

MATHIEU LAFONTAINE LACASSE

**IMPLICATION DE LA PROTÉINE SIRT1 DANS LA  
STIMULATION DE L' APOPTOSE DES CELLULES  
BÊTA PANCRÉATIQUES PAR LA VOIE DES  
HEXOSAMINES.**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en pharmacie avec mémoire  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE PHARMACIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2010

## Résumé

L'apoptose des cellules bêta pancréatiques est une cause du diabète de type 2. La glycosylation par la voie des hexosamines modifie l'activité de protéines régulatrices. La déacétylase Sirt1 est connue pour son rôle dans la survie cellulaire et pour sa sensibilité face au métabolisme glucidique. Cette étude visait à montrer que l'activation directe de la voie des hexosamines stimule la mort de ces cellules par l'implication de Sirt-1. Le traitement des cellules Nit-1 avec la glucosamine a causé une augmentation temporelle significative de l'apoptose, jumelée à l'expression de facteurs pro-apoptotiques, la réduction des niveaux protéiques de Sirt-1 ainsi que sa glycosylation. De plus, l'atténuation génétique de Sirt1 a accentué la vulnérabilité des cellules à l'apoptose. Ces résultats montrent pour la première fois que Sirt1 joue un rôle important dans la survie de la cellule bêta et que sa glycosylation serait impliquée dans la perturbation de son rôle protecteur.

## Avant-propos

Ce mémoire est séparé en une suite logique de quatre chapitres : le premier compose l'introduction de la recherche, le deuxième propose l'hypothèse de la recherche et les objectifs qui lui sont rattachés, le troisième présente les résultats de l'étude et le quatrième décrit les principales conclusions obtenues des résultats.

La section des résultats est composée d'un article inséré dans le mémoire. *Hexosamines stimulate apoptosis by altering Sirt1 action and levels in rodent pancreatic  $\beta$ -cells*, a été soumis pour publication à l'été 2009 dans le journal *Diabetologia*. Les co-auteurs de cet article sont mon directeur de recherche, le Dr Frédéric Picard, et une étudiante à la maîtrise du laboratoire du Dr Picard, Geneviève Doré. J'ai participé à la conceptualisation de cette étude avec le Dr Frédéric Picard. Pour cet article scientifique, j'ai effectué l'ensemble des manipulations et expériences à l'exception des immunofluorescences de la figure 4, qui ont été effectuées et analysées par Geneviève Doré. De plus, j'ai participé à la construction des figures, l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit en collaboration avec le Dr Picard. J'estime que ma contribution globale à la réalisation de ce projet s'élève à plus de 85%.

L'article inséré en annexe, *Site-specific modulation of Sirt1 mRNA in the brain of aging mouse*, est une courte étude qui est en révision dans le journal *Neuroscience Letters*. Les co-auteurs de cet article sont mon directeur de recherche, le Dr Frédéric Picard, et le directeur du centre de recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, le Dr Denis Richard. Ce projet a été effectué durant mes études graduées simultanément avec la première étude et un autre projet sur des facteurs intestinaux chez des modèles animaux de diabète de type 2. Cet article a été placé en annexe puisqu'il implique la protéine étudiée dans la première étude dans un contexte de vieillissement, qui est associé à des perturbations métaboliques comme le diabète de type 2. Ma contribution à ce projet, de plus de 95%, touche l'ensemble des manipulations, à l'exception de la préparation de la sonde par l'équipe du Dr Richard, et la préparation du manuscrit conjointement avec le Dr Picard et le Dr Richard.

Je voudrais prendre les prochaines lignes pour remercier les gens qui m'ont apporté un grand soutien théorique, et, surtout, moral durant les 2 ans de réalisation du projet et d'écriture de ce mémoire. **Maman et Papa** : Je vous serai éternellement reconnaissant pour l'incroyable support moral que vous m'avez fourni tout au long du processus. Malgré les moments difficiles rencontrés, je me suis toujours senti épaulé par votre compréhension, votre écoute et vos nombreux messages de persévérance et courage. Ce mémoire est pour vous, je vous aime et je suis tellement fier d'avoir les meilleurs parents du monde. **Jean-Bruno et Marie** : Cher frère et chère sœur, merci pour la compréhension et vos encouragements à travers les hauts et les bas de ma démarche académique. Vous êtes aussi pour moi des sources constantes d'inspiration. **Mes amis Jonathan, Pierre, Julien, Jérôme, Rémi et tous les autres** : Merci de m'avoir fait décrocher à certains moments de mes expériences, vous m'avez permis de me changer les idées pour mieux reprendre par la suite. **Stéphanie et Louise** : Merci pour tout le support technique, l'écoute et la patience que vous avez eu avec moi durant ces dernières années passées en votre compagnie. Vous êtes des modèles et allez me manquer. **Anne-Marie** : Certes, tu as été ma voisine de bureau durant les 2 dernières années, mais tu es avant tout une amie qui m'a compris et qui m'a motivé à persévérer. **Catherine, Évelyne, Geneviève, Sophie et Zhuo** : Merci à vous tous pour l'atmosphère plus qu'agréable que vous m'avez donné au laboratoire. Bonne chance dans tous vos projets. **Frédéric** : Merci de m'avoir donné ma chance dans ton laboratoire. Tu m'as toujours vu plus haut que ce que je me considère, fait confiance et donné les outils nécessaