technologie de l'ARN interférant a restauré les niveaux messagers de l'insuline qui étaient réprimés par ATF6 $\alpha$ -p50. Ces résultats montrent que l'activation d'ATF6 par des concentrations supraphysiologiques de glucose entraîne une dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique qui serait en partie médiée par une augmentation des niveaux messagers de SHP. À l'opposé, nous rapportons plutôt un rôle protecteur pour ATF6 $\alpha$ . Ainsi, nous avons également montré que l'exposition des îlots de Langerhans, dans notre cas, à des concentrations élevées, mais physiologiques de glucose (16,7 mM) entraîne le clivage d'ATF6 $\alpha$ . Tout comme l'équipe de Seo et al., nous avons montré que la surexpression d'ATF6 $\alpha$ -p50 réduit l'activité du promoteur du gène de l'insuline d'une façon dépendante de la dose. Toutefois, nous rapportons une liaison directe pour ATF6 $\alpha$  dans la région promotrice du gène de l'insuline. Par sa liaison à la boîte A5 du promoteur, ou par ses interactions avec d'autres partenaires protéiques, ATF6 $\alpha$  réprime le

gène de l'insuline en réponse au stress du RE sans induire de mort cellulaire dans notre modèle. Ainsi, nous proposons que dans la cellule  $\beta$ -pancréatique, ATF6 $\alpha$ , en réponse à une accumulation de protéines mal repliées dans le RE induite par des conditions diabétogènes (l'excès de glucose et d'acides gras ou la présence de cytokines pro-inflammatoires), subit un clivage, migre au noyau, se lie à la région promotrice du gène de l'insuline et en réprime l'activité (Figure 21). La répression du gène de l'insuline par ATF6 $\alpha$  protégerait la cellule  $\beta$ -pancréatique de l'apoptose induite suite à la persistance d'un stress du RE, par une diminution de la charge de protéine dans le RE, en l'occurrence l'insuline, ce qui permettrait un meilleur repliement des protéines dans la lumière du RE et ainsi la résolution du stress du RE. Le rôle protecteur d'ATF6 que nous proposons est soutenu par les résultats d'une étude qui a évalué le rôle d'ATF6 dans un modèle de cellules  $\beta$  dont le gène de l'insuline présente la mutation Akita, soit la mutation C96Y dans le gène 2 de l'insuline de souris [386]. Tel que discuté au chapitre 4, la souris Akita est un modèle de souris diabétique dont le repliement incorrect de l'insuline causé par la mutation C96Y entraîne un stress du RE persistant qui mène à l'apoptose de la cellule  $\beta$ . Dans leur étude, Nozaki et al. ont non seulement rapporté un clivage d'ATF6 en sa forme active et une augmentation de son activité transcriptionnelle sur le promoteur de BIP, mais ils ont également rapporté une diminution des niveaux messagers de l'insuline 2. Ainsi, le rôle protecteur d'ATF6 que nous proposons pourrait également s'appliquer à ce modèle, même si la persistance du stress du RE due à la mutation du gène de l'insuline entraîne tout de même l'apoptose de la cellule  $\beta$ .

Afin de mieux cerner l'importance d'ATF6 dans le maintien de la fonction normale et la dysfonction de la cellule  $\beta$ , il serait essentiel de vérifier le rôle d'ATF6 $\alpha$  et d'ATF6 $\beta$  dans l'homéostasie du glucose dans un modèle de souris invalidée pour une des deux isoformes et soumise à une diète riche en lipides. Puisque nos résultats suggèrent un rôle pour ATF6 $\alpha$  dans la protection de la cellule  $\beta$ , une diète riche en lipides pourrait révéler un rôle pour ATF6 dans les mécanismes de compensation de la cellule  $\beta$  présents dans le DT2. Également, il serait essentiel de générer un modèle de souris dont ATF6 a été invalidé spécifiquement dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques et de les soumettre à une diète riche en

lipides, ou encore à un système d'infusion de glucose et de lipides, connu chez le rat pour induire un défaut précoce de la fonction  $\beta$ -pancréatique par une diminution des niveaux d'ARNm de l'insuline, sans toutefois que la SIIG dans ces îlots ne soit altérée [216]. Selon l'hypothèse du rôle protecteur d'ATF6 que nous proposons, l'invalidation génique d'ATF6 $\alpha$  spécifique à la cellule  $\beta$  protégerait les îlots contre la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique induite par l'excès de nutriments. De cette façon, les niveaux d'ARNm de l'insuline ne seraient pas affectés par l'exposition au glucose et aux acides gras chez la souris dont ATF6 $\alpha$  a spécifiquement été invalidé dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques.





### Figure 21: Le stress du RE et la dysfonction de la cellule $\beta$ .

(A) En conditions aigües de concentrations élevées de glucose, l'activation de la réponse UPR favorise la survie cellulaire par une activation modérée des voies PERK et IRE1, et une activation d'ATF6. Ce dernier entraînerait une répression du gène de l'insuline afin de permettre un repliement adéquat des protéines dans le RE. (B) Lors d'une exposition chronique à des agents agresseurs, l'hyperactivation des voies PERK IRE1 et ATF6 entraîne l'apoptose de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Adapté de [376].

### **L'immunité innée dans la dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique**

Le DT2 est non seulement caractérisé par un état inflammatoire chronique de faible intensité, mais également par une modulation du microbiome intestinal *via* une réduction du ratio de bactéries à Gram positif sur les bactéries à Gram négatif [328, 330]. Or, les LPS présents à la surface des bactéries à Gram négatif atteignent la circulation sanguine et seraient en partie responsables du statut inflammatoire rencontré chez les individus obèses et diabétiques. Les premières études qui supportent un tel rôle pour les LPS dans le développement de l'obésité et du diabète ont été publiées en 2007. Dans un modèle de souris soumises à une diète riche en gras pendant quatre semaines, Cani et al. ont observé des niveaux circulants de LPS dont la concentration sanguine est deux à trois fois plus élevée que les concentrations de LPS retrouvées chez la souris témoins [387]. Par la suite, ils ont vérifié les effets de l'endotoxémie sur le développement d'une obésité et d'un diabète. À cette fin, Cani et al. ont implanté une minipompe osmotique sous-cutanée libérant de façon chronique une infusion de LPS à des concentrations observées dans leur modèle de souris soumis à une diète riche en lipides. Un mois après le début de l'infusion, les souris exposées aux LPS présentaient une glycémie à jeun et une insulïnémie supérieure aux souris infusées avec de la saline. Également, l'infusion chronique de LPS chez la souris a entraîné une augmentation de marqueurs de l'inflammation dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané, le foie et les muscles. Les LPS circulants semblent donc exercer des effets délétères dans la fonction de plusieurs organes, particulièrement dans les tissus impliqués dans la résistance à l'insuline.

L'endotoxémie de faible intensité serait donc en partie responsable du développement du diabète et de l'obésité. Or, ces LPS circulants entraînent des effets délétères sur la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Alors que certains ont rapporté une diminution de la SIIG dans les îlots de Langerhans exposés aux LPS [275, 352], nous avons également observé une modulation de la SIIG en réponse à une exposition aux LPS, mais qui était toutefois la conséquence d'une diminution du contenu en insuline des îlots. En outre, nous avons montré que l'exposition des îlots de Langerhans isolés de rat, de souris et humains aux LPS

entraîne une diminution de l'expression du gène de l'insuline, via un mécanisme dépendant du récepteur TLR4 et impliquant la voie de signalisation NF- $\kappa$ B.

Puisque la dose minimale de LPS ayant réprimé le gène de l'insuline dans les îlots humains correspond approximativement aux concentrations circulantes de LPS rencontrées dans l'endotoxémie, nous proposons que l'endotoxémie responsable des anomalies métaboliques associées au diabète puisse également entraîner une altération de l'expression du gène de l'insuline *in vivo* chez l'Homme. Ainsi, les observations rapportées dans notre étude peuvent représenter un défaut précoce du gène de l'insuline pouvant contribuer à la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Or, aucun modèle d'entoxémie métabolique de faible intensité n'a à ce jour évalué la régulation du gène de l'insuline. En conséquence, il serait intéressant de mesurer l'activité du promoteur de l'insuline et l'expression de son gène en réponse à une exposition systémique aux LPS. Dans notre laboratoire, nous avons développé un nouveau modèle animal, un rat transgénique exprimant une protéine de fusion Luciferase-GFP (de l'anglais, *green fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur du gène de l'insuline (Fontés et al. Manuscrit en préparation). Dans un premier temps, il serait intéressant de mesurer l'activité luciférase du promoteur du gène de l'insuline dans les îlots de Langerhans isolés de notre modèle de rat transgénique et exposés à des doses croissantes de LPS. Dans un deuxième temps, il serait important de confirmer nos observations et d'évaluer la contribution *in vivo* des LPS sur l'activité promotrice du gène de l'insuline par l'implantation d'une minipompe osmotique sous-cutanée dans notre modèle de rat transgénique. Suite à la libération chronique de faibles doses de LPS, les îlots de Langerhans seraient isolés, puis l'activité luciférase en réponse à une stimulation à des concentrations élevées de glucose serait mesurée. Nous nous attendons bien entendu à une diminution de l'activité promotrice du gène de l'insuline en réponse à une exposition aux LPS, autant dans nos îlots exposés *in vitro* qu'*in vivo*.

Dans un autre ordre d'idées, nous avons montré que les effets délétères des LPS sur la régulation du gène de l'insuline impliquent la voie NF- $\kappa$ B. Dans le but de confirmer l'implication *in vivo* de NF- $\kappa$ B dans les effets délétères des LPS sur le gène de l'insuline, il serait intéressant d'inhiber temporairement NF- $\kappa$ B dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Or, il

existe un modèle de souris transgénique qui exprime spécifiquement dans les cellules  $\beta$  une forme non dégradable d'I $\kappa$ B $\alpha$  [388]. L'expression de ce gène est inductible et réversible, due à l'utilisation du système de régulation *tet-on*. Ces souris appelées souris ToI- $\beta$  (de l'anglais, *tet-on delta I $\kappa$ B in  $\beta$ -cells*) sont complètement protégées d'un diabète induit par l'exposition à la streptozotocine [389]. Il serait donc intéressant de mesurer les niveaux messagers de l'insuline, PDX-1 et de MafA dans les îlots de ces souris suite à une exposition aux LPS *via* l'utilisation de la minipompe osmotique sous-cutanée discutée précédemment, en présence et en absence d'activation du système *tet-on*. Nous nous attendons à ce que l'inhibition temporaire de NF- $\kappa$ B dans la souris ToI- $\beta$  restaure l'inhibition du gène de l'insuline en réponse aux LPS, comparativement aux souris contrôle.

Somme toute, ces expériences permettraient une meilleure compréhension du rôle d'ATF6 $\alpha$  dans la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique, ainsi que des mécanismes qui sous-tendent les effets délétères *in vivo* des LPS sur l'expression du gène de l'insuline. Les résultats provenant de ces expériences fourniraient certainement quelques indices sur les traitements envisageables qui permettraient une prévention ou une atténuation de la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique.

### **Serait-il possible de prévenir ou d'atténuer la dysfonction de la cellule $\beta$ -pancréatique par l'inhibition du stress du RE et/ou par l'inactivation du récepteur TLR4?**

#### *Généralités*

Le DT2 demeure à ce jour une maladie incurable. Toutefois, plusieurs traitements aident les patients diabétiques à normaliser leur glycémie et améliorent du même coup leur qualité de vie. Le DT2 est caractérisé par un défaut de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques et par une augmentation de la résistance des tissus périphériques à l'insuline. La plupart des traitements actuels visent à améliorer la sensibilité de ces derniers à l'action

de l'insuline ou à capter le glucose en excès dans la circulation sanguine. Certains de ces traitements visent également à améliorer la capacité de sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Quelques agents pharmacologiques, tels les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de l'enzyme DPP4 (de l'anglais, *dipeptidyl peptidase 4*) sont présentement employés à titre de traitement du DT2. Ces inhibiteurs ont pour objectif thérapeutique d'augmenter la demi-vie du GLP-1, une hormone incrétine libérée par les cellules intestinales L, qui exerce une fonction importante dans le contrôle de la glycémie en régulant à la hausse la sécrétion d'insuline et en inhibant du même coup la sécrétion de glucagon par les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Toutefois, la demi-vie du GLP-1 dans la circulation sanguine est très courte due à sa dégradation rapide par l'enzyme DPP-4. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme DPP-4 améliore la glycémie des patients diabétiques en allongeant la demi-vie du GLP-1. Les traitements visant à améliorer la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique étant peu nombreux, il est d'intérêt de développer de nouveaux moyens pour améliorer la fonction de la cellule  $\beta$ .

*Les chaperonnes chimiques, une intervention qui améliore le repliement des protéines et possiblement la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique*

Certaines maladies humaines sont associées à un défaut dans le repliement des protéines. Parmi ces maladies, citons la fibrose kystique, la maladie d'Alzheimer, la déficience en  $\alpha$ 1-antitrypsine, la maladie de Creutzfeld-Jacob, etc. (révisé dans [390, 391]). Également, la dysfonction de la cellule  $\beta$  est en partie causée par un mauvais repliement de l'insuline dans le RE. En conséquence, un intérêt grandissant est désormais porté sur les mécanismes responsables du repliement des protéines.

Le RE présente un environnement spécial et riche en  $\text{Ca}^{2+}$ , essentiel au bon fonctionnement des nombreuses chaperonnes qui détectent les protéines qui ne sont pas dans leur état natif, favorisent leur repliement adéquat ou les ciblent pour leur dégradation. Tel que mentionné maintes fois dans cette thèse, une accumulation de protéines mal repliées entraîne le développement de la réponse UPR dont le but principal consiste à maintenir la survie et l'homéostasie cellulaire *via* le renforcement la capacité des chaperonnes. Or, il existe plusieurs types de chaperonnes : les chaperonnes moléculaires, chimiques et

pharmacologiques (révisé dans [392]). Alors que les chaperonnes moléculaires assistent la stabilisation, l'assemblage et la translocation des protéines, les chaperonnes pharmacologiques lient plutôt les protéines d'une façon irréversible et les stabilisent pour permettre leur repliement adéquat. Les chaperonnes chimiques sont quant à elles de petites molécules qui, de façon générale, augmentent la stabilité et assistent au repliement correct des protéines. Cette dernière classe de chaperonnes a récemment fait l'objet d'études dans le traitement de certaines maladies métaboliques. Entre autres, les chaperonnes chimiques PBA (de l'anglais, *4-phenylbutyrique acid*) et TUDCA (de l'anglais, *tauroursodeoxycholic acid*) ont été approuvées aux États-Unis par la FDA (de l'anglais, *food and drug administration*) respectivement pour leur utilisation clinique dans le traitement des désordres du cycle de l'urée, et pour des essais cliniques dans certaines maladies du foie [392]. Ces chaperonnes, qui ont l'immense avantage de pouvoir être administrées oralement, peuvent par ailleurs réduire le stress du RE et restaurer l'homéostasie glycémique dans un modèle de souris diabétiques. En effet, le traitement de souris diabétiques et obèses par les chaperonnes PBA et TUDCA a entraîné une normalisation de la glycémie, une restauration de la sensibilité à l'insuline et une augmentation l'action de l'insuline dans le foie, le muscle et le tissu adipeux [393]. Ces résultats montrent que les chaperonnes chimiques améliorent la capacité d'adaptation de RE et agissent à titre d'agents antidiabétiques potentiels pouvant être employés dans le traitement du DT2. Toutefois, la fonction de la cellule  $\beta$  n'a pas été évaluée dans cette étude. La normalisation de la glycémie par les chaperonnes chimiques est chose certaine le résultat de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, mais pourrait également résulter d'une amélioration de la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique.

Ainsi, en reprenant le modèle d'étude présentée dans la section précédente, il serait intéressant de mesurer l'activité du promoteur ainsi que les niveaux messagers de l'insuline dans les îlots isolés du rat transgénique développé au laboratoire, et exposés *in vivo* ou *in vitro* à un excès de glucose et d'acides gras (diète riche en lipides ou infusions de glucose et de lipides), en présence ou non d'un traitement oral de chaperonnes chimiques. Ainsi, une réduction du stress du RE par le traitement aux chaperonnes chimiques pourrait se traduire

par une restauration de l'activité du promoteur du gène de l'insuline et des niveaux messagers de son gène en réponse aux lipides.

#### *Les prébiotiques et les probiotiques*

Bien que la flore intestinale chez l'adulte soit relativement stable dans le temps [394], il n'en demeure pas moins que certains facteurs tels que les antibiotiques, les prébiotiques<sup>3</sup> et les probiotiques<sup>4</sup> en modifient la composition. Or, il a été rapporté que la modification de la flore bactérienne intestinale par un cocktail d'antibiotiques chez la souris obèse ob/ob est associée à une diminution des LPS circulants, et protège contre l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et l'inflammation induits par la diète [395, 396]. De la même façon, il a été rapporté que la modification du microbiome intestinal par l'administration de prébiotiques chez la souris entraîne une protection contre le développement d'un diabète induit par la diète [397]. Ainsi, la modulation de la flore bactérienne intestinale s'avère bénéfique dans le contrôle de la glycémie. Mais qu'en est-il de la fonction de la cellule  $\beta$  et de la régulation du gène de l'insuline? Il serait d'intérêt de vérifier les effets de l'ingestion de prébiotiques et de probiotiques sur la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique dans notre modèle de rat transgénique exposé aux LPS, traité ou non aux prébiotiques et/ou probiotiques. Une restauration subséquente des niveaux messagers de l'insuline, de même que l'atténuation de la voie NF- $\kappa$ B dans les îlots isolés de rat traités aux prébiotiques et/ou probiotiques indiquerait un rôle protecteur de la modulation du microbiome intestinal dans la régulation du gène de l'insuline et dans la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique.

#### *La thérapie anti-NF- $\kappa$ B*

L'inhibition d'IKK $\beta$  par des doses élevées de salicylates abaisse la glycémie des patients diabétiques [290-292], selon des mécanismes distincts. D'une part, le traitement des souris obèses et résistantes à l'insuline par des doses élevées de salicylates améliore leur glycémie

---

<sup>3</sup> Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne non-digestibles qui servent de substrat sélectif pour certaines bactéries de l'intestin et qui en stimulent la croissance.

<sup>4</sup> Les probiotiques sont microorganismes vivants non-pathogènes, en général des bactéries, qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantités appropriées, rétablissent l'équilibre de la flore bactérienne de l'intestin.

en augmentant la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline [398-400]. D'autre part, le traitement de *P. obesus*, un modèle animal de DT2, par un inhibiteur sélectif d'IKK $\beta$  entraîne une protection contre le développement d'un diabète induit par la diète en partie par la prévention de la perte de la biosynthèse d'insuline et de la mort cellulaire des cellules  $\beta$ -pancréatiques [401]. Or, nos travaux montrant également l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline, il est possible qu'en plus de ses effets sur la sensibilité à l'insuline, la biosynthèse de l'insuline et la survie cellulaire de la cellule  $\beta$ -pancréatique, l'inhibition de NF- $\kappa$ B améliore la glycémie par une action directe sur la régulation du gène de l'insuline et réponse aux LPS. Les expériences chez la souris décrites précédemment orienteraient, ou pas, vers un tel traitement thérapeutique. Tout compte fait, une thérapie anti-NF- $\kappa$ B, telle que l'administration de salicylates, pourrait se révéler efficace dans le traitement du DT2. Toutefois, les doses efficaces dans le traitement du DT2 sont élevées, et il est crucial de prendre en considération les effets secondaires imputables à l'administration de telles doses.

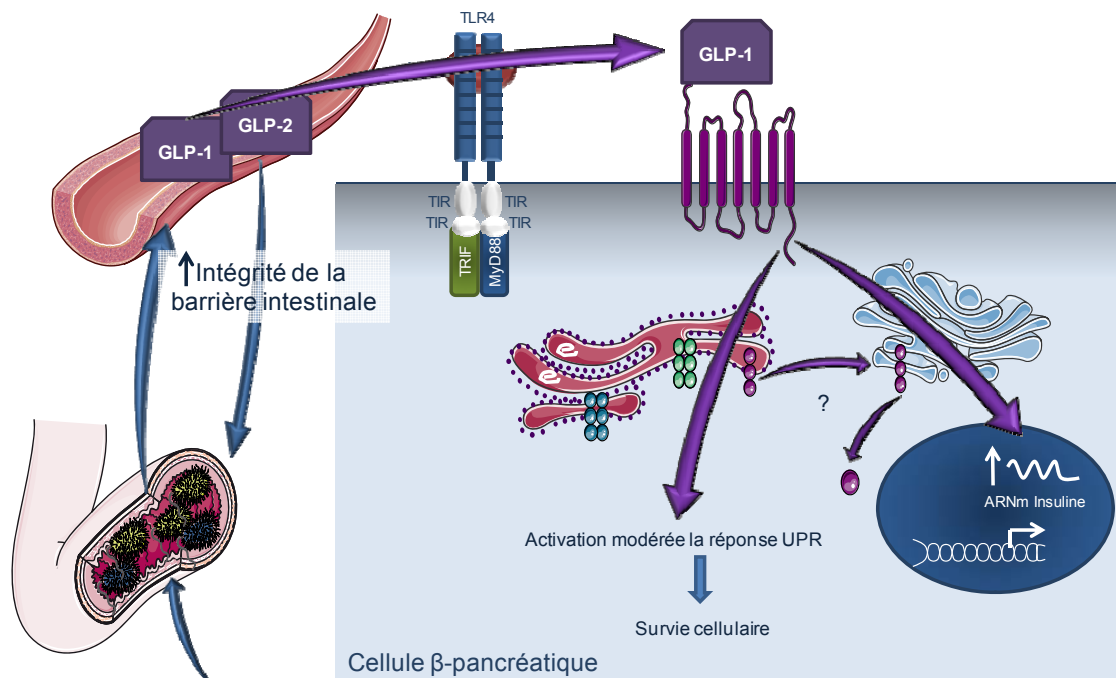
### *Les hormones incrélines*

Outre les chaperonnes chimiques, le GLP-1 serait un candidat intéressant dans la l'amélioration de la fonction de la cellule  $\beta$  (Figure 22). Tel que mentionné précédemment, l'activation modérée de la réponse UPR exerce des effets bénéfiques sur la fonction et la survie de la cellule  $\beta$ . Il s'avère que le GLP-1 est un activateur physiologique d'une réponse UPR modérée [347]. De plus, l'activation de la signalisation induite par un analogue du GLP-1 améliore non seulement la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique [402-404], mais augmente également les niveaux messagers de l'insuline [403]. D'autre part, l'ingestion de prébiotiques entraînent une augmentation de la sécrétion GLP-1 chez l'Homme [405, 406], et de GLP-1 et GLP-2 (de l'anglais, *glucagon-like peptide 2*) chez la souris [407]. Le GLP-2 a été rapporté pour améliorer la fonction de la barrière intestinale en agissant sur les jonctions serrées des cellules de l'épithélium intestinal [407]. Or, il a récemment été rapporté que le microbiome intestinal pourrait moduler l'intégrité de la barrière intestinale



et les niveaux d'endotoxémie via le GLP-2, qui est cosécrété avec le GLP-1 par les cellules L de l'intestin [407]. D'autres évidences supportent un rôle pour les hormones incrétines GLP-1 et GLP2 dans les effets bénéfiques des probiotiques sur la régulation de l'endotoxémie; la délétion de GLP-1 et de GLP-2 a renversé les effets bénéfiques des probiotiques sur la prise de poids, le métabolisme du glucose et sur l'activation de voies médiatrices de l'inflammation [407-409].

Il serait intéressant de tester si le GLP-1 exerce des effets bénéfiques sur l'expression du gène de l'insuline chez des souris présentant un stress du RE et dans notre modèle de rat transgénique présentant une endotoxémie. Il existe une protéine analogue du GLP-1, l'exendin-4, dont la demi-vie est supérieure à celle du GLP-1 et dont les effets sur la sécrétion d'insuline et l'homéostasie du glucose sont les mêmes. Ainsi, un effet positif sur la régulation du gène de l'insuline par le GLP-1 se traduirait par une restauration des niveaux messagers chez la souris présentant un stress du RE et par une restauration de l'activité du promoteur de l'insuline chez le rat transgénique qui présente une endotoxémie.



Modulation du microbiome intestinal  
(prébiotiques, probiotiques)

© Julie Amyot, 2011

## Figure 22: Modulation du stress du RE et de l'endotoxémie par les hormones GLP-1 et GLP-2

Une modulation du microbiome intestinal entraîne la sécrétion de GLP-1 et de GLP-2 par les cellules L de l'intestin. Alors que le GLP2 a été rapporté pour augmenter l'intégrité de la barrière intestinale et par conséquent, diminuer la concentration de LPS circulants, le GLP-1 active une réponse UPR modérée et exerce des effets bénéfiques sur la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique.

## **Les LPS circulants représentent-ils un biomarqueur du développement précoce de la dysfonction de la cellule $\beta$ ?**

Le DT2 est un problème de santé préoccupant : environ 30 % des individus diabétiques ne seraient pas encore diagnostiqués. Le développement de tests diagnostiques identifiant de façon précoce l'apparition ou encore les premiers signes de la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatiques, qui survient jusqu'à dix ans avant les premiers signes cliniques, serait ainsi très utile. Outre la mesure conventionnelle de la fonction de la cellule  $\beta$  par le score HOMA- $\beta$  (de l'anglais, *homeostasis model assessment*), qui mesure la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique par un calcul prenant en compte les valeurs de la glycémie et de l'insulinémie chez un patient donné, ou encore la détermination du ratio proinsuline sur insuline à jeun, il s'avère impératif d'identifier des biomarqueurs du DT2 qui seraient utiles dans la détection précoce de la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique.

### *Généralités sur les biomarqueurs*

Les biomarqueurs, ou marqueurs biologiques, sont des protéines ou encore des gènes qui peuvent être objectivement mesurés et évalués à titre d'indicateurs de processus biologiques normaux, impliqués dans la maladie ou encore modulés en réponse à une intervention thérapeutique. La recherche de biomarqueurs peut découler d'hypothèses générées en fonction de mécanismes pathophysiologiques, ou être basée sur les résultats provenant de larges mesures de marqueurs biologiques fournis par les nouvelles technologies « -omics ». Plusieurs critères doivent être respectés pour considérer un biomarqueur comme novateur et incluent, entre autres, une méthode de détection valide et précise ainsi qu'un effet bénéfique clinique pour les patients.

### *Les LPS circulants seraient-ils des biomarqueurs de la dysfonction précoce de la cellule $\beta$ -pancréatique?*

Chez l'Homme, la concentration des LPS circulants est plus élevée chez les individus diabétiques en comparaison aux sujets non-diabétiques [340]. En outre, cette endotoxémie

est également associée à l'augmentation du risque de développer une résistance à l'insuline [342, 343] ainsi qu'un diabète [344]. Le dosage des LPS circulants pourrait donc représenter un moyen de mesurer de façon précoce la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique. Un exemple qui supporte cette idée a très récemment été rapporté par Amar et al. [410]. Dans une étude longitudinale impliquant 3280 participants, Amar et al. ont mesuré la concentration sanguine de l'ARN ribosomique bactérien 16S dans une population d'individus ne présentant à la base aucun diabète ou obésité. Leurs résultats sont fascinants : les concentrations circulantes de l'ARN ribosomique 16S rapportées étaient plus élevées chez les sujets qui ont développé un diabète, indépendamment du développement ou non d'une obésité. Toutefois, la mesure de l'ARN ribosomique 16S étant effectuée par PCR en temps réel, la préparation des échantillons s'avère longue et laborieuse. Ainsi, le dosage des LPS circulants suite à une simple ponction veineuse et à un dosage rapide, sensible et spécifique [411] pourrait représenter une méthode efficace pour évaluer une prédisposition au DT2 chez un groupe de patients à risque. Dans le même ordre d'idées, un tel dosage permettrait également un suivi non invasif de l'efficacité d'une thérapie médicamenteuse, ou permettrait encore l'évaluation des bienfaits d'une modification des habitudes de vie ou de la prise de prébiotiques et/ou probiotiques. Bien entendu, les valeurs de référence des LPS circulants devront être établies dans un premier temps afin d'identifier la normalité chez des individus apparemment en bonne santé et présentant un poids normal. Des études longitudinales supplémentaires évaluant la corrélation entre la concentration sanguine des LPS et la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique devront être effectuées dans un deuxième temps. Toutefois, il est important de mentionner que d'autres marqueurs d'inflammation chronique telle que la CRP ultra sensible n'ont pas significativement amélioré la prédiction du diabète au-delà de l'hyperglycémie orale provoquée, des mesures anthropométriques et de l'histoire familiale. Cet exemple illustre toute la difficulté reliée à l'utilisation de biomarqueurs sanguins pour la prédiction du diabète et des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle la mesure des LPS circulants pourrait représenter un biomarqueur de la dysfonction

de la cellule  $\beta$ -pancréatique s'avère très encourageante et un tel dosage contribuerait sans aucun doute à l'amélioration des méthodes de détection précoce des patients diabétiques.

## **CONCLUSIONS**

Collectivement, les travaux présentés dans cette thèse ont permis l'identification de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans la répression du gène de l'insuline en réponse aux divers changements survenant de façon précoce dans l'évolution du DT2. D'une part, l'identification d'ATF6 comme nouveau facteur de régulation de l'expression du gène de l'insuline contribue à la compréhension des mécanismes physiopathologiques du défaut de la cellule  $\beta$ -pancréatique dans le DT2. D'autre part, la démonstration de la répression du gène de l'insuline par les LPS à des concentrations comparables à celles rencontrées au cours de l'endotoxémie chez l'Homme suggère qu'une répression directe du gène de l'insuline pourrait contribuer à la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique lors d'une altération du microbiome intestinal survenant en situation d'obésité et de DT2. De plus, l'identification d'un rôle pour le récepteur TLR4 et pour la voie de signalisation NF- $\kappa$ B dans la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique représente une étude originale reliant l'immunité innée au DT2.

Sur la base de nos résultats, nous avons également proposé de nouvelles hypothèses mécanistiques telles qu'un rôle possible pour les hormones incrétines GLP-1 et GLP-2 dans les effets protecteurs d'ATF6 sur la régulation du gène de l'insuline, ainsi que dans la protection contre la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique induite par la modulation du microbiome intestinal. Les propositions d'approches thérapeutiques possibles abordées dans cette thèse, qui devront être testées, pourraient un jour prévenir ou ralentir la détérioration de l'homéostasie glycémique au cours du DT2. Enfin, les LPS circulants à titre de biomarqueurs de la dysfonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique se révèlent être une avenue possible dans le diagnostic précoce des individus à risque de développer un DT2.

Le DT2 survient dans la plupart des cas chez des individus génétiquement prédisposés. Il n'en demeure pas moins que des interventions axées sur le mode de vie ou la médication représentent tout de même un moyen de prévenir 30 à 60 % des cas de DT2 [10], qui affecte plus de deux millions de Canadiens.

## BIBLIOGRAPHIE

1. *Ancient Egyptian medicine : the Papyrus Ebers* 1974, Chicago: Ares Publishers. xl, 167 , [8] de planches.
2. Dwivedi, G.a.D., S., *Sushruta – the Clinician – Teacher par Excellence*. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2007. **49**: p. 243-244.
3. Cappadoce, A.d. and L. Renaud, *Traité des signes, des causes et de la cure des maladies aiguës et chroniques* 1834, Paris. In-8°.
4. Dobson, M., *Nature of urine in diabetes*. Medical Observations and Inquiries, 1776. **5**: p. 298-310.
5. Bernard, C., *Recherches sur une nouvelle fonction du foie, considéré comme organe producteur de matière sucrée chez l'homme et les animaux*, 1853, Imprimerie de L. Martinet: Paris,.
6. Laguesse, E., *Sur la formation des ilots de Langerhans dans le pancreas. .* Comptes Rend Soc Biol, 1893. **5**( (Series 9)): p. 819-20.
7. Banting, F.G., et al., *Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report*. 1922. CMAJ, 1991. **145**(10): p. 1281-6.
8. Osler, W., et al., *The principles and practice of medicine : designed for the use of practitioners and students of medicine*. 3rd ed 1900, New York: D. Appleton. xvi, 1,181 p.
9. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **94**(3): p. 311-21.
10. Diabète, A.C.d., *Lignes directrices de pratique clinique 2008 de l'Association canadienne du diabète pour la prévention et le traitement du diabète au Canada*. Canadian Journal of Diabetes, 2008. **32**(Suppl. 1): p. S1-S225.
11. Rayfield, E.J. and Y. Seto, *Viruses and the pathogenesis of diabetes mellitus*. Diabetes, 1978. **27**(11): p. 1126-40.
12. Lernmark, A. and J. Ott, *Sometimes it's hot, sometimes it's not*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 213-4.
13. Onkamo, P., et al., *Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends*. Diabetologia, 1999. **42**(12): p. 1395-403.
14. Pitkaniemi, J., et al., *Increasing incidence of Type 1 diabetes--role for genes? BMC Genet*, 2004. **5**: p. 5.
15. Knip, M., *Can we predict type 1 diabetes in the general population?* Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 623-5.
16. Engelgau, M.M., et al., *The epidemiology of diabetes and pregnancy in the U.S., 1988*. Diabetes Care, 1995. **18**(7): p. 1029-33.
17. King, H., *Epidemiology of glucose intolerance and gestational diabetes in women of childbearing age*. Diabetes Care, 1998. **21 Suppl 2**: p. B9-13.
18. Naylor, C.D., et al., *Cesarean delivery in relation to birth weight and gestational glucose tolerance: pathophysiology or practice style? Toronto*



- Trihospital Gestational Diabetes Investigators*. JAMA, 1996. **275**(15): p. 1165-70.
19. Metzger, B.E., *Summary and recommendations of the Third International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus*. Diabetes, 1991. **40 Suppl 2**: p. 197-201.
  20. Malecki, M.T. and W. Mlynarski, *Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(8): p. 607-16.
  21. Fajans, S.S., G.I. Bell, and K.S. Polonsky, *Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young*. N Engl J Med, 2001. **345**(13): p. 971-80.
  22. Giuffrida, F.M. and A.F. Reis, *Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young*. Diabetes Obes Metab, 2005. **7**(4): p. 318-26.
  23. Taylor, S.I., *Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene*. Diabetes, 1992. **41**(11): p. 1473-90.
  24. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2005. **28 Suppl 1**: p. S37-42.
  25. Nouwen, A., et al., *Type 2 diabetes mellitus as a risk factor for the onset of depression: a systematic review and meta-analysis*. Diabetologia, 2010. **53**(12): p. 2480-6.
  26. Egede, L.E., *Effects of depression on work loss and disability bed days in individuals with diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1751-3.
  27. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): p. 977-86.
  28. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group*. Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
  29. Ohinmaa, A., *The projection of prevalence and cost of diabetes in Canada: 2000 to 2016*. Can J Diabetes, 2004. **28**: p. 116-123.
  30. DeFronzo, R.A., *International textbook of diabetes mellitus*. 3rd ed 2004, Chichester ; Hoboken, N.J.: Wiley.
  31. Reaven, G.M., *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes, 1988. **37**(12): p. 1595-607.
  32. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
  33. Eriksson, K.F. and F. Lindgarde, *Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study*. Diabetologia, 1991. **34**(12): p. 891-8.

34. Pan, X.R., et al., *Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study.* Diabetes Care, 1997. **20**(4): p. 537-44.
35. Tuomilehto, J., et al., *Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance.* N Engl J Med, 2001. **344**(18): p. 1343-50.
36. Groop, L., et al., *Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects.* Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1585-93.
37. Kaprio, J., et al., *Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland.* Diabetologia, 1992. **35**(11): p. 1060-7.
38. Newman, B., et al., *Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins.* Diabetologia, 1987. **30**(10): p. 763-8.
39. Diamond, J., *The double puzzle of diabetes.* Nature, 2003. **423**(6940): p. 599-602.
40. Glans, F., et al., *Immigrants from the Middle-East have a different form of Type 2 diabetes compared with Swedish patients.* Diabet Med, 2008. **25**(3): p. 303-7.
41. Billings, L.K. and J.C. Florez, *The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS?* Ann N Y Acad Sci, 2010. **1212**: p. 59-77.
42. Ahlqvist, E., T.S. Ahluwalia, and L. Groop, *Genetics of type 2 diabetes.* Clin Chem, 2011. **57**(2): p. 241-54.
43. Horikawa, Y., et al., *Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus.* Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 163-75.
44. Sladek, R., et al., *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes.* Nature, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
45. Loder, M.K., et al., *TCF7L2 controls insulin gene expression and insulin secretion in mature pancreatic beta-cells.* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 357-9.
46. da Silva Xavier, G., et al., *TCF7L2 regulates late events in insulin secretion from pancreatic islet beta-cells.* Diabetes, 2009. **58**(4): p. 894-905.
47. Johnson, J.D., et al., *Impaired insulin secretion in transgenic mice over-expressing calpastatin in pancreatic beta-cells.* Islets, 2009. **1**(3): p. 242-8.
48. Pinney, S.E. and R.A. Simmons, *Epigenetic mechanisms in the development of type 2 diabetes.* Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(4): p. 223-9.
49. Park, J.H., et al., *Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1.* J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2316-24.
50. Simmons, R.A., L.J. Templeton, and S.J. Gertz, *Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat.* Diabetes, 2001. **50**(10): p. 2279-86.

51. Lillioja, S., et al., *Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians*. N Engl J Med, 1988. **318**(19): p. 1217-25.
52. Martin, B.C., et al., *Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study*. Lancet, 1992. **340**(8825): p. 925-9.
53. Leahy, J.L., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 197-209.
54. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity*. Endocrinology, 2002. **143**(2): p. 339-42.
55. Porte, D., Jr., *Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Diabetes Metab Res Rev, 2001. **17**(3): p. 181-8.
56. Prentki, M., et al., *Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S405-13.
57. Holman, R.R., *Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states*. Diabetes Res Clin Pract, 1998. **40 Suppl**: p. S21-5.
58. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
59. Poitout, V., *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality?* Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 5): p. 901-4.
60. Poitout, V., et al., *Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(3): p. 289-98.
61. Poitout, V., et al., *Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids*. J Nutr, 2006. **136**(4): p. 873-6.
62. Poitout, V. and R.P. Robertson, *Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction*. Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 351-66.
63. Stefan, Y., et al., *Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans*. Diabetes, 1982. **31**(8 Pt 1): p. 694-700.
64. Sakuraba, H., et al., *Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients*. Diabetologia, 2002. **45**(1): p. 85-96.
65. Saito, K., et al., *Islet morphometry in the diabetic pancreas of man*. Tohoku J Exp Med, 1978. **125**(2): p. 185-97.
66. Rahier, J., et al., *Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10 Suppl 4**: p. 32-42.
67. Rahier, J., R.M. Goebbels, and J.C. Henquin, *Cellular composition of the human diabetic pancreas*. Diabetologia, 1983. **24**(5): p. 366-71.
68. Clark, A., et al., *Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes*. Diabetes Res, 1988. **9**(4): p. 151-9.

69. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 102-10.
70. Marchetti, P., et al., *Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5535-41.
71. Marchetti, P., et al., *The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients*. Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2486-94.
72. Finegood, D.T., L. Scaglia, and S. Bonner-Weir, *Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model*. Diabetes, 1995. **44**(3): p. 249-56.
73. Bonner-Weir, S. and A. Sharma, *Pancreatic stem cells*. J Pathol, 2002. **197**(4): p. 519-26.
74. Kahn, S.E., S. Andrikopoulos, and C.B. Verchere, *Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes*. Diabetes, 1999. **48**(2): p. 241-53.
75. Kahn, S.E., et al., *Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide and insulin by beta-cells*. Diabetes, 1990. **39**(5): p. 634-8.
76. de Luca, C. and J.M. Olefsky, *Inflammation and insulin resistance*. FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 97-105.
77. Olgivie, R., *A quantitative study of the pancreatic islet tissue*. Q J Med, 1937. **6**: p. 278-291.
78. Zanone, M.M., E. Favaro, and G. Camussi, *From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium*. Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(1): p. 1-9.
79. Brunicardi, F.C., et al., *Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium*. Diabetes, 1996. **45**(4): p. 385-92.
80. Lonovics, J., et al., *Pancreatic polypeptide. A review*. Arch Surg, 1981. **116**(10): p. 1256-64.
81. Hellman, B., *A method for rapid estimation of the islet volume in the rat pancreas based on counting instead of measuring the islet section surfaces*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1959. **47**: p. 21-34.
82. Elayat, A.A., M.M. el-Naggar, and M. Tahir, *An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets*. J Anat, 1995. **186 ( Pt 3)**: p. 629-37.
83. Orci, L. and R.H. Unger, *Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells*. Lancet, 1975. **2**(7947): p. 1243-4.
84. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
85. Dunger, D.B., *Insulin and insulin-like growth factors in diabetes mellitus*. Arch Dis Child, 1995. **72**(6): p. 469-71.

86. Gerich, J.E. and P.J. Campbell, *Overview of counterregulation and its abnormalities in diabetes mellitus and other conditions*. *Diabetes Metab Rev*, 1988. **4**(2): p. 93-111.
87. Meyer, C., et al., *Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **282**(2): p. E419-27.
88. Lefebvre, P.J., *Glucagon and its family revisited*. *Diabetes Care*, 1995. **18**(5): p. 715-30.
89. Woods, S.C., et al., *Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons*. *Nature*, 1979. **282**(5738): p. 503-5.
90. Obici, S., et al., *Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production*. *Nat Med*, 2002. **8**(12): p. 1376-82.
91. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
92. Capeau, J., [*Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance*]. *Med Sci (Paris)*, 2003. **19**(8-9): p. 834-9.
93. Schuit, F.C., P.A. In't Veld, and D.G. Pipeleers, *Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(11): p. 3865-9.
94. Van Lommel, L., et al., *Probe-independent and direct quantification of insulin mRNA and growth hormone mRNA in enriched cell preparations*. *Diabetes*, 2006. **55**(12): p. 3214-20.
95. Schuit, F.C., R. Kiekens, and D.G. Pipeleers, *Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **178**(3): p. 1182-7.
96. Ryle, A.P., et al., *The disulphide bonds of insulin*. *Biochem J*, 1955. **60**(4): p. 541-56.
97. Brown, H., F. Sanger, and R. Kitai, *The structure of pig and sheep insulins*. *Biochem J*, 1955. **60**(4): p. 556-65.
98. Sanger, F., *Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes*. *Science*, 1959. **129**(3359): p. 1340-4.
99. Welsh, M., et al., *Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose*. *Biochem J*, 1986. **235**(2): p. 459-67.
100. Morris, G.E. and A. Korner, *The effect of glucose on insulin biosynthesis by isolated islets of Langerhans of the rat*. *Biochim Biophys Acta*, 1970. **208**(3): p. 404-13.
101. Itoh, N., et al., *Glucose stimulation of the proinsulin synthesis in isolated pancreatic islets without increasing amount of proinsulin mRNA*. *FEBS Lett*, 1978. **93**(2): p. 343-7.
102. Blobel, G. and B. Dobberstein, *Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent*

- immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma.* J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 835-51.
103. Wicksteed, B., et al., *Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation.* J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22553-8.
  104. Wicksteed, B., et al., *A cis-element in the 5' untranslated region of the preproinsulin mRNA (ppIGE) is required for glucose regulation of proinsulin translation.* Cell Metab, 2007. **5**(3): p. 221-7.
  105. Kulkarni, S.D., et al., *Glucose-stimulated translation regulation of insulin by the 5' UTR-binding proteins.* J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 14146-56.
  106. Tang, J.G., C.C. Wang, and C.L. Tsou, *Formation of native insulin from the scrambled molecule by protein disulphide-isomerase.* Biochem J, 1988. **255**(2): p. 451-5.
  107. Goodge, K.A. and J.C. Hutton, *Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell.* Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(4): p. 235-42.
  108. Seidah, N.G., et al., *cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases.* DNA Cell Biol, 1990. **9**(10): p. 789.
  109. Seidah, N.G., et al., *Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2.* Mol Endocrinol, 1991. **5**(1): p. 111-22.
  110. Kahn, S.E. and P.A. Halban, *Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM.* Diabetes, 1997. **46**(11): p. 1725-32.
  111. Ward, W.K., et al., *Disproportionate elevation of immunoreactive proinsulin in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and in experimental insulin resistance.* Diabetologia, 1987. **30**(9): p. 698-702.
  112. Porte, D., Jr. and S.E. Kahn, *Hyperproinsulinemia and amyloid in NIDDM. Clues to etiology of islet beta-cell dysfunction?* Diabetes, 1989. **38**(11): p. 1333-6.
  113. Rhodes, C.J. and C. Alarcon, *What beta-cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM? Some clues from recent advances made in understanding the proinsulin-processing mechanism.* Diabetes, 1994. **43**(4): p. 511-7.
  114. Guillam, M.T., et al., *Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2.* Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 327-30.
  115. Matschinsky, F.M., *Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm.* Diabetes, 1996. **45**(2): p. 223-41.

116. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison, and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells*. *Nature*, 1984. **312**(5993): p. 446-8.
117. Tarasov, A., J. Dusonchet, and F. Ashcroft, *Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: a pas de deux*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 3**: p. S113-22.
118. Cook, D.L. and C.N. Hales, *Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells*. *Nature*, 1984. **311**(5983): p. 271-3.
119. Ashcroft, F.M., et al., *Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells*. *J Cell Biochem*, 1994. **55 Suppl**: p. 54-65.
120. Dean, P.M., *Ultrastructural morphometry of the pancreatic -cell*. *Diabetologia*, 1973. **9**(2): p. 115-9.
121. Olofsson, C.S., et al., *Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells*. *Pflugers Arch*, 2002. **444**(1-2): p. 43-51.
122. Straub, S.G., G. Shanmugam, and G.W. Sharp, *Stimulation of insulin release by glucose is associated with an increase in the number of docked granules in the beta-cells of rat pancreatic islets*. *Diabetes*, 2004. **53**(12): p. 3179-83.
123. Rorsman, P., *The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint*. *Diabetologia*, 1997. **40**(5): p. 487-95.
124. Lang, J., *Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion*. *Eur J Biochem*, 1999. **259**(1-2): p. 3-17.
125. Nolan, C.J., et al., *Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion*. *Diabetes*, 2006. **55 Suppl 2**: p. S16-23.
126. Henquin, J.C., et al., *Shortcomings of current models of glucose-induced insulin secretion*. *Diabetes Obes Metab*, 2009. **11 Suppl 4**: p. 168-79.
127. Rosenzweig, J.L., et al., *Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(1): p. 572-6.
128. Kojima, H., et al., *Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(8): p. 2458-63.
129. Devaskar, S.U., et al., *Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(11): p. 8445-54.
130. Vafiadis, P., et al., *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 289-92.
131. Smith, K.M., et al., *Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance*. *Int Immunol*, 1997. **9**(9): p. 1355-65.
132. Pugliese, A., et al., *The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 293-7.
133. Cunha, D.A., et al., *Insulin secretion by rat lacrimal glands: effects of systemic and local variables*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **289**(5): p. E768-75.

134. Vallejo, G., et al., *Characterization of immunoreactive insulin in human saliva: evidence against production in situ*. Diabetologia, 1984. **27**(4): p. 437-40.
135. Schwartz, M.W. and D. Porte, Jr., *Diabetes, obesity, and the brain*. Science, 2005. **307**(5708): p. 375-9.
136. Pugliese, A., *Insulin expression in the thymus, tolerance, and type 1 diabetes*. Diabetes Metab Rev, 1998. **14**(4): p. 325-7.
137. Porte, D., Jr., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, *Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from C. elegans to humans*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1264-76.
138. Steiner, D.F., et al., *Structure and evolution of the insulin gene*. Annu Rev Genet, 1985. **19**: p. 463-84.
139. Soares, M.B., et al., *RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(8): p. 2090-103.
140. Steiner, D.F., et al., *Proinsulin and the biosynthesis of insulin*. Recent Prog Horm Res, 1969. **25**: p. 207-82.
141. Rudnick, A., et al., *Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12203-7.
142. Petersen, H.V., et al., *Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10465-9.
143. Melloul, D., *Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1014**: p. 28-37.
144. Ahlgren, U., et al., *beta-cell-specific inactivation of the mouse Ipf1/Pdx1 gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes*. Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1763-8.
145. Brissova, M., et al., *Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 11225-32.
146. Zhang, C., et al., *MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 4969-76.
147. Docherty, H.M., et al., *Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter*. Biochem J, 2005. **389**(Pt 3): p. 813-20.
148. Naya, F.J., C.M. Stellrecht, and M.J. Tsai, *Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor*. Genes Dev, 1995. **9**(8): p. 1009-19.
149. Murre, C., et al., *Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence*. Cell, 1989. **58**(3): p. 537-44.
150. Karlsson, O., et al., *A mutational analysis of the insulin gene transcription control region: expression in beta cells is dependent on two related*



- sequences within the enhancer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 8819-23.
151. Whelan, J., et al., *Pancreatic beta-cell-type-specific expression of the rat insulin II gene is controlled by positive and negative cellular transcriptional elements.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(8): p. 3253-9.
  152. Inada, A., et al., *Transcriptional repressors are increased in pancreatic islets of type 2 diabetic rats.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(3): p. 712-8.
  153. Inada, A., et al., *The cyclic AMP response element modulator family regulates the insulin gene transcription by interacting with transcription factor IID.* J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21095-103.
  154. Hussain, M.A., P.B. Daniel, and J.F. Habener, *Glucagon stimulates expression of the inducible cAMP early repressor and suppresses insulin gene expression in pancreatic beta-cells.* Diabetes, 2000. **49**(10): p. 1681-90.
  155. Fontes, G., et al., *Involvement of Per-Arnt-Sim Kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells.* Diabetes, 2009. **58**(9): p. 2048-58.
  156. Zhao, L., et al., *The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription.* J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 11887-94.
  157. Vanderford, N.L., S.S. Andrali, and S. Ozcan, *Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway.* J Biol Chem, 2007. **282**(3): p. 1577-84.
  158. Melloul, D., S. Marshak, and E. Cerasi, *Regulation of pdx-1 gene expression.* Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S320-5.
  159. Raum, J.C., et al., *FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5735-43.
  160. Han, S.I., et al., *MafA stability in pancreatic beta cells is regulated by glucose and is dependent on its constitutive phosphorylation at multiple sites by glycogen synthase kinase 3.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(19): p. 6593-605.
  161. Khoo, S., et al., *Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells.* J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32969-77.
  162. Qiu, Y., et al., *Acetylation of the BETA2 transcription factor by p300-associated factor is important in insulin gene expression.* J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9796-802.
  163. Andrali, S.S., Q. Qian, and S. Ozcan, *Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation.* J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15589-96.
  164. Rafiq, I., H.J. Kennedy, and G.A. Rutter, *Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the*

- nucleoplasm of single MIN6 beta-cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23241-7.
165. Mosley, A.L. and S. Ozcan, *The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose.* J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54241-7.
  166. Mosley, A.L. and S. Ozcan, *Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4.* J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19660-6.
  167. Mosley, A.L., J.A. Corbett, and S. Ozcan, *Glucose regulation of insulin gene expression requires the recruitment of p300 by the beta-cell-specific transcription factor Pdx-1.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2279-90.
  168. Deering, T.G., et al., *Methyltransferase Set7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes.* Diabetes, 2009. **58**(1): p. 185-93.
  169. Qiu, Y., et al., *Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(2): p. 412-20.
  170. Sharma, A., et al., *The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 704-13.
  171. Qiu, Y., A. Sharma, and R. Stein, *p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2957-64.
  172. Glick, E., D. Leshkowitz, and M.D. Walker, *Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter.* J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 2199-204.
  173. Melloul, D., Y. Ben-Neriah, and E. Cerasi, *Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 3865-9.
  174. Sharma, A. and R. Stein, *Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 871-9.
  175. Aramata, S., et al., *Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1730**(1): p. 41-6.
  176. Lawrence, M.C., et al., *ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter.* J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 26751-9.
  177. Welsh, M., et al., *Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability.* J Biol Chem, 1985. **260**(25): p. 13590-4.
  178. Tillmar, L., C. Carlsson, and N. Welsh, *Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence.* J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1099-106.

179. Leibiger, B., et al., *Short-term regulation of insulin gene transcription by glucose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9307-12.
180. Evans-Molina, C., et al., *Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets*. Diabetes, 2007. **56**(3): p. 827-35.
181. Iype, T., et al., *Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 16798-807.
182. Kemp, D.M. and J.F. Habener, *Insulinotropic hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) activation of insulin gene promoter inhibited by p38 mitogen-activated protein kinase*. Endocrinology, 2001. **142**(3): p. 1179-87.
183. Drucker, D.J., et al., *Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(10): p. 3434-8.
184. Fehmann, H.C. and J.F. Habener, *Galanin inhibits proinsulin gene expression stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) in mouse insulinoma beta TC-1 cells*. Endocrinology, 1992. **130**(5): p. 2890-6.
185. Stoffers, D.A., et al., *Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 741-8.
186. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells*. Diabetologia, 1999. **42**(7): p. 856-64.
187. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity*. Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 806-15.
188. Wang, X., et al., *Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism*. Endocrinology, 2001. **142**(5): p. 1820-7.
189. Petryk, A., et al., *Prolactin induction of insulin gene expression: the roles of glucose and glucose transporter-2*. J Endocrinol, 2000. **164**(3): p. 277-86.
190. Billestrup, N., et al., *Growth hormone receptor C-terminal domains required for growth hormone-induced intracellular free Ca<sup>2+</sup> oscillations and gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2725-9.
191. Lu, M., J. Seufert, and J.F. Habener, *Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28349-59.
192. Seufert, J., G.C. Weir, and J.F. Habener, *Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells*

- during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1998. **101**(11): p. 2528-39.
193. Inagaki, N., et al., *c-Jun represses the human insulin promoter activity that depends on multiple cAMP response elements*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(3): p. 1045-9.
  194. Robinson, G.L., et al., *c-jun inhibits insulin control element-mediated transcription by affecting the transactivation potential of the E2A gene products*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(3): p. 1398-404.
  195. Zhang, H.J., et al., *Somatostatin and epinephrine decrease insulin messenger ribonucleic acid in HIT cells through a pertussis toxin-sensitive mechanism*. *Endocrinology*, 1991. **129**(5): p. 2409-14.
  196. Redmon, J.B., H.C. Towle, and R.P. Robertson, *Regulation of human insulin gene transcription by glucose, epinephrine, and somatostatin*. *Diabetes*, 1994. **43**(4): p. 546-51.
  197. Philippe, J., *Somatostatin inhibits insulin-gene expression through a posttranscriptional mechanism in a hamster islet cell line*. *Diabetes*, 1993. **42**(2): p. 244-9.
  198. Seufert, J., T.J. Kieffer, and J.F. Habener, *Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(2): p. 674-9.
  199. Seufert, J., et al., *Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(2): p. 670-6.
  200. Zhao, A.Z., K.E. Bornfeldt, and J.A. Beavo, *Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(5): p. 869-73.
  201. Koranyi, L., et al., *Feedback inhibition of insulin gene expression by insulin*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(2): p. 432-6.
  202. Robertson, R.P., L.K. Olson, and H.J. Zhang, *Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene*. *Diabetes*, 1994. **43**(9): p. 1085-9.
  203. Yang, B.T., et al., *Insulin promoter DNA methylation correlates negatively with insulin gene expression and positively with HbA(1c) levels in human pancreatic islets*. *Diabetologia*, 2011. **54**(2): p. 360-7.
  204. Orland, M.J. and M.A. Permutt, *Quantitative analysis of pancreatic proinsulin mRNA in genetically diabetic (db/db) mice*. *Diabetes*, 1987. **36**(3): p. 341-7.
  205. Tokuyama, Y., et al., *Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat*. *Diabetes*, 1995. **44**(12): p. 1447-57.
  206. Briaud, I., et al., *Glucose-induced insulin mRNA accumulation is impaired in islets from neonatal streptozotocin-treated rats*. *Horm Metab Res*, 2000. **32**(3): p. 103-6.

207. Leibowitz, G., et al., *Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure.* Endocrinology, 2002. **143**(9): p. 3214-20.
208. Marshak, S., et al., *Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose.* Diabetes, 1999. **48**(6): p. 1230-6.
209. Matsuoka, T., et al., *Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells.* J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 144-50.
210. Shu, T., et al., *AGEs decrease insulin synthesis in pancreatic beta-cell by repressing Pdx-1 protein expression at the post-translational level.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18782.
211. McGarry, J.D. and R.L. Dobbins, *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion.* Diabetologia, 1999. **42**(2): p. 128-38.
212. Unger, R.H., *Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications.* Diabetes, 1995. **44**(8): p. 863-70.
213. Gremlich, S., et al., *Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels.* J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30261-9.
214. Kelpe, C.L., et al., *Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis.* J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30015-21.
215. Hagman, D.K., et al., *Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans.* J Biol Chem, 2005. **280**(37): p. 32413-8.
216. Hagman, D.K., et al., *Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets.* Diabetes, 2008. **57**(2): p. 424-31.
217. Carpentier, A., et al., *Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation.* Am J Physiol, 1999. **276**(6 Pt 1): p. E1055-66.
218. Carpentier, A., et al., *Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes.* Diabetes, 2000. **49**(3): p. 399-408.
219. Carpentier, A.C., et al., *Plasma nonesterified Fatty Acid intolerance and hyperglycemia are associated with intravenous lipid-induced impairment of insulin sensitivity and disposition index.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(3): p. 1256-64.
220. Leung, N., et al., *Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men.* Diabetologia, 2004. **47**(2): p. 204-13.

221. Haneda, M., et al., *Studies on mutant human insulin genes: identification and sequence analysis of a gene encoding [SerB24]insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(20): p. 6366-70.
222. Kwok, S.C., et al., *Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (insulin Chicago)*. Diabetes, 1983. **32**(9): p. 872-5.
223. Shoelson, S., et al., *Identification of a mutant human insulin predicted to contain a serine-for-phenylalanine substitution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(24): p. 7390-4.
224. Haneda, M., et al., *Familial hyperinsulinemia due to a structurally abnormal insulin. Definition of an emerging new clinical syndrome*. N Engl J Med, 1984. **310**(20): p. 1288-94.
225. Berridge, M.J., *The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle*. Cell Calcium, 2002. **32**(5-6): p. 235-49.
226. van Anken, E. and I. Braakman, *Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2005. **40**(4): p. 191-228.
227. Scheuner, D. and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes*. Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 317-33.
228. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, *The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. **29**(1): p. 42-61.
229. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
230. Harding, H.P., et al., *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 619-33.
231. Ma, Y., et al., *Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response*. J Mol Biol, 2002. **318**(5): p. 1351-65.
232. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
233. Calton, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
234. Haze, K., et al., *Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response*. Biochem J, 2001. **355**(Pt 1): p. 19-28.
235. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
236. Zhu, C., F.E. Johansen, and R. Prywes, *Interaction of ATF6 and serum response factor*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 4957-66.

237. Ye, J., et al., *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*. Mol Cell, 2000. **6**(6): p. 1355-64.
238. Yamamoto, K., et al., *Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1*. Dev Cell, 2007. **13**(3): p. 365-76.
239. Okada, T., et al., *Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 2): p. 585-94.
240. Yoshida, H., et al., *Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33741-9.
241. Wang, Y., et al., *Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27013-20.
242. Yoshida, H., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1239-48.
243. Thuerauf, D.J., et al., *Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22865-78.
244. Thuerauf, D.J., L. Morrison, and C.C. Glembotski, *Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21078-84.
245. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. Science, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
246. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats*. Genes Dev, 2002. **16**(11): p. 1345-55.
247. Scorrano, L., et al., *BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis*. Science, 2003. **300**(5616): p. 135-9.
248. Szegezdi, E., U. Fitzgerald, and A. Samali, *Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 186-94.
249. Hitomi, J., et al., *Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death*. J Cell Biol, 2004. **165**(3): p. 347-56.
250. Hoozemans, J.J., et al., *Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(3): p. 707-11.

251. Romero-Ramirez, L., et al., *XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth*. *Cancer Res*, 2004. **64**(17): p. 5943-7.
252. Jamora, C., G. Dennert, and A.S. Lee, *Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(15): p. 7690-4.
253. Ozcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. *Science*, 2004. **306**(5695): p. 457-61.
254. Hosoi, T., et al., *Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance*. *Mol Pharmacol*, 2008. **74**(6): p. 1610-9.
255. Yoshioka, M., et al., *A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice*. *Diabetes*, 1997. **46**(5): p. 887-94.
256. Wang, J., et al., *A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(1): p. 27-37.
257. Oyadomari, S., et al., *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(4): p. 525-32.
258. Delepine, M., et al., *EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome*. *Nat Genet*, 2000. **25**(4): p. 406-9.
259. Inoue, H., et al., *A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)*. *Nat Genet*, 1998. **20**(2): p. 143-8.
260. Minton, J.A., et al., *Association studies of genetic variation in the WFS1 gene and type 2 diabetes in U.K. populations*. *Diabetes*, 2002. **51**(4): p. 1287-90.
261. Sandhu, M.S., et al., *Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes*. *Nat Genet*, 2007. **39**(8): p. 951-3.
262. Thameem, F., et al., *Association of amino acid variants in the activating transcription factor 6 gene (ATF6) on 1q21-q23 with type 2 diabetes in Pima Indians*. *Diabetes*, 2006. **55**(3): p. 839-42.
263. Meex, S.J., et al., *Activating transcription factor 6 polymorphisms and haplotypes are associated with impaired glucose homeostasis and type 2 diabetes in Dutch Caucasians*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(7): p. 2720-5.
264. Stoy, J., et al., *Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(38): p. 15040-4.
265. Laybutt, D.R., et al., *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2007. **50**(4): p. 752-63.
266. Huang, C.J., et al., *High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell*



- apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes.* Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2016-27.
267. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
  268. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.* Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
  269. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
  270. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors.* Immunity, 2010. **32**(3): p. 305-15.
  271. O'Neill, L.A., K.A. Fitzgerald, and A.G. Bowie, *The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members.* Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 286-90.
  272. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 353-64.
  273. Shi, H., et al., *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance.* J Clin Invest, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
  274. Tsukumo, D.M., et al., *Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance.* Diabetes, 2007. **56**(8): p. 1986-98.
  275. Garay-Malpartida, H.M., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis.* BMC Immunol, 2011. **12**: p. 18.
  276. Kiely, A., et al., *Toll-like receptor agonist induced changes in clonal rat BRIN-BD11 beta-cell insulin secretion and signal transduction.* J Endocrinol, 2009. **202**(3): p. 365-73.
  277. Basith, S., et al., *Toll-like receptor modulators: a patent review (2006-2010).* Expert Opin Ther Pat, 2011. **21**(6): p. 927-44.
  278. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
  279. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
  280. Kim, H.M., et al., *Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran.* Cell, 2007. **130**(5): p. 906-17.
  281. Park, B.S., et al., *The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex.* Nature, 2009. **458**(7242): p. 1191-5.
  282. Akashi-Takamura, S. and K. Miyake, *TLR accessory molecules.* Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 420-5.
  283. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.* Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-50.

284. Yamamoto, M., et al., *Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ Bzeta*. *Nature*, 2004. **430**(6996): p. 218-22.
285. Litvak, V., et al., *Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(4): p. 437-43.
286. Gilchrist, M., et al., *Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 173-8.
287. Covert, M.W., et al., *Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation*. *Science*, 2005. **309**(5742): p. 1854-7.
288. Werner, S.L., D. Barken, and A. Hoffmann, *Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity*. *Science*, 2005. **309**(5742): p. 1857-61.
289. Seki, E. and D.A. Brenner, *Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update*. *Hepatology*, 2008. **48**(1): p. 322-35.
290. Williamson, R.T., *On the Treatment of Glycosuria and Diabetes Mellitus with Sodium Salicylate*. *Br Med J*, 1901. **1**(2100): p. 760-2.
291. Reid, J., A.I. Macdougall, and M.M. Andrews, *Aspirin and diabetes mellitus*. *Br Med J*, 1957. **2**(5053): p. 1071-4.
292. Baron, S.H., *Salicylates as hypoglycemic agents*. *Diabetes Care*, 1982. **5**(1): p. 64-71.
293. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. *Science*, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
294. Hotamisligil, G.S. and B.M. Spiegelman, *Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link*. *Diabetes*, 1994. **43**(11): p. 1271-8.
295. Hotamisligil, G.S., et al., *Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 4854-8.
296. Vozarova, B., et al., *High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51**(2): p. 455-61.
297. Pickup, J.C., et al., *NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X*. *Diabetologia*, 1997. **40**(11): p. 1286-92.
298. Spranger, J., et al., *Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study*. *Diabetes*, 2003. **52**(3): p. 812-7.
299. Duncan, B.B., et al., *Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study*. *Diabetes*, 2003. **52**(7): p. 1799-805.
300. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1796-808.

301. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
302. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
303. Olefsky, J.M. and C.K. Glass, *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.
304. Odegaard, J.I., et al., *Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance*. Cell Metab, 2008. **7**(6): p. 496-507.
305. Varma, V., et al., *Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(6): p. E1300-10.
306. Ehres, J.A., et al., *Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2356-70.
307. Homo-Delarche, F., et al., *Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1625-33.
308. Ehres, J.A., et al., *Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 340-2.
309. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
310. Lawrence, M.C., et al., *Multiple chromatin-bound protein kinases assemble factors that regulate insulin gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22181-6.
311. Schroder, K., R. Zhou, and J. Tschopp, *The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?* Science, 2010. **327**(5963): p. 296-300.
312. Zhou, R., et al., *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 136-40.
313. Larsen, C.M., et al., *Sustained effects of interleukin-1 receptor antagonist treatment in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1663-8.
314. Larsen, C.M., et al., *Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus*. N Engl J Med, 2007. **356**(15): p. 1517-26.
315. Hwang, D., *Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways*. FASEB J, 2001. **15**(14): p. 2556-64.
316. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
317. Lee, J.Y., et al., *Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by*

- saturated and polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37041-51.
318. Suganami, T., et al., *Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(1): p. 45-9.
319. Suganami, T., et al., *Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(1): p. 84-91.
320. Davis, J.E., et al., *Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(6): p. 1248-55.
321. Poggi, M., et al., *C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet*. Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1267-76.
322. Erridge, C. and N.J. Samani, *Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1944-9.
323. Bjornekleit, A., et al., *Intestinal and gastric bypass. Changes in intestinal microecology after surgical treatment of morbid obesity in man*. Scand J Gastroenterol, 1981. **16**(5): p. 681-7.
324. Nishizawa, Y., et al., *Relationship of fat deposition and intestinal microflora in VMH rats*. Int J Obes, 1988. **12**(2): p. 103-10.
325. Savage, D.C., *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Annu Rev Microbiol, 1977. **31**: p. 107-33.
326. Neish, A.S., *Microbes in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 65-80.
327. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
328. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
329. Turnbaugh, P.J., et al., *The human microbiome project*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 804-10.
330. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
331. Amar, J., et al., *Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1219-23.
332. Wu, X., et al., *Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes*. Curr Microbiol, 2010. **61**(1): p. 69-78.
333. Larsen, N., et al., *Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9085.
334. Black, D.D., et al., *Intestinal lipoproteins in the rat with D-(+)-galactosamine hepatitis*. J Lipid Res, 1983. **24**(8): p. 977-92.

335. Vreugdenhil, A.C., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1399-405.
336. Ghoshal, S., et al., *Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 90-7.
337. Laugerette, F., et al., *Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(1): p. 53-9.
338. Erridge, C., et al., *A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1286-92.
339. Mitaka, C., *Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome*. Clin Chim Acta, 2005. **351**(1-2): p. 17-29.
340. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.
341. Anderson, P.D., et al., *Innate immunity modulates adipokines in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(6): p. 2272-9.
342. Mehta, N.N., et al., *Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 172-81.
343. Lassenius, M.I., et al., *Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation*. Diabetes Care, 2011. **34**(8): p. 1809-15.
344. Pussinen, P.J., et al., *Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes*. Diabetes Care, 2011. **34**(2): p. 392-7.
345. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 415-45.
346. Seo, H.Y., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 3832-41.
347. Lipson, K.L., et al., *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 245-54.
348. Lipson, K.L., R. Ghosh, and F. Urano, *The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1648.
349. Pirot, P., et al., *Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs*. Diabetologia, 2007. **50**(5): p. 1006-14.
350. Allagnat, F., et al., *Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis*. Diabetologia, 2010. **53**(6): p. 1120-30.

351. Pino, M.F., et al., *Elevated glucose attenuates human insulin gene promoter activity in INS-1 pancreatic beta-cells via reduced nuclear factor binding to the A5/core and Z element*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(5): p. 1343-60.
352. Vives-Pi, M., et al., *Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 208-18.
353. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 99-111.
354. Yoshida, H., et al., *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
355. Bandyopadhyay, S., et al., *A human MAP kinase interactome*. Nat Methods, 2010. **7**(10): p. 801-5.
356. Seo, H.Y., et al., *Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases cAMP-stimulated hepatic gluconeogenesis via inhibition of CREB*. Endocrinology, 2010. **151**(2): p. 561-8.
357. Beima, K.M., et al., *T-bet binding to newly identified target gene promoters is cell type-independent but results in variable context-dependent functional effects*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11992-2000.
358. Li, Q. and S.A. Johnston, *Are all DNA binding and transcription regulation by an activator physiologically relevant?* Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2467-74.
359. Martone, R., et al., *Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12247-52.
360. Schulthess, F.T., et al., *CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling*. Cell Metab, 2009. **9**(2): p. 125-39.
361. Chang, I., et al., *Nuclear factor kappaB protects pancreatic beta-cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1169-75.
362. Heimberg, H., et al., *Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis*. Diabetes, 2001. **50**(10): p. 2219-24.
363. Norlin, S., U. Ahlgren, and H. Edlund, *Nuclear factor-kappaB activity in beta-cells is required for glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 125-32.
364. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
365. Cha-Molstad, H., et al., *The interaction of C-Rel with C/EBPbeta enhances C/EBPbeta binding to the C-reactive protein gene promoter*. Mol Immunol, 2007. **44**(11): p. 2933-42.

366. Zwergal, A., et al., *C/EBP beta blocks p65 phosphorylation and thereby NF-kappa B-mediated transcription in TNF-tolerant cells*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 665-72.
367. He, B. and G.F. Weber, *Synergistic activation of the CMV promoter by NF-kappaB P50 and PKG*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(1): p. 13-20.
368. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33419-25.
369. Kirschning, C.J., et al., *Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2091-7.
370. Yang, R.B., et al., *Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 284-8.
371. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
372. Amyot, J., et al., *Binding of activating transcription factor 6 to the A5/Core of the rat insulin II gene promoter does not mediate its transcriptional repression*. J Mol Endocrinol, 2011. **47**(3): p. 273-283.
373. Melloul, D., S. Marshak, and E. Cerasi, *Regulation of insulin gene transcription*. Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 309-26.
374. Nolan, C.J., P. Damm, and M. Prentki, *Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management*. Lancet, 2011. **378**(9786): p. 169-81.
375. Fonseca, S.G., J. Gromada, and F. Urano, *Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(7): p. 266-74.
376. Eizirik, D.L. and M. Cnop, *ER stress in pancreatic beta cells: the thin red line between adaptation and failure*. Sci Signal, 2010. **3**(110): p. pe7.
377. Harding, H.P., et al., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1153-63.
378. Harding, H.P., et al., *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 897-904.
379. Zinszner, H., et al., *CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum*. Genes Dev, 1998. **12**(7): p. 982-95.
380. Scheuner, D., et al., *Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 757-64.
381. Zhang, W., et al., *PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis*. Cell Metab, 2006. **4**(6): p. 491-7.

382. Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, *A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells.* Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1812-24.
383. Lee, A.H., et al., *Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(21): p. 8885-90.
384. Wu, J., et al., *ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress.* Dev Cell, 2007. **13**(3): p. 351-64.
385. Park, K.G., et al., *Glucotoxicity in the INS-1 rat insulinoma cell line is mediated by the orphan nuclear receptor small heterodimer partner.* Diabetes, 2007. **56**(2): p. 431-7.
386. Nozaki, J., et al., *The endoplasmic reticulum stress response is stimulated through the continuous activation of transcription factors ATF6 and XBP1 in Ins2+/Akita pancreatic beta cells.* Genes Cells, 2004. **9**(3): p. 261-70.
387. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance.* Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
388. Eldor, R., et al., *The Tol-beta transgenic mouse: a model to study the specific role of NF-kappaB in beta-cells.* Diabetes Res Clin Pract, 2009. **86 Suppl 1**: p. S7-14.
389. Eldor, R., et al., *Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 5072-7.
390. Welch, W.J., *Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 31-8.
391. Thomas, P.J., B.H. Qu, and P.L. Pedersen, *Defective protein folding as a basis of human disease.* Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 456-9.
392. Engin, F. and G.S. Hotamisligil, *Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases.* Diabetes Obes Metab, 2010. **12 Suppl 2**: p. 108-15.
393. Ozcan, U., et al., *Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes.* Science, 2006. **313**(5790): p. 1137-40.
394. Zoetendal, E.G., A.D. Akkermans, and W.M. De Vos, *Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria.* Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(10): p. 3854-9.
395. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.



396. Membrez, M., et al., *Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice*. FASEB J, 2008. **22**(7): p. 2416-26.
397. Cani, P.D., et al., *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia*. Diabetologia, 2007. **50**(11): p. 2374-83.
398. Yuan, M., et al., *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta*. Science, 2001. **293**(5535): p. 1673-7.
399. Kim, J.K., et al., *Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 437-46.
400. Park, E., et al., *Salicylate prevents hepatic insulin resistance caused by short-term elevation of free fatty acids in vivo*. J Endocrinol, 2007. **195**(2): p. 323-31.
401. Friberg, J., et al., *Inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway prevents beta cell failure and diet induced diabetes in Psammomys obesus*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13341.
402. Tsunekawa, S., et al., *Protection of pancreatic beta-cells by exendin-4 may involve the reduction of endoplasmic reticulum stress; in vivo and in vitro studies*. J Endocrinol, 2007. **193**(1): p. 65-74.
403. Yusta, B., et al., *GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress*. Cell Metab, 2006. **4**(5): p. 391-406.
404. Cnop, M., et al., *Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic beta-cell dysfunction*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12 Suppl 2**: p. 76-82.
405. Cani, P.D., et al., *Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats*. Br J Nutr, 2007. **98**(1): p. 32-7.
406. Cani, P.D., et al., *Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(5): p. 1236-43.
407. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability*. Gut, 2009. **58**(8): p. 1091-103.
408. Cani, P.D., et al., *Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor*. Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1484-90.
409. Zhou, J., et al., *Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(5): p. E1160-6.
410. Amar, J., et al., *Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept*. Diabetologia, 2011.

411. Marshall, J.C., et al., *Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence*. Crit Care, 2002. **6**(4): p. 342-8.

# Annexe I

## Article 3

**Titre:** Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell.

**Auteurs:** Vincent Poitout, Julie Amyot, Meriem Semache, Bader Zarrouki, Derek K. Hagman et Ghislaine Fontés.

**Article publié dans:** Biochimica et Biophysica Acta

**Contribution des auteurs:**

**Vincent Poitout:** Investigateur principal. A rédigé l'ensemble de ce manuscrit.

**Julie Amyot:** Coauteure ayant participé à l'élaboration des hypothèses; participation à l'interprétation des résultats.

**Meriem Semache:** Coauteure ayant participé à l'élaboration des hypothèses; participation à l'interprétation des résultats.

**Bader Zarrouki:** Coauteur ayant participé à l'élaboration des hypothèses; participation à l'interprétation des résultats.

**Derek K. Hagman:** Coauteur ayant participé à l'élaboration des hypothèses; participation à l'interprétation des résultats.

**Ghislaine Fontés:** Coauteure ayant participé à l'élaboration des hypothèses; participation à l'interprétation des résultats.

### **Mise en contexte de l'article 3**

Le DT2 est dû à une insuffisance de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques et à une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Après l'apparition de la maladie, la sécrétion d'insuline continue à se dégrader au cours du temps, et il a été proposé que les anomalies métaboliques associées au diabète contribuent à cette dégradation [62]. En particulier, les concepts de glucotoxicité et de lipotoxicité réfèrent aux effets nocifs qu'entraîne l'exposition chronique des cellules bêta du pancréas au glucose et aux acides gras non estérifiés présents en concentrations élevées dans la circulation sanguine des patients diabétiques de type 2. La glucolipotoxicité réfère aux effets toxiques et combinés du glucose et des acides gras. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets délétères de la glucolipotoxicité sur la fonction de la cellule  $\beta$ -pancréatique sont partiellement connus et sont abordés dans cet article de revue.

## **Glucolipotoxicity of the Pancreatic Beta Cell**

Vincent Poitout<sup>a,b</sup>, Julie Amyot<sup>b</sup>, Meriem Semache<sup>b</sup>, Bader Zarrouki<sup>a</sup>, Derek Hagman<sup>a</sup> and

Ghislaine Fontés<sup>a</sup>

Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, and Departments of Medicine<sup>a</sup> and Biochemistry<sup>b</sup>, University of Montreal, Montreal, QC, Canada.

Corresponding author: Vincent Poitout, DVM, PhD

CRCHUM, Technopole Angus

2901 Rachel Est

Montreal, QC, H1W 4A4, Canada

Tel: +1 514 890-8000 ext. 23603

Fax: +1 514 412-7648

Keywords: Fatty acids, Glucose, Islet of Langerhans, Diabetes, Insulin

## Summary

The concept of glucolipotoxicity refers to the combined, deleterious effects of elevated glucose and fatty acid levels on pancreatic beta-cell function and survival. Significant progress has been made in recent years towards a better understanding of the cellular and molecular basis of glucolipotoxicity in the beta cell. The permissive effect of elevated glucose on the detrimental actions of fatty acids stems from the influence of glucose on intracellular fatty-acid metabolism, promoting the synthesis of cellular lipids. The combination of excessive levels of fatty acids and glucose therefore leads to decreased insulin secretion, impaired insulin gene expression, and beta-cell death by apoptosis, all of which probably have distinct underlying mechanisms. Recent studies from our laboratory have identified several pathways implicated in fatty-acid inhibition of insulin gene expression, including the extracellular-regulated kinase (ERK1/2) pathway; the metabolic sensor Per-Arnt-Sim kinase (PASK); and the ATF6 branch of the unfolded protein response. We have also confirmed in vivo in rats that the decrease in insulin gene expression is an early defect which precedes any detectable abnormality in insulin secretion. While the role of glucolipotoxicity in humans is still debated, the inhibitory effects of chronically elevated fatty acid levels has been clearly demonstrated in several studies, at least in individuals genetically predisposed to developing type 2 diabetes. It is therefore likely that glucolipotoxicity contributes to beta-cell failure in type 2 diabetes as well as to the decline in beta-cell function observed after the onset of the disease.

## I. Introduction

Over the last 20 years, the central role of pancreatic beta-cell dysfunction in the development of type 2 diabetes has become increasingly appreciated [1]. It is now generally accepted that when insulin resistance develops in response to environmental cues such as obesity, a subset of genetically predisposed individuals fails to adequately compensate for the increased insulin demand, and beta-cell failure ensues [2]. In addition, longitudinal studies in humans have clearly demonstrated that beta-cell function deteriorates during the years following diagnosis of type 2 diabetes, regardless of the therapeutic regimen [3, 4]. Although the cause of this metabolic deterioration is unknown, several hypotheses have been proposed. Amongst them, chronic hyperglycemia (glucotoxicity [5]), chronic dislipidemia (lipotoxicity [6]), or the combination of both (glucolipotoxicity [7]), have been postulated to contribute to the worsening of beta-cell function over time, creating a vicious cycle by which metabolic abnormalities impair insulin secretion, which further aggravates metabolic perturbations, and so on. While elevated levels of glucose or fatty acids can, by themselves, be demonstrated to have detrimental effects on beta-cell function in many experimental systems, the combination of both nutrients is synergistically harmful, which has led to the concept of glucolipotoxicity [7, 8]. However, despite years of investigation and significant progress made in the discovery of the underlying molecular and cellular mechanisms of glucolipotoxicity, its contribution to beta-cell failure in type 2 diabetes remains debated. We speculate that this uncertainty stems from several reasons. First, by nature of their long-term design, experiments to test cause-and-effect relationships between chronic metabolic perturbations and functional outcomes are plagued with confounding variables, and therefore difficult to interpret. Second, the inherent limitations of in vivo models have prompted the development of many in vitro systems to test the hypothesis and define its underlying mechanisms. As further discussed in this review, these systems also have important caveats. Third and perhaps most importantly, there is no clear consensus on the definition of the term glucolipotoxicity. While its root (toxicity) implies the presence of cell death, it is often employed more loosely to refer to the functional effects of the combination of high glucose and elevated lipids on the beta cell, for instance on insulin

secretion or gene expression. Also, while the concept of glucolipotoxicity implicitly refers to a chronic situation, the notion of chronicity is variable, spanning from a few hours of ex vivo cell culture to many years in diabetic patients. This is particularly problematic since fatty acids have a dual and time-dependent effect on beta-cell function, acutely stimulatory but chronically inhibitory. Thus, there are virtually as many definitions of the term glucolipotoxicity as groups studying it, which has created confusion in the field. For the purpose of this article, we propose to define glucolipotoxicity as the combined, deleterious effects of elevated glucose and fatty acid levels on pancreatic beta-cell function and / or survival. This review focuses on recent developments in the field of glucolipotoxicity from both in vitro and in vivo studies.

## **II. Cellular and molecular mechanisms of glucolipotoxicity in the beta cell**

Considering the complexity of designing mechanistic studies in vivo to investigate the chronic effects of fuel oversupply, a number of in vitro models, using insulin-secreting cells and isolated islets, have been employed to identify the cellular and molecular basis of glucolipotoxicity. In these systems, prolonged exposure to elevated levels of fatty acids is associated with inhibition of glucose-induced insulin secretion [9-12], impairment of insulin gene expression [13-18], and induction of cell death by apoptosis [19-28]. Importantly, several of these studies have provided evidence that lipotoxicity only occurs in the presence of concomitantly elevated glucose levels [15, 16, 28], an observation also confirmed in vivo [29, 30]. The biochemical basis for this permissive effect of glucose will be discussed first in this section, followed by a review of the mechanisms underlying the functional manifestations of glucolipotoxicity on the beta cell (insulin secretion, insulin gene expression, and cell survival).

### **A. Biochemical pathways and lipid intermediates implicated in glucolipotoxicity**



The permissive effect of glucose on the deleterious actions of chronic fatty acids stems from its influence on intracellular metabolism of fatty acids [31, 32]. Prentki and Corkey [7] first proposed that glucose determines fatty acid partitioning in pancreatic beta cells (Figure 1). At low glucose concentrations, fatty acids are transported into the mitochondria via the enzyme carnitine-palmitoyl transferase-1 (CPT-1) for beta-oxidation, which has essentially no functional consequences. In contrast, when both glucose and fatty acid concentrations are elevated, intracellular metabolism of glucose leads to the formation of cataplerotic signals, such as citrate, and the generation of malonyl-CoA in the cytosol. Since fatty-acid synthase activity is lower than that of acetyl-CoA carboxylase in the beta cell [33], the predominant effect of malonyl-CoA is to inhibit CPT-1 activity, which in turn blocks fatty acid oxidation and leads to accumulation of long-chain acyl-CoA esters (LC-CoA) in the cytosol [7]. Accumulation of cytosolic LC-CoA, either directly or via generation of lipid-derived signals, adversely affects beta-cell function [8]. In addition to its metabolic effects directing fatty-acid partitioning into esterification, glucose coordinately activates the expression of genes involved in lipogenesis [34]. A key player in this mechanism is the enzyme AMP-activated protein kinase (AMPK), acting as a metabolic sensor that directs the beta cell into a “storage mode” in the face of nutrient oversupply [35], as it does in myocytes and hepatocytes [36]. Indeed, AMPK activity is inversely correlated with the glucose concentration [37] and is stimulated by palmitate [38] in beta cells. Downstream of AMPK, the transcription factor sterol-regulatory-element-binding-protein-1c (SREBP1c), which regulates the expression of genes controlling fatty acid synthesis [39], translates the metabolic signal sensed by AMPK into changes in gene expression, leading to enhanced lipogenesis. Glucose also increases the expression of liver X receptor (LXR) which then contributes to enhancing SREBP1c expression and lipid synthesis [40].

While it is now generally accepted that fatty acid partitioning towards esterification and cellular lipid synthesis underpins the cellular mechanisms of glucolipotoxicity in pancreatic beta-cells, the nature of the lipid-derived metabolites directly responsible for the deleterious effects of fatty acids is still elusive. It is unlikely that triglyceride accumulation

itself might be the culprit, since triglycerides represent a relatively innocuous form of fat storage that can actually protect against lipotoxicity [41]. Studies have shown that monounsaturated fatty acids are less toxic and can actually protect from the detrimental effects of unsaturated fatty acids because they are more readily esterified into triglycerides [26, 41]. Consistent with this notion is the observation that stearoyl CoA desaturase-1 (SCD1) protects from lipoapoptotic cell death induced by palmitate [42]. In fact, whereas deletion of SCD1 in mice improves insulin sensitivity [43], when introduced on the obese, leptin-deficient *ob/ob* background the SCD1 deletion leads to a worsening of diabetes associated with triglyceride and cholesterol overload in islets [44].

Prentki and colleagues [45, 46] have proposed the elegant concept that increased glycerolipid / fatty acid cycling represents a mean by which the beta cell attempts to protect itself from nutrient oversupply while remaining fuel-responsive so as to be capable of releasing insulin in the face of increased demand. In turn, the unintended consequence of this fuel detoxification mechanism is the generation of harmful intermediates from increased flux through the cycle. The question remains that if triglyceride accumulation is merely a marker of enhanced esterification flux but does not cause glucolipotoxicity by itself, then what are the lipid-derived molecules directly responsible for the impairment of beta-cell function? The role of intermediates of the esterification pathway (e.g. lysophosphatidic acid, phosphatidic acid, diacylglycerols) has been suggested [2] but, to our knowledge, not formally demonstrated. De novo synthesis of ceramide has been shown to play a role both in fatty acid-induced beta-cell death [47] and fatty acid-inhibition of insulin gene expression [17], but not in the impairment of insulin secretion [48]. These observations illustrate an important point, which may in part explain why the lipid-derived intermediates mediating glucolipotoxicity have remained elusive: the mechanisms underlying the various functional manifestations of glucolipotoxicity are likely distinct. For example, accumulation of ceramide impairs insulin gene expression and, under certain circumstances, induces cell death, without affecting insulin secretion. Therefore, our view is that the full array of functional defects associated with glucolipotoxic conditions is due to

the generation of several intracellular metabolites acting on various signaling pathways and cellular functions rather than to a single intermediate.

While most studies investigating the mechanisms of glucolipotoxicity in the beta cell have focused on the esterification pathway and triglyceride synthesis, cholesterol metabolism has recently been shown to also play an important role. Exposure of beta cells to oxidized low-density lipoproteins (LDL) induces apoptosis [49] and decreases insulin gene expression [50], whereas native LDL particles have no effect and high-density lipoproteins (HDL) are protective. Beta-cell specific knock-out (KO) of the ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1 (ABCA1), which mediates reverse cholesterol efflux, results in increase cellular cholesterol content and impaired insulin secretion downstream of glucose metabolism, probably at the level of insulin exocytosis [51]. In addition, the ability of the thiazolidinedione rosiglitazone to improve glucose tolerance in high-fat diet fed mice requires a functional ABCA1 in beta cells [51]. Finally, forcing cholesterol synthesis in beta cells by transgenic overexpression of SREBP2 under the rat insulin promoter results in a severe loss of beta-cell mass and a diabetic phenotype [52]. Since LXR regulates ABCA1 expression [51] and is itself directly regulated by glucose [53], glucose therefore coordinately increases fatty acid esterification and intracellular cholesterol synthesis.

The premise to the hypotheses described above that intermediates generated during triglyceride or cholesterol synthesis are mechanistically involved in glucolipotoxicity is that extracellular fatty acids are first transported across the plasma membrane and act intracellularly. This concept has been challenged by the deorphanization of the G-protein coupled receptor GPR40 [54, 55]. GPR40 is specifically expressed in pancreatic beta cells and is activated by long-chain fatty acids, which raises the possibility that some of the functional effects of fatty acids on the beta-cell might be mediated by activation of a cell-surface receptor. Consistent with this possibility, a role for GPR40 in mediating fatty acid-inhibition of insulin secretion has been suggested by the observation that islets from GPR40 KO mice are insensitive to the inhibitory effects of prolonged fatty acids [56]. Using a

different line of GPR40 KO mice, we were unable to reproduce these findings and found that deletion of the receptor does not protect islets from fatty acid-inhibition of glucose-induced insulin secretion [57]. In addition, subsequent studies also using whole-body KO found that GPR40 deletion did not protect mice from high-fat diet-induced glucose intolerance [58, 59]. This conclusion was further supported by the observation that small molecule GPR40 agonists improved glucose tolerance in mice with high-fat diet-induced obesity [60]. Therefore, we do not favor the view that GPR40 plays a major role in the mechanisms of glucolipotoxicity in the beta cell.

## B. Mechanisms underlying the functional manifestations of glucolipotoxicity

### *1. Fatty-acid impairment of insulin secretion*

Prolonged exposure of beta cells to fatty acids *in vitro* inhibits glucose-stimulated insulin secretion [9-12], a phenomenon also observed *in vivo* in rats [61] and humans [62]. In recent years, several potential mechanisms have been investigated, including upregulation of uncoupling protein 2 (UCP2), activation of the novel isoform of protein kinase C PKC $\epsilon$ , and late exocytotic events.

UCP2 is a ubiquitously expressed mitochondrial carrier which has been suggested to uncouple the respiratory chain from ATP synthesis [63], although its biological functions are still unclear [64]. Initial evidence suggested that UCP2 might modulate insulin secretion and thereby play a role in glucolipotoxicity. This was based on the observations that increasing UCP2 expression in beta cells impairs insulin secretion [65, 66] and that UCP2 KO animals on a mixed genetic background have increased circulating insulin levels and are protected from diabetes [63, 67]. This contention has been recently challenged by the observation that KO of UCP2 on 3 different congenic backgrounds in the mouse leads to oxidative stress and impaired insulin secretion [68]. Thus, the increase in UCP2 expression observed in islets after high-fat feeding in rodents [30, 66] or exposure to fatty acids *in vitro* [69, 70] likely represents a cellular defense mechanism against fuel overload and

oxidative stress rather than a deleterious response. Consistent with this possibility is the observation that transgenic overexpression of UCP2 does not alter mitochondrial function or glucose-induced insulin secretion but decreases reactive oxygen species production [71]. Overall, it appears unlikely that an increase in UCP2 expression in response to fatty acids represents a causal mechanism of the impairment of insulin secretion under glucolipotoxic conditions.

Activation of the lipid-regulated isoform PKC $\epsilon$  has also been suggested as a possible candidate signaling molecule underlying the decrease in insulin secretion in glucolipotoxicity. Work by the group of Biden has shown that the normalization of glucose tolerance in PKC $\epsilon$  KO mice under high-fat feeding was due to improved insulin secretion [72]. Further, they demonstrated that islets isolated from PKC $\epsilon$  knock-out mice were protected from the deleterious effects of fatty acids on insulin secretion in vitro, and that inhibition of PKC $\epsilon$  was capable of restoring insulin secretion in islets from *db/db* mice [72]. More recently, this group has shown that the improvement in insulin secretion in PKC $\epsilon$  knock-out islets in the face of glucolipotoxicity was due to selective restoration of the amplifying pathway of insulin release, probably due to the generation of a lipolytic intermediate [73]. Interestingly, this is consistent with the concept proposed by Prentki and colleagues that lipolysis-generated signals contribute to the regulation of insulin secretion [74] and that, more generally, glycerolipid/fatty acid cycling in the beta cell provides essential coupling factors for insulin secretion but becomes detrimental under conditions of fuel oversupply [45, 46].

Finally, evidence suggests that fatty acids might alter one or more late steps of insulin exocytosis in beta cells. Kato et al. [75] have shown that expression of granuphilin, an effector of the small GTP-binding protein Rab27a, which plays a key role in the docking of insulin secretory granules to the plasma membrane, is increased in islets exposed to palmitate as a consequence of upregulation of SREBP1c. This in turn inhibits insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli. In addition, Olofsson et al [76] demonstrated that prolonged exposure of mouse islets to glucose and fatty acids inhibited

insulin secretion at a very late stage of exocytosis by interfering with the release of insulin at the fusion pore. These findings suggest that the mechanisms by which fatty acids affect insulin secretion might, at least in part, lie at the level of the exocytotic machinery and, consequently, impair insulin secretion in response not only to glucose but also to other secretagogues.

## *2. Fatty-acid impairment of insulin gene expression*

We [15-18, 77] and others [13, 14] have shown that prolonged exposure to fatty acids impairs insulin gene expression in the presence of high glucose. The mechanisms whereby fatty acids affect insulin gene expression are distinct from those by which they impair insulin secretion. First, whereas both palmitate and oleate inhibit insulin secretion, only palmitate affects insulin gene expression [48]. This is due to the fact that only palmitate can serve as a substrate for de novo ceramide synthesis [17]. The transcriptional mechanisms by which palmitate inhibits insulin gene expression do not involve changes in insulin mRNA stability but, rather, inhibition of glucose-induced insulin promoter activity [17]. This is associated with decreased binding activity of the transcription factors pancreas-duodenum homeobox 1 (PDX-1) and MafA [18]. PDX-1 is affected in its ability to translocate to the nucleus, whereas MafA is affected at the level of its expression [18]. This is in contrast to the mechanisms of glucotoxicity, which involve post-translational modifications of MafA [78].

The mechanisms whereby ceramide generation from palmitate impairs PDX-1 subcellular localization and MafA expression are unknown, although recent studies have identified potential candidates. The c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase JNK is a known target of ceramide [79] and can repress insulin gene transcription both via c-jun-dependent inhibition of E1-mediated transcription [80, 81] and c-jun independent inhibition of PDX-1 binding [82]. In addition, Solinas et al. [83] have shown that palmitate activates JNK in beta cells and that the resulting phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 at sites that impair insulin signaling decreases insulin gene transcription.

Recent studies in our laboratory have also attempted to identify the signaling mechanisms implicated in palmitate inhibition of insulin gene expression. First, we have shown that palmitate enhances glucose-induced phosphorylation of the extracellular-regulated kinases (ERK) 1/2, and that pharmacological inhibition of ERK1/2 partially restores insulin gene expression in insulin-secreting cells and isolated islets exposed to palmitate or ceramide [84]. Second, we have observed that palmitate blocks the induction of the Per-Arnt-Sim kinase (PASK) [84]. PASK is an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase, containing a PAS domain sensitive to the intracellular environment which regulates the kinase domain to transduce the signal [85]. In budding yeast, it coordinates sugar storage and protein synthesis with carbohydrate availability [86]. In mammals, it has been demonstrated to be an important regulator of glycogen synthase and cellular energy balance [87]. In pancreatic beta cells, PASK is required for glucose-induced insulin gene transcription [88]. In our recent study [84], we observed that overexpression of PASK prevents the inhibitory effect of palmitate on insulin mRNA and PDX-1 mRNA and protein expression in MIN6 cells. In addition, adenoviral-mediated overexpression of wild-type PASK increased, whereas a kinase dead mutant of PASK acting as a dominant negative decreased, insulin mRNA and PDX-1 protein expression in islets. Interestingly, the PASK pathway appears to be independent from the ERK1/2 pathway and to have no effect on MafA expression in our system, suggesting that at least 3 independent signalling arms contribute to the overall decrease in insulin gene expression [84] (Figure 2). Although our initial study revealed that palmitate mostly affects PDX-1 in its subcellular localization rather than its whole-cell expression levels [18], overexpression of a kinase dead mutant of PASK also reduces PDX-1 mRNA levels. This suggests that reduction of PDX-1 expression might also contribute to decreasing its binding activity under glucolipotoxic conditions. Whether PASK can directly phosphorylate PDX-1 and, thereby, alter its nuclear translocation is unknown and currently under investigation. Recently, expression the CAAT enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ), a negative regulator of insulin gene transcription [89] has been shown to increase in beta cells in response to fatty acids [90]. Interestingly, we also observed a marked increase in C/EBP $\beta$  mRNA levels upon overexpression of the dominant-negative PASK mutant in MIN6 cells [84]. This

raises the possibility that, as demonstrated under glucotoxic conditions [91], C/EBP- $\beta$  binds to the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT) on the insulin promoter and thereby inhibits MafA binding activity.

A role for the unfolded protein response (UPR) and endoplasmic reticulum (ER) stress in beta-cell failure has received considerable attention in the past few years, in part because the beta cell's intense secretory activity makes it particularly susceptible to perturbations of ER homeostasis [92]. As discussed in more details in the next section, markers of ER stress have been shown to be induced by prolonged exposure to fatty acids in several studies [93-101]. In most cases, the strong induction of ER stress markers in response to fatty acids is associated with apoptosis. Under our culture conditions of isolated rat islets in the presence of glucose and palmitate, which are not associated with significant cell death [84, 102], we have not been able to detect any activation of the inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase (IRE) or protein kinase R-like ER kinase (PERK) branches of the UPR (unpublished data). In contrast, we have observed cleavage of the transcription factor ATF6 under these conditions. Since ATF6 is a negative regulator of insulin gene transcription [103], these preliminary results led us to hypothesize that an early activation of the ATF6 branch of the unfolded protein response upon exposure to fatty acids might represent a protective mechanism whereby the beta cell attempts to further decrease the load to the ER by inhibiting insulin gene expression. This would occur as part of the unfolded protein response, before overt ER stress and associated apoptosis develops. In later stages of more severe ER stress associated with cell death, it is possible that alterations in PDX-1 function [96, 104] or insulin mRNA stability [105] also contribute to the decrease in insulin gene expression.

Overall, available data regarding the mechanisms of fatty-acid inhibition of the insulin gene reveal a complex picture which appears to involve several independent pathways that all concur to decrease its expression, which is an early, and possibly protective, response of the beta cell in the face of nutrient oversupply (Figure 2).



Importantly, the decrease in insulin gene expression under glucolipotoxic conditions is also observed in vivo ([77]; see section III below).

### 3. *Fatty acid induction of beta-cell death*

Saturated fatty acids can induce beta-cell death by apoptosis in the presence of high glucose [22, 26, 28], whereas unsaturated fatty acids are usually protective [21, 22, 28]. As mentioned above, this difference is likely due to the greater ability of unsaturated fatty acids to form intracellular triglycerides [21, 41, 42]. Several mechanisms have been implicated, including ceramide formation [20, 23, 26, 47], oxidative stress [25, 27, 106, 107], and inflammation [108]. Recently, as mentioned above considerable evidence has been provided in support of a role for the UPR and ER stress in saturated fatty-acid induced cell death ([93-101] and reviewed in [59]). The mechanisms by which saturated fatty acids such as palmitate induce ER stress are thought to involve depletion of ER calcium stores [99, 101] and result in the activation of JNK [99, 100], although JNK activation can, under some conditions, be detected prior to the appearance of ER stress [98]. Interestingly, palmitate was shown to induce a rapid degradation of carboxypeptidase E, which resulted not only in altered proinsulin maturation, but also in ER stress and apoptosis [109]. The changes in CPE levels were demonstrated to occur prior to the development of any sign of ER stress, and to require palmitate metabolism and calcium influx, although the precise mechanisms by which palmitate initiates CPE degradation remain to be clarified [109]. Of note, however, a study by Lai et al. [110] using insulin-secreting cells and isolated islets provided evidence that palmitate-induced apoptosis can also occur in the absence of detectable ER stress. Finally, markers of ER stress are increased in pancreatic sections of type 2 diabetic patients [111].

These observations raise the question as to whether fatty-acid induced apoptosis in beta cells is primarily mediated by ER stress or the mitochondrial death pathway. Intrinsic defects in mitochondrial function have been well documented under conditions of nutrient overload [112], and perturbations in mitochondrial permeability are observed early in the development of fatty-acid induced cell death in beta cells [113]. Luciani et al. [114] have

recently shown that depletion of ER calcium stores under conditions of ER stress can lead secondarily to mitochondrial dysfunction, suggesting that perhaps under glucolipotoxic conditions ER stress is a primary event which leads to triggering of several proapoptotic pathways, including mitochondrial-mediated cell death.

Finally, a recent study by Lovis et al. [115] has shown that increased expression of the microRNAs miR34a and miR146 also contributes directly to palmitate-induced cell death in insulin-secreting cells and isolated islets, and the overall role of microRNAs in glucolipotoxicity will hopefully become clearer as progress towards understanding their implications in beta-cell function continues to be made.

### C. Limitations of in vitro studies of glucolipotoxicity

While in vitro models using insulin-secreting cells and isolated islets have proven extremely valuable in dissecting the cellular and molecular mechanisms of glucolipotoxicity, they also have significant limitations which should be borne in mind when interpreting the results obtained in these systems. First, there appears to be species-related differences in the sensitivity to fatty acid-induced cell death [110]. For instance, whereas a 24-h exposure of human islets to elevated glucose and palmitate is sufficient to observe apoptosis [28], we have not detected any cell death in rat islets after 72h of culture under similar conditions [17, 48, 84]. Second, the concentrations of fatty acids used in vitro vary amongst publications. The key determinant of fatty acid potency is the fraction that is unbound to BSA, which depends on the molar ratio of fatty acids to albumin as well as the mode of preparation. Using a fluorescent probe that specifically measures the unbound fraction of fatty acids [116], we observed that when palmitate at a total concentration of 0.5 mM was pre-complexed to bovine serum albumin with a molar ratio of fatty acid:albumin of 5:1, the unbound concentration is in the range of 200 nM (Figure 3), which represents approximately 3 times the unbound concentration measured in the plasma of lean individuals by the same method [117]. Finally, the concentrations of fatty acids in the vicinity of the beta-cells in vivo are unknown and are probably determined by several

different factors, including the activity of lipoprotein lipase, which accounts for some of the local delivery of fatty acids to the cells [118]. In fact, it is likely that lipoprotein lipase activity is an important control point for fatty acid delivery to beta-cells, since both beta-cell specific deletion and overexpression of its gene in the mouse impairs glucose homeostasis and insulin secretion [119]. Thus, the results of in vitro experiments using fatty acids should be interpreted with caution, particularly when marked cytotoxicity is observed.

### **III. In vivo studies**

#### **A. Rodent models of glucolipotoxicity**

For the reasons described above, the findings of in vitro studies should be confirmed in vivo before they can be extrapolated to physiological or pathological situations. In this regard, pioneering studies by the group of Unger in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat were instrumental in establishing the concept of lipotoxicity and identifying some of its basic mechanisms (reviewed in [120]). In particular, these studies first identified the key role for ceramide as an intracellular mediator of glucolipotoxicity. Thus, in this model accumulation of intra-islet ceramide is detected prior to beta-cell dysfunction [121] and inhibition of ceramide synthesis prevents beta-cell death [47]. In more recent studies the beneficial effects of pharmacological inhibition of sphingolipid synthesis on beta-cell function and diabetes progression has been confirmed not only in the ZDF rat but also in other rodent models [122-124]. However, since ceramide is also implicated in the mechanisms of insulin resistance [123], it is difficult in these in vivo studies to distinguish between the effects of the treatment on insulin sensitivity and those on beta-cell function.

Non-genetic models of glucolipotoxicity have been developed and most often use prolonged infusions of Intralipid, a soybean oil emulsion which generates a mixture of mostly unsaturated fatty acids [125] when co-injected with heparin. In these models, the effects of Intralipid or fatty-acid infusion on beta-cell function have been inconsistent, leading to either unaffected [77], enhanced [126, 127] or reduced [9, 61, 128, 129] insulin secretion. These discrepancies are likely due to differences in strain, sex, age, or infusion

rates. For instance, Mason et al. [61] and Goh et al. [128] suggested that female Wistar rats are more susceptible to the deleterious effects of prolonged high fatty acid levels, and Steil et al. [127] have observed that a 96-h Intralipid infusion did not affect insulin secretion in male Sprague-Dawley rats. The influence of genetic predisposition on the insulin secretory response to excessive fatty acid levels is also illustrated by the observation that insulin secretion is impaired to a greater extent in heterozygous lean ZDF rats than in Wistar rats after Intralipid infusion [128]. Recent studies in our laboratory also highlight the importance of the age of the animals in the response to chronic fuel overload. In a first study we infused 8 week-old male Wistar rats alternatively with glucose for 4 h and Intralipid + heparin for 4h, for a total of 72 h [77]. Hyperglycemic clamps performed at the end of the infusion failed to detect any effects of the glucose + Intralipid infusion regimen on insulin secretion in vivo, as compared to control, saline-infused animals. Similarly, insulin secretion in response to glucose in isolated islets was unaffected. In animals infused with glucose only, we observed an increase in insulin mRNA levels, PDX-1 nuclear localization, and PDX-1 binding to the endogenous insulin gene promoter in islets. In contrast, in islets from animals infused with glucose + Intralipid, insulin mRNA levels were reduced, PDX-1 localization was shifted towards the cytosol, and occupancy of the endogenous insulin promoter by PDX-1 was markedly diminished [77]. These results demonstrate that fatty acid inhibition of the insulin gene also occurs in vivo, and represents an early defect that can be detected prior to any alteration in insulin secretion. The lack of effect of the infusion on insulin secretion in 8-week old rats prompted us to assess whether older animals would be more susceptible to nutrient overload. To test this possibility, we recently conducted a second study in which glucose and Intralipid were infused simultaneously and continuously for 72h to either 8-week old or 6-month old Wistar rats (unpublished results). As in our first study, this infusion regimen did not alter insulin secretion in 8-week old rats, as assessed by hyperglycemic clamps at the end of the infusion. In marked contrast, infusion of glucose + Intralipid in 6-month old rats resulted in marked insulin resistance which was not adequately compensated for by a sufficient increase in insulin secretion in vivo, and in defective insulin secretion in vitro in isolated

islets. The results from these two studies yield two important conclusions. First, defective insulin gene expression under glucolipotoxic conditions occurs *in vivo* and precedes abnormalities in insulin secretion. This confirms the physiological relevance of our previous *in vitro* findings [17, 18] and suggests that impaired insulin gene transcription might represent an early defect in nutrient-induced beta-cell failure. Second, young rats are resistant to the effects of nutrient oversupply, and such studies are probably better conducted in older animals, which more closely resemble the typical setting of type 2 diabetes in humans. Whether or not this age-dependent susceptibility to nutrient oversupply is related to the reduced beta-cell proliferative capacity in older rodents [130, 131] is unknown and currently under investigation.

## B. Studies in humans

As in experimental animals, studies examining the effects of prolonged fatty acids on insulin secretion in humans have led to conflicting results. Initial reports from Boden and colleagues indicated that a 48-h lipid infusion induces an appropriate insulin secretory response in healthy subjects [132] but is defective in type 2 diabetic patients [133]. In contrast, Carpentier et al. [134] showed in non-diabetic individuals that an acute (90-min) lipid infusion elicits an increase in insulin secretion which disappears when the infusion is prolonged for 48h. The loss of insulin secretion is specific to the response to glucose, as the response to arginine remains normal [135]. The same group further showed that obese, but not diabetic, subjects are susceptible to the inhibitory effect of lipids on glucose-induced insulin secretion [136]. Importantly, the increase in insulin secretion observed in non-diabetic subjects in response to a 24-h glucose infusion does not occur if lipids are infused simultaneously with glucose [137]. Xiao et al [138] confirmed that fatty acids also alter beta-cell function in obese individuals when ingested orally, and observed interesting differences between saturated and polyunsaturated fatty acids. While polyunsaturated fatty acids impair insulin secretion directly, saturated fatty acids induce insulin resistance which was not adequately compensated for by an increase in beta-cell function [138]. The same group further observed that concomitant administration of the antioxidant taurine improved

insulin resistance and beta-cell dysfunction induced by Intralipid infusion in vivo in humans, suggesting the possible contribution of oxidative stress [139].

Finally, the group of Cusi and De Fronzo has carried out a series of studies in non-diabetic subjects with and without family history of type 2 diabetes which clearly highlights the importance of genetic predisposition on the effects of chronically elevated fatty acids in humans. They showed that a 4-day Intralipid infusion enhances insulin secretion (taking into account insulin sensitivity) in control subjects but inhibits glucose-induced insulin secretion in individuals with a family history of type 2 diabetes [140]. This suggests that the genetic predisposition to developing type 2 diabetes might be dependent, at least in part, on the ability of the beta cell to increase insulin secretion in response to elevated fatty acid levels. Importantly, treatment of susceptible subjects with Acipimox to decrease circulating fatty acid levels ameliorates insulin secretion [141].

#### **IV. Conclusions**

In recent years, major progress has been made towards a better understanding of the cellular and molecular mechanisms of glucolipotoxicity in the beta-cell. The biochemical basis for the permissive effect of elevated glucose on the deleterious actions of fatty acids is better delineated; the mechanisms by which the combination of excessive levels of fatty acids and glucose alter beta cell function are beginning to be unraveled; and it is becoming clear that the various functional effects of fatty acids (i.e. decreased insulin secretion, impaired insulin gene expression, and beta-cell death by apoptosis) have different underlying mechanisms. Despite significant progress, however, a number of important questions remain. While it is now clear that triglyceride accumulation is more a symptom than a cause of glucolipotoxicity, the nature of the lipid-derived intermediates directly responsible for the detrimental effects of fatty acids is still elusive. In that regard, a role for cholesterol accumulation is also likely. Amongst the several candidates recently proposed to explain fatty-acid inhibition of insulin secretion, the role of UCP2 has become unclear, while convincing evidence seems to implicate the novel isoform PKC  $\epsilon$  as well as late

exocytotic events. Regarding fatty-acid impairment of the insulin gene, a complex picture has emerged which includes prolonged activation of ERK1/2 via de novo ceramide synthesis, downregulation of PASK, and altered binding activities of the transcription factors PDX-1, MafA, and C/EBP $\beta$ . The role of the UPR under conditions of mild glucolipototoxicity (i.e., not associated with cell death) appears limited, although our current hypothesis is that early activation of ATF6 represses insulin gene transcription and thereby contributes to the reduction in proinsulin biosynthesis in an attempt to decrease the load to the ER. As conditions deteriorate, unresolved and sustained unfolded protein response likely leads to ER stress and, consequently, to beta-cell apoptosis under severe glucolipotoxic conditions. The necessity to confirm in vitro findings under physiological conditions has prompted several groups, including ours, to address these questions in in vivo models. Our studies have confirmed that the decrease in insulin gene expression is an early defect which precedes any detectable abnormality in insulin secretion, and have established that prolonged infusions of glucose and Intralipid impairs beta-cell function in old, but not young, animals, raising caution on the use of younger rodents to examine mechanisms of beta-cell failure. While still debated, the role of glucolipototoxicity in humans has been clearly demonstrated in several studies, at least in individuals genetically predisposed to developing type 2 diabetes.

We propose that the uncertainties regarding the role of glucolipototoxicity and its manifestations stem from the fact that it is being considered, as its name implies, as a deleterious phenomenon, while in fact the beta-cell's response to nutrient excess likely represents a continuum encompassing all stages of beta-cell compensation and beta-cell failure. In that sense, some of the early manifestations of glucolipototoxicity should actually be considered as a positive response and would be more appropriately named «glucolipoadaptation», as proposed by Prentki and Nolan [2]. Examples of such adaptive responses are the early decrease in insulin gene expression, as an attempt to protect the ER from overload [77], or the increase in UCP2 expression, as a defense mechanism against oxidative stress [68].

The hypothesis that glucolipotoxicity represents a continuum from an adaptive response to a deleterious outcome is illustrated in Figure 4. According to this view, in normoglycemic individuals experiencing weight gain, the beta cell mounts a compensatory response to counter insulin resistance associated with obesity. This response involves coordinated increases in beta-cell mass, insulin biosynthesis, and insulin secretion, and likely relies on an enhanced responsiveness to fatty acids [142, 143]. The magnitude of the compensatory beta-cell response is probably genetically determined and, in turn, is a major determinant of the long-term ability of an individual to maintain glucose homeostasis in the face of insulin resistance. In contrast, in genetically predisposed individuals beta-cell compensation eventually becomes insufficient and the beta cell is no longer able to sustain a secretory response that matches the demand imposed by insulin resistance. It is probably during this decompensation phase that glucolipotoxicity plays a major role, in that hyperglycemia is the permissive factor by which elevated fatty acids affect beta-cell function. Our data suggest that one of the first functional defect at this stage is a decrease in insulin gene expression, which likely contributes to eventual beta-cell failure since maintenance of adequate intracellular stores of insulin is necessary to sustain increased secretory demand [144]. Beta-cell decompensation evolves towards beta-cell failure when fasting hyperglycemia occurs. At this stage, it is likely that both glucotoxicity and glucolipotoxicity contribute to the decline in insulin secretion observed over time during the years following diagnosis of type 2 diabetes [3]. This model is based on extensive experimental evidence obtained in vitro and in rodents, but additional investigation is necessary to ascertain the precise contribution of glucolipotoxicity to the pathogenesis of type 2 diabetes in humans.

### **Acknowledgements**

Work performed in our laboratory was supported by the US National Institutes of Health (R01-DK58096 from NIDDK) and the Canadian Institutes of Health Research (MOP 77686). V.P. holds the Canada Research Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. G.F. is supported by a post-doctoral fellowship from the Canadian Diabetes



Association. B.Z. is supported by the Montreal Diabetes Research Center / Merck Frosst post-doctoral fellowship.

## References

- [1] R.A. DeFronzo, From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, *Diabetes* 58 (2009) 773-795.
- [2] M. Prentki, C.J. Nolan, Islet beta cell failure in type 2 diabetes, *J Clin Invest* 116 (2006) 1802-1812.
- [3] U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group, *Diabetes* 44 (1995) 1249-1258.
- [4] S.E. Kahn, S.M. Haffner, M.A. Heise, W.H. Herman, R.R. Holman, N.P. Jones, B.G. Kravitz, J.M. Lachin, M.C. O'Neill, B. Zinman, G. Viberti, the ADOPT Study Group, Glycemic Durability of Rosiglitazone, Metformin, or Glyburide Monotherapy, *N Engl J Med* 355 (2006) 2427-2443.
- [5] R.P. Robertson, J.S. Harmon, Y. Tanaka, G. Sacchi, P.O.T. Tran, C.E. Gleason, V. Poitout, Glucose toxicity of the beta-cell: cellular and molecular mechanisms., in: D. Le Roith, S.I. Taylor, J.M. Olefsky (Eds.), *Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text*. 2nd edition., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp. 125-132.
- [6] R.H. Unger, Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications, *Diabetes* 44 (1995) 863-870.
- [7] M. Prentki, B.E. Corkey, Are the  $\beta$ -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?, *Diabetes* 45 (1996) 273-283.

- [8] V. Poitout, R.P. Robertson, Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity, *Endocrinology* 143 (2002) 339-342.
- [9] Y. Sako, V.E. Grill, A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and  $\beta$ -cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation, *Endocrinology* 127 (1990) 1580-1589.
- [10] M.L. Elks, Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release, *Endocrinology* 133 (1993) 208-214.
- [11] Y.-P. Zhou, V. Grill, Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans, *J Clin Endocrinol Metab* 80 (1995) 1584-1590.
- [12] Y.P. Zhou, V.E. Grill, Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose-fatty acid cycle, *J Clin Invest* 93 (1994) 870-876.
- [13] S. Gremlich, C. Bonny, G. Waeber, B. Thorens, Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels, *J Biol Chem* 272 (1997) 30261-30269.
- [14] B. Ritz-Laser, P. Meda, I. Constant, N. Klages, A. Charollais, A. Morales, C. Magnan, A. Ktorza, J. Philippe, Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free-fatty acid palmitate., *Endocrinology* 140 (1999) 4005-4014.
- [15] S. Jacqueminet, I. Briaud, C. Rouault, G. Reach, V. Poitout, Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta-cells to palmitate is dependent upon the presence of a stimulatory glucose concentration, *Metabolism* 49 (2000) 532-536.

- [16] I. Briaud, J.S. Harmon, C.L. Kelpe, V.B. Segu, V. Poitout, Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids., *Diabetes* 50 (2001) 315-321.
- [17] C.L. Kelpe, P.C. Moore, S.D. Parazzoli, B. Wicksteed, C.J. Rhodes, V. Poitout, Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis, *J Biol Chem* 278 (2003) 30015-30021.
- [18] D.K. Hagman, L.B. Hays, S.D. Parazzoli, V. Poitout, Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans, *J Biol Chem* 280 (2005) 32413-32418.
- [19] A. Pick, J. Clark, C. Kubstrup, M. Levisetti, W. Pugh, S. Bonner-Weir, K. Polonsky, Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker Diabetes Fatty rat, *Diabetes* 47 (1998) 358-364.
- [20] M. Shimabukuro, Y.-T. Zhou, M. Levi, R.H. Unger, Fatty-acid-induced beta-cell apoptosis: a link between obesity and diabetes, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 2498-2502.
- [21] M. Cnop, J.C. Hannaert, A. Hoorens, D.L. Eizirik, D.G. Pipeleers, Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation, *Diabetes* 50 (2001) 1771-1777.
- [22] K. Maedler, G.A. Spinas, D. Dyntar, W. Moritz, N. Kaiser, M.Y. Donath, Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function, *Diabetes* 50 (2001) 69-76.
- [23] R. Lupi, F. Dotta, L. Marselli, S. Del Guerra, M. Masini, C. Santangelo, G. Patane, U. Boggi, S. Piro, M. Anello, E. Bergamini, F. Mosca, U. Di Mario, S. Del Prato, P.

- Marchetti, Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated, *Diabetes* 51 (2002) 1437-1442.
- [24] C.E. Wrede, L.M. Dickson, M.K. Lingohr, I. Briaud, C.J. Rhodes, Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1), *J Biol Chem* 277 (2002) 49676-49684.
- [25] S. Piro, M. Anello, C. Di Pietro, M.N. Lizzio, G. Patane, A.M. Rabuazzo, R. Vigneri, M. Purrello, F. Purrello, Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: Possible role of oxidative stress, *Metabolism* 51 (2002) 1340-1347.
- [26] K. Maedler, J. Oberholzer, P. Bucher, G.A. Spinas, M.Y. Donath, Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function, *Diabetes* 52 (2003) 726-733.
- [27] I. Maestre, J. Jordan, S. Calvo, J.A. Reig, V. Cena, B. Soria, M. Prentki, E. Roche, Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1, *Endocrinology* 144 (2003) 335-345.
- [28] W. El-Assaad, J. Buteau, M.L. Peyot, C. Nolan, R. Roduit, S. Hardy, E. Joly, G. Dbaibo, L. Rosenberg, M. Prentki, Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death, *Endocrinology* 144 (2003) 4154-4163.
- [29] J.S. Harmon, C.E. Gleason, Y. Tanaka, V. Poitout, R.P. Robertson, Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker Diabetic Fatty rats, *Diabetes* 50 (2001) 2481-2486.

- [30] I. Briaud, C.L. Kelpel, L.M. Johnson, P.O.T. Tran, V. Poitout, Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic vs. normoglycemic rats., *Diabetes* 51 (2002) 662-668.
- [31] M. Prentki, E. Joly, W. El-Assaad, R. Roduit, Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes, *Diabetes* 51 Suppl 3 (2002) S405-413.
- [32] V. Poitout, Lipid partitioning in the pancreatic beta-cell: physiologic and pathophysiologic implications., *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 9 (2002) 152-159.
- [33] T. Brun, E. Roche, F. Assimacopoulos-Jeannet, B.E. Corkey, K.-H. Kim, M. Prentki, Evidence for anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling, *Diabetes* 45 (1996) 190-198.
- [34] E. Roche, S. Farfari, L.A. Witters, F. Assimacopoulos-Jeannet, S. Thumelin, T. Brun, B.E. Corkey, A.K. Saha, M. Prentki, Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression, *Diabetes* 47 (1998) 1086-1094.
- [35] N. Ruderman, M. Prentki, AMP kinase and malonyl-CoA: Targets for therapy of the metabolic syndrome, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 340-351.
- [36] D.G. Hardie, Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status, *Endocrinology* 144 (2003) 5179-5183.
- [37] I.P. Salt, G. Johnson, S.J. Ashcroft, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta-cells, and may regulate insulin release, *Biochem J* 335 (1998) 533-539.

- [38] X. Wang, L. Zhou, G. Li, T. Luo, Y. Gu, L. Qian, X. Fu, F. Li, J. Li, M. Luo, Palmitate activates AMP-activated protein kinase and regulates insulin secretion from beta cells, *Biochem Biophys Res Commun* 352 (2007) 463-468.
- [39] F. Foufelle, P. Ferre, New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c, *Biochem J* 366 (2002) 377-391.
- [40] S.S. Choe, A.H. Choi, J.W. Lee, K.H. Kim, J.J. Chung, J. Park, K.M. Lee, K.G. Park, I.K. Lee, J.B. Kim, Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells, *Diabetes* 56 (2007) 1534-1543.
- [41] L.L. Listenberger, X. Han, S.E. Lewis, S. Cases, R.V. Farese, Jr., D.S. Ory, J.E. Schaffer, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 3077-3082.
- [42] A.K. Busch, E. Gurisik, D.V. Cordery, M. Sudlow, G.S. Denyer, D.R. Laybutt, W.E. Hughes, T.J. Biden, Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis, *Diabetes* 54 (2005) 2917-2924.
- [43] J.M. Ntambi, M. Miyazaki, J.P. Stoehr, H. Lan, C.M. Kendziorski, B.S. Yandell, Y. Song, P. Cohen, J.M. Friedman, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 11482-11486.
- [44] J.B. Flowers, M.E. Rabaglia, K.L. Schueler, M.T. Flowers, H. Lan, M.P. Keller, J.M. Ntambi, A.D. Attie, Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice, *Diabetes* 56 (2007) 1228-1239.

- [45] C.J. Nolan, M. Prentki, The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable, *Trends Endocrinol Metab* 19 (2008) 285-291.
- [46] M. Prentki, S.R. Madiraju, Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease, *Endocr Rev* 29 (2008) 647-676.
- [47] M. Shimabukuro, M. Higa, Y.T. Zhou, M.Y. Wang, C.B. Newgard, R.H. Unger, Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression, *J Biol Chem* 273 (1998) 32487-32490.
- [48] P.C. Moore, M.A. Ugas, D.K. Hagman, S.D. Parazzoli, V. Poitout, Evidence against the involvement of oxidative stress in Fatty Acid inhibition of insulin secretion, *Diabetes* 53 (2004) 2610-2616.
- [49] M. Cnop, J.C. Hannaert, A.Y. Gruppig, D.G. Pipeleers, Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification, *Endocrinology* 143 (2002) 3449-3453.
- [50] A. Abderrahmani, G. Niederhauser, D. Favre, S. Abdelli, M. Ferdaoussi, J.Y. Yang, R. Regazzi, C. Widmann, G. Waeber, Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells, *Diabetologia* 50 (2007) 1304-1314.
- [51] L.R. Brunham, J.K. Kruit, T.D. Pape, J.M. Timmins, A.Q. Reuwer, Z. Vasanji, B.J. Marsh, B. Rodrigues, J.D. Johnson, J.S. Parks, C.B. Verchere, M.R. Hayden, Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment, *Nat Med* 13 (2007) 340-347.
- [52] M. Ishikawa, Y. Iwasaki, S. Yatoh, T. Kato, S. Kumadaki, N. Inoue, T. Yamamoto, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, N. Yahagi, K. Kobayashi, A. Takahashi, N. Yamada, H. Shimano, Cholesterol accumulation and diabetes in pancreatic beta-cell-specific



- SREBP-2 transgenic mice: a new model for lipotoxicity, *J Lipid Res* 49 (2008) 2524-2534.
- [53] N. Mitro, P.A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreuzsch, E. Saez, The nuclear receptor LXR is a glucose sensor, *Nature* 445 (2007) 219-223.
- [54] C.P. Briscoe, M. Tadayyon, J.L. Andrews, W.G. Benson, J.K. Chambers, M.M. Eilert, C. Ellis, N.A. Elshourbagy, A.S. Goetz, D.T. Minnick, P.R. Murdock, H.R. Sauls, Jr., U. Shabon, L.D. Spinage, J.C. Strum, P.G. Szekeres, K.B. Tan, J.M. Way, D.M. Ignar, S. Wilson, A.I. Muir, The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids, *J Biol Chem* 278 (2003) 11303-11311.
- [55] Y. Itoh, Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa, M. Fujino, Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40, *Nature* 422 (2003) 173-176.
- [56] P. Steneberg, N. Rubins, R. Bartoov-Shifman, M.D. Walker, H. Edlund, The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse., *Cell Metabolism* 1 (2005) 245-258.
- [57] M.G. Latour, T. Alquier, E. Oseid, C. Tremblay, T.L. Jetton, J. Luo, D.C. Lin, V. Poitout, GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo, *Diabetes* 56 (2007) 1087-1094.
- [58] M. Kebede, T. Alquier, M.G. Latour, M. Semache, C. Tremblay, V. Poitout, The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding, *Diabetes* 57 (2008) 2432-2437.

- [59] M. Cnop, M. Igoillo-Esteve, D.A. Cunha, L. Ladriere, D.L. Eizirik, An update on lipotoxic endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells, *Biochem Soc Trans* 36 (2008) 909-915.
- [60] C.P. Tan, Y. Feng, Y.P. Zhou, G.J. Eiermann, A. Petrov, C. Zhou, S. Lin, G. Salituro, P. Meinke, R. Mosley, T.E. Akiyama, M. Einstein, S. Kumar, J.P. Berger, S.G. Mills, N.A. Thornberry, L. Yang, A.D. Howard, Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice, *Diabetes* 57 (2008) 2211-2219.
- [61] T.M. Mason, T. Goh, V. Tchipashvili, H. Sandhu, N. Gupta, G.F. Lewis, A. Giacca, Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats, *Diabetes* 48 (1999) 524-530.
- [62] G. Paolisso, A. Gambardella, L. Amato, R. Tortoriello, A. D'Amore, M. Varrichio, F. D'Onofrio, Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects, *Diabetologia* 38 (1995) 1295-1299.
- [63] C.-Y. Zhang, G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni, D. Grujic, T. Hagen, A.-J. Vidal-Puig, O. Boss, Y.-B. Kim, X.X. Zheng, M.B. Wheeler, G.I. Shulman, C.B. Chan, B.B. Lowell, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta-cell dysfunction, and Type 2 diabetes., *Cell* 105 (2001) 745-755.
- [64] J. Nedergaard, D. Ricquier, L.P. Kozak, Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects, *EMBO Rep* 6 (2005) 917-921.
- [65] C.B. Chan, P.E. MacDonald, M.C. Saleh, D.C. Johns, E. Marban, M.B. Wheeler, Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets, *Diabetes* 48 (1999) 1482-1486.

- [66] C.B. Chan, D. De Leo, J.W. Joseph, T.S. McQuaid, X.F. Ha, F. Xu, R.G. Tsushima, P.S. Pennefather, A.M. Salapatek, M.B. Wheeler, Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action., *Diabetes* 50 (2001) 1302-1310.
- [67] J.W. Joseph, V. Koshkin, C.Y. Zhang, J. Wang, B.B. Lowell, C.B. Chan, M.B. Wheeler, Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet, *Diabetes* 51 (2002) 3211-3219.
- [68] J. Pi, Y. Bai, K.W. Daniel, D. Liu, O. Lyght, D. Edelstein, M. Brownlee, B.E. Corkey, S. Collins, Persistent Oxidative Stress Due to Absence of Uncoupling Protein 2 Associated with Impaired Pancreatic Beta-Cell Function, *Endocrinology* (2009).
- [69] N. Lameloise, P. Muzzin, M. Prentki, F. Assimacopoulos-Jeannet, Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?, *Diabetes* 50 (2001) 803-809.
- [70] G. Patane, M. Anello, S. Piro, R. Vigneri, F. Purrello, A.M. Rabuazzo, Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition, *Diabetes* 51 (2002) 2749-2756.
- [71] N. Produit-Zengaffinen, N. Davis-Lameloise, H. Perreten, D. Becard, A. Gjinovci, P.A. Keller, C.B. Wollheim, P. Herrera, P. Muzzin, F. Assimacopoulos-Jeannet, Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species, *Diabetologia* 50 (2007) 84-93.
- [72] C. Schmitz-Peiffer, D.R. Laybutt, J.G. Burchfield, E. Gurisik, S. Narasimhan, C.J. Mitchell, D.J. Pedersen, U. Braun, G.J. Cooney, M. Leitges, T.J. Biden, Inhibition

of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance, *Cell Metab* 6 (2007) 320-328.

- [73] J. Cantley, J.G. Burchfield, G.L. Pearson, C. Schmitz-Peiffer, M. Leitges, T.J. Biden, Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse [352]-cells, *Diabetes* (2009).
- [74] M.L. Peyot, C. Guay, M.G. Latour, J. Lamontagne, R. Lussier, M. Pineda, N.B. Ruderman, G. Haemmerle, R. Zechner, E. Joly, S.R. Madiraju, V. Poitout, M. Prentki, Adipose Triglyceride Lipase Is Implicated in Fuel- and Non-fuel-stimulated Insulin Secretion, *J Biol Chem* 284 (2009) 16848-16859.
- [75] T. Kato, H. Shimano, T. Yamamoto, T. Yokoo, Y. Endo, M. Ishikawa, T. Matsuzaka, Y. Nakagawa, S. Kumadaki, N. Yahagi, A. Takahashi, H. Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima, A.H. Hastay, S. Takahashi, H. Gomi, T. Izumi, N. Yamada, Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice, *Cell Metab* 4 (2006) 143-154.
- [76] C.S. Olofsson, S. Collins, M. Bengtsson, L. Eliasson, A. Salehi, K. Shimomura, A. Tarasov, C. Holm, F. Ashcroft, P. Rorsman, Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane, *Diabetes* 56 (2007) 1888-1897.
- [77] D.K. Hagman, M.G. Latour, S.K. Chakrabarti, G. Fontes, J. Amyot, C. Tremblay, M. Semache, J.A. Lausier, V. Roskens, R.G. Mirmira, T.L. Jetton, V. Poitout, Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets, *Diabetes* 57 (2008) 424-431.

- [78] J.S. Harmon, R. Stein, R.P. Robertson, Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells, *J Biol Chem* 280 (2005) 11107-11113.
- [79] S. Mathias, L.A. Pena, R.N. Kolesnick, Signal transduction of stress via ceramide, *Biochem J* 335 ( Pt 3) (1998) 465-480.
- [80] E. Henderson, R. Stein, c-jun inhibits transcriptional activation by the insulin enhancer, and the insulin control element is the target of control, *Mol Cell Biol* 14 (1994) 655-662.
- [81] G.L. Robinson, E. Henderson, M.E. Massari, C. Murre, R. Stein, c-jun inhibits insulin control element-mediated transcription by affecting the transactivation potential of the E2A gene products, *Mol Cell Biol* 15 (1995) 1398-1404.
- [82] H. Kaneto, G. Xu, N. Fujii, S. Kim, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Involvement of c-Jun N-terminal Kinase in Oxidative Stress-mediated Suppression of Insulin Gene Expression, *J Biol Chem* 277 (2002) 30010-30018.
- [83] G. Solinas, W. Naugler, F. Galimi, M.S. Lee, M. Karin, Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 16454-16459.
- [84] G. Fontes, M. Semache, D.K. Hagman, C. Tremblay, R. Shah, C.J. Rhodes, J. Rutter, V. Poitout, Involvement of PAS Kinase and ERK1/2 in Palmitate Inhibition of Insulin Gene Expression In Pancreatic Beta-Cells, *Diabetes* (2009) published ahead of print June 5, 2009, doi:10.2337/db08-0579.
- [85] C.A. Amezcua, S.M. Harper, J. Rutter, K.H. Gardner, Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation, *Structure* 10 (2002) 1349-1361.

- [86] J. Rutter, B.L. Probst, S.L. McKnight, Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase, *Cell* 111 (2002) 17-28.
- [87] W.A. Wilson, A.V. Skurat, B. Probst, A. de Paoli-Roach, P.J. Roach, J. Rutter, Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 16596-16601.
- [88] G. da Silva Xavier, J. Rutter, G.A. Rutter, Involvement of Per-Arnt-Sim (PAS) kinase in the stimulation of preproinsulin and pancreatic duodenum homeobox 1 gene expression by glucose, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 8319-8324.
- [89] M. Lu, J. Seufert, J.F. Habener, Pancreatic  $\beta$ -cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/Enhancer-binding protein  $\beta$ . Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47, *J Biol Chem* 272 (1997) 28349-28359.
- [90] V. Plaisance, V. Perret, D. Favre, A. Abderrahmani, J.Y. Yang, C. Widmann, R. Regazzi, Role of the transcriptional factor C/EBP $\beta$  in free fatty acid-elicited beta-cell failure, *Mol Cell Endocrinol* 305 (2009) 47-55.
- [91] M.C. Lawrence, K. McGlynn, B.H. Park, M.H. Cobb, ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter, *J Biol Chem* 280 (2005) 26751-26759.
- [92] D.L. Eizirik, A.K. Cardozo, M. Cnop, The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus, *Endocr Rev* 29 (2008) 42-61.
- [93] D.R. Laybutt, A.M. Preston, M.C. Akerfeldt, J.G. Kench, A.K. Busch, A.V. Biankin, T.J. Biden, Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes, *Diabetologia* 50 (2007) 752-763.

- [94] E. Karaskov, C. Scott, L. Zhang, T. Teodoro, M. Ravazzola, A. Volchuk, Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis, *Endocrinology* 147 (2006) 3398-3407.
- [95] M. Cnop, L. Ladriere, P. Hekerman, F. Ortis, A.K. Cardozo, Z. Dogusan, D. Flamez, M. Boyce, J. Yuan, D.L. Eizirik, Selective inhibition of EIF2alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced ER stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis, *J Biol Chem* (2006).
- [96] H. Wang, G. Kouri, C.B. Wollheim, ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity, *J Cell Sci* 118 (2005) 3905-3915.
- [97] I. Kharroubi, L. Ladriere, A.K. Cardozo, Z. Dogusan, M. Cnop, D.L. Eizirik, Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress, *Endocrinology* 145 (2004) 5087-5096.
- [98] S.C. Martinez, K. Tanabe, C. Cras-Meneur, N.A. Abumrad, E. Bernal-Mizrachi, M.A. Permutt, Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *Diabetes* 57 (2008) 846-859.
- [99] D.A. Cunha, P. Hekerman, L. Ladriere, A. Bazarra-Castro, F. Ortis, M.C. Wakeham, F. Moore, J. Rasschaert, A.K. Cardozo, E. Bellomo, L. Overbergh, C. Mathieu, R. Lupi, T. Hai, A. Herchuelz, P. Marchetti, G.A. Rutter, D.L. Eizirik, M. Cnop, Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells, *J Cell Sci* 121 (2008) 2308-2318.
- [100] E. Bachar, Y. Ariav, M. Ketzinel-Gilad, E. Cerasi, N. Kaiser, G. Leibowitz, Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1, *PLoS One* 4 (2009) e4954.

- [101] K.S. Gwiazda, T.L. Yang, Y. Lin, J.D. Johnson, Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in beta-cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (2009) E690-701.
- [102] P.C. Moore, D.C. Lin, J. Luo, V. Poitout, Deletion of the GPR40 gene impairs fatty-acid potentiation of insulin secretion in isolated mouse islets., *Diabetes* 54/Suppl.1 (2005) A83.
- [103] H.Y. Seo, Y.D. Kim, K.M. Lee, A.K. Min, M.K. Kim, H.S. Kim, K.C. Won, J.Y. Park, K.U. Lee, H.S. Choi, K.G. Park, I.K. Lee, Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner, *Endocrinology* 149 (2008) 3832-3841.
- [104] C. Evans-Molina, R.D. Robbins, T. Kono, S.A. Tersey, G.L. Vestermark, C.S. Nunemaker, J.C. Garmey, T.G. Deering, S.R. Keller, B. Maier, R.G. Mirmira, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice through reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure, *Mol Cell Biol* 29 (2009) 2053-2067.
- [105] P. Pirot, N. Naamane, F. Libert, N.E. Magnusson, T.F. Orntoft, A.K. Cardozo, D.L. Eizirik, Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs, *Diabetologia* 50 (2007) 1006-1014.
- [106] X. Wang, H. Li, D. De Leo, W. Guo, V. Koshkin, I.G. Fantus, A. Giacca, C.B. Chan, S. Der, M.B. Wheeler, Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6, *Diabetes* 53 (2004) 129-140.



- [107] D. Morgan, H.R. Oliveira-Emilio, D. Keane, A.E. Hirata, M. Santos da Rocha, S. Bordin, R. Curi, P. Newsholme, A.R. Carpinelli, Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line, *Diabetologia* 50 (2007) 359-369.
- [108] A.K. Busch, D. Cordery, G.S. Denyer, T.J. Biden, Expression profiling of palmitate- and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic beta-cell function, *Diabetes* 51 (2002) 977-987.
- [109] K.D. Jeffrey, E.U. Alejandro, D.S. Luciani, T.B. Kalynyak, X. Hu, H. Li, Y. Lin, R.R. Townsend, K.S. Polonsky, J.D. Johnson, Carboxypeptidase E mediates palmitate-induced beta-cell ER stress and apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 8452-8457.
- [110] E. Lai, G. Bikopoulos, M.B. Wheeler, M. Rozakis-Adcock, A. Volchuk, Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294 (2008) E540-550.
- [111] C.J. Huang, C.Y. Lin, L. Haataja, T. Gurlo, A.E. Butler, R.A. Rizza, P.C. Butler, High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes, *Diabetes* 56 (2007) 2016-2027.
- [112] W.F. Graier, R. Malli, G.M. Kostner, Mitochondrial protein phosphorylation: instigator or target of lipotoxicity?, *Trends Endocrinol Metab* 20 (2009) 186-193.
- [113] V. Koshkin, F.F. Dai, C.A. Robson-Doucette, C.B. Chan, M.B. Wheeler, Limited mitochondrial permeabilization is an early manifestation of palmitate-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells, *J Biol Chem* 283 (2008) 7936-7948.

- [114] D.S. Luciani, K.S. Gwiazda, T.L. Yang, T.B. Kalynyak, Y. Bychkivska, M.H. Frey, K.D. Jeffrey, A.V. Sampaio, T.M. Underhill, J.D. Johnson, Roles of IP3R and RyR Ca<sup>2+</sup> channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death, *Diabetes* 58 (2009) 422-432.
- [115] P. Lovis, E. Roggli, D.R. Laybutt, S. Gattesco, J.Y. Yang, C. Widmann, A. Abderrahmani, R. Regazzi, Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction, *Diabetes* 57 (2008) 2728-2736.
- [116] G.V. Richieri, A. Anel, A.M. Kleinfeld, Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB, *Biochemistry* 32 (1993) 7574-7580.
- [117] G.V. Richieri, A.M. Kleinfeld, Unbound free fatty acid levels in human serum, *J Lipid Res* 36 (1995) 229-240.
- [118] W.S. Cruz, G. Kwon, C.A. Marshall, M.L. McDaniel, C.F. Semenkovich, Glucose and insulin stimulate heparin-releasable lipoprotein lipase activity in mouse islets and INS-1 cells. A potential link between insulin resistance and beta-cell dysfunction, *J Biol Chem* 276 (2001) 12162-12168.
- [119] K.L. Pappan, Z. Pan, G. Kwon, C.A. Marshall, T. Coleman, I.J. Goldberg, M.L. McDaniel, C.F. Semenkovich, Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion, *J Biol Chem* 280 (2005) 9023-9029.
- [120] R.H. Unger, Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome, *Endocrinology* 144 (2003) 5159-5165.
- [121] Y. Lee, H. Hirose, M. Ohneda, J.H. Johnson, J.D. McGarry, R.H. Unger, Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese

- rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships, *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 10878-10882.
- [122] J.M. Aerts, R. Ottenhoff, A.S. Powlson, A. Grefhorst, M. van Eijk, P.F. Dubbelhuis, J. Aten, F. Kuipers, M.J. Serlie, T. Wennekes, J.K. Sethi, S. O'Rahilly, H.S. Overkleeft, Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity, *Diabetes* 56 (2007) 1341-1349.
- [123] W.L. Holland, J.T. Brozinick, L.P. Wang, E.D. Hawkins, K.M. Sargent, Y. Liu, K. Narra, K.L. Hoehn, T.A. Knotts, A. Siesky, D.H. Nelson, S.K. Karathanasis, G.K. Fontenot, M.J. Birnbaum, S.A. Summers, Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance, *Cell Metab* 5 (2007) 167-179.
- [124] H. Zhao, M. Przybylska, I.H. Wu, J. Zhang, C. Siegel, S. Komarnitsky, N.S. Yew, S.H. Cheng, Inhibiting glycosphingolipid synthesis improves glycemic control and insulin sensitivity in animal models of type 2 diabetes, *Diabetes* 56 (2007) 1210-1218.
- [125] D.T. Stein, B.E. Stevenson, M.W. Chester, M. Basit, M.B. Daniels, S.D. Turley, J.D. McGarry, The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation., *J Clin Invest* 100 (1997) 398-403.
- [126] C. Magnan, S. Collins, M.F. Berthault, N. Kassis, M. Vincent, M. Gilbert, L. Penicaud, A. Ktorza, F. Assimacopoulos-Jeannet, Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose, *J Clin Invest* 103 (1999) 413-419.
- [127] G.M. Steil, N. Trivedi, J.C. Jonas, W.M. Hasenkamp, A. Sharma, S. Bonner-Weir, G.C. Weir, Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 (2001) E788-796.

- [128] T.T. Goh, T.M. Mason, N. Gupta, A. So, T.K. Lam, L. Lam, G.F. Lewis, A. Mari, A. Giacca, Lipid-induced beta-cell dysfunction in vivo in models of progressive beta-cell failure, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E549-560.
- [129] A.I. Oprescu, G. Bikopoulos, A. Naassan, E.M. Allister, C. Tang, E. Park, H. Uchino, G.F. Lewis, I.G. Fantus, M. Rozakis-Adcock, M.B. Wheeler, A. Giacca, Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo, *Diabetes* 56 (2007) 2927-2937.
- [130] M.M. Rankin, J.A. Kushner, Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age, *Diabetes* 58 (2009) 1365-1372.
- [131] S.I. Tschen, S. Dhawan, T. Gurlo, A. Bhushan, Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice, *Diabetes* 58 (2009) 1312-1320.
- [132] G. Boden, X. Chen, J. Rosner, M. Barton, Effects of a 48h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization., *Diabetes* 44 (1995) 1239-1242.
- [133] G. Boden, X. Chen, Effects of fatty acids and ketone bodies on basal insulin secretion in type 2 diabetes., *Diabetes* 48 (1999) 577-583.
- [134] A. Carpentier, S. Mittelman, B. Lamarche, R. Bergman, A. Giacca, G. Lewis, Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation., *Am J Physiol* 276 (1999).
- [135] A. Carpentier, A. Giacca, G.F. Lewis, Effect of increased plasma non-esterified fatty acids (NEFAs) on arginine-stimulated insulin secretion in obese humans, *Diabetologia* 44 (2001) 1989-1997.
- [136] A. Carpentier, S.D. Mittelman, R.N. Bergman, A. Giacca, G.F. Lewis, Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese

- nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes, *Diabetes* 49 (2000) 399-408.
- [137] N. Leung, T. Sakaue, A. Carpentier, K. Uffelman, A. Giacca, G.F. Lewis, Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men, *Diabetologia* 47 (2004) 204-213.
- [138] C. Xiao, A. Giacca, A. Carpentier, G.F. Lewis, Differential effects of monounsaturated, polyunsaturated and saturated fat ingestion on glucose-stimulated insulin secretion, sensitivity and clearance in overweight and obese, non-diabetic humans, *Diabetologia* 49 (2006) 1371-1379.
- [139] C. Xiao, A. Giacca, G.F. Lewis, Oral taurine but not N-acetylcysteine ameliorates NEFA-induced impairment in insulin sensitivity and beta cell function in obese and overweight, non-diabetic men, *Diabetologia* 51 (2008) 139-146.
- [140] S. Kashyap, R. Belfort, A. Gastaldelli, T. Pratipanawatr, R. Berria, W. Pratipanawatr, M. Bajaj, L. Mandarino, R. DeFronzo, K. Cusi, A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes, *Diabetes* 52 (2003) 2461-2474.
- [141] K. Cusi, S. Kashyap, A. Gastaldelli, M. Bajaj, E. Cersosimo, Effects on insulin secretion and insulin action of a 48-h reduction of plasma free fatty acids with acipimox in nondiabetic subjects genetically predisposed to type 2 diabetes, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E1775-1781.
- [142] M. Fex, M.D. Nitert, N. Wierup, F. Sundler, C. Ling, H. Mulder, Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet, *Diabetologia* 50 (2006) 74-83.

- [143] C.J. Nolan, J.L. Leahy, V. Delghingaro-Augusto, J. Moibi, K. Soni, M.L. Peyot, M. Fortier, C. Guay, J. Lamontagne, A. Barbeau, E. Przybytkowski, E. Joly, P. Masiello, S. Wang, G.A. Mitchell, M. Prentki, Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling, *Diabetologia* 49 (2006) 2120-2130.
- [144] G. Leibowitz, G. Uckaya, A.I. Oprescu, E. Cerasi, D.J. Gross, N. Kaiser, Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure, *Endocrinology* 143 (2002) 3214-3220.

## Figure legends

**Figure 1: Effects of glucose on lipid partitioning in the beta cell.** In the presence of simultaneously elevated levels of glucose and fatty-acid (FA), the increase in cytosolic malonyl-CoA resulting from glucose metabolism inhibits the enzyme carnitine-palmitoyl transferase-1 (CPT-1). Transport of long-chain acyl-CoA (LC-CoA) in the mitochondria is reduced, and the esterification pathway is preferentially activated, leading to cytosolic accumulation of lipid-derived signaling molecules such as ceramide, diglycerides (DG), phosphatidic acid (PA), phospholipids (PL), and triglycerides (TG).

**Figure 2: Working model of the mechanisms of fatty-acid inhibition of insulin gene expression.** Several signaling pathways are activated in beta cells in the presence of simultaneously elevated levels of palmitate and glucose. First, de novo ceramide synthesis [17] leads to sustained activation of ERK  $\frac{1}{2}$  [82] and exclusion of PDX-1 from the nuclear compartment [18]. Second, palmitate blocks glucose-induction of PASK expression, which results in decreased PDX-1 expression and increased C/EBP $\beta$  expression [82]. Third, palmitate decreases MafA expression [18]. These 3 pathways result in decreased binding activities of PDX-1 and MafA on the insulin promoter. In addition, palmitate induces the cleavage of ATF6, which also represses insulin gene transcription (our unpublished data).

**Figure 3: Concentrations of unbound fatty acids (FA) in solution as a function of the fatty acid : BSA ratio for a fixed total palmitate concentration of 0.5 mM.** Unbound fatty acids were measured using the fluorescent probe ADIFAB [114]. Data are the average of 2 independent experiments. Also represented are the mean  $\pm$  SD of unbound FA levels measured in human plasma using the same method, from [115].

**Figure 4: Hypothetical representation of the progression from beta-cell compensation to failure in the face of obesity-induced insulin resistance, and the role of glucolipotoxicity.** According to this hypothesis, the decrease in insulin sensitivity is initially matched by a marked increase in insulin secretion, insulin gene expression, and beta-cell mass. At this stage the beta-cell adapts to nutrient oversupply by switching to

preferential utilization of fatty acids, as part of the compensatory response (glucolipoadaptation [2]). In genetically predisposed individuals, the beta cell eventually becomes unable to further compensate and glucolipoadaptation evolves towards glucolipotoxicity, in which excursions of blood glucose levels outside of the normal range become permissive for the detrimental effects of elevated fatty acids. This phase is characterized by an early loss of insulin gene expression, decreased insulin secretion (relative to the degree of insulin resistance), and reduced beta-cell mass. Finally, beta-cell failure occurs when glucose levels are permanently in the hyperglycemic range. At that stage both glucotoxicity and glucolipotoxicity contribute to the continued deterioration of beta-cell function.



Figure 1 – Poitout et al.

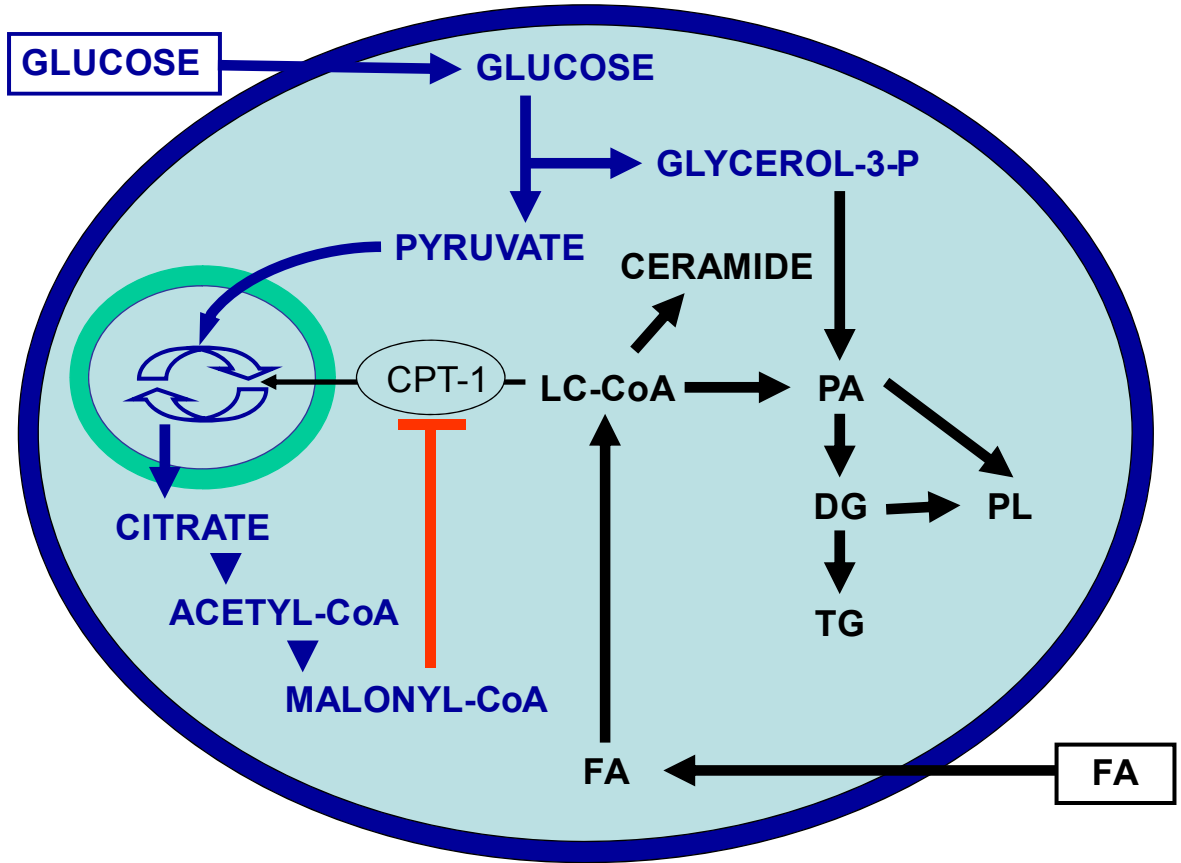


Figure 2 – Poitout et al.

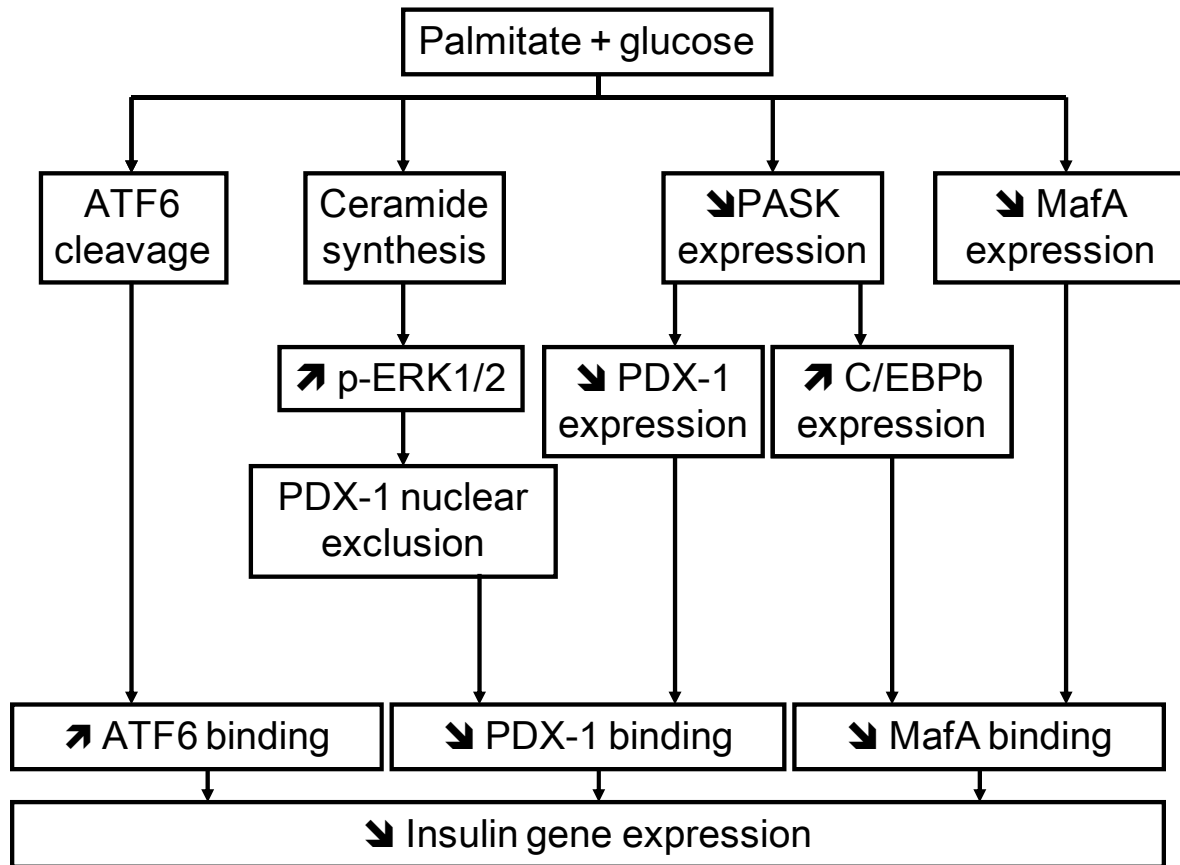


Figure 3 – Poitout et al.

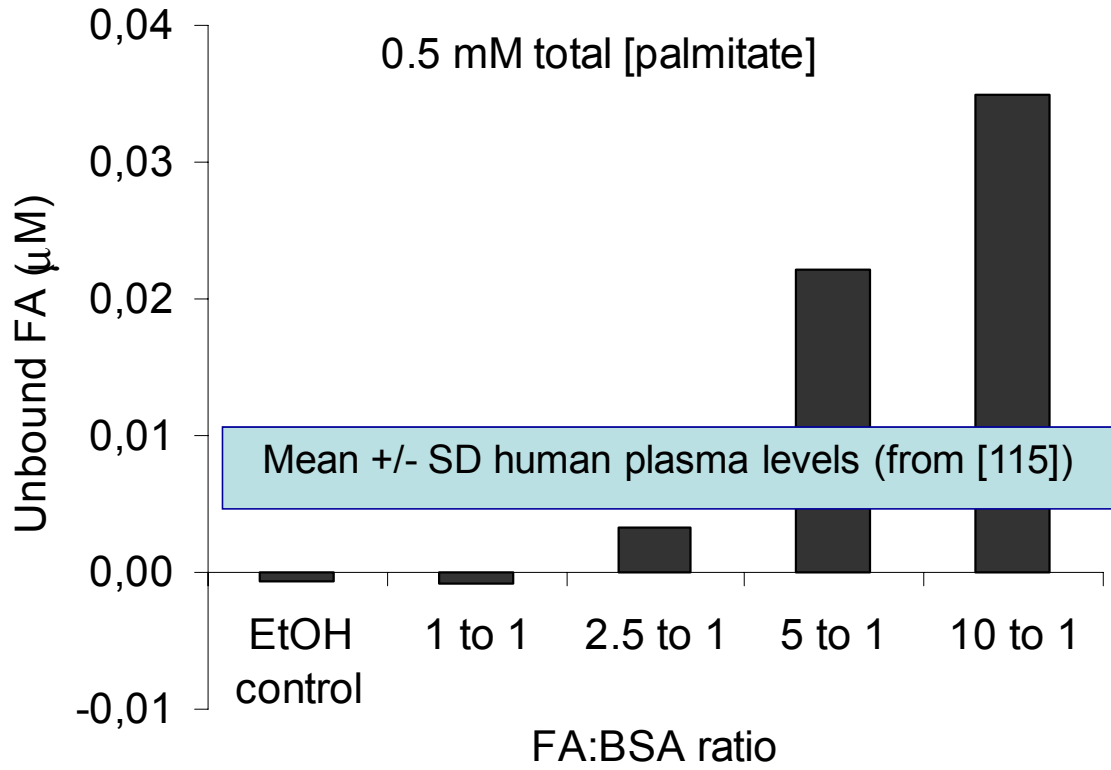


Figure 4 – Poitout et al.

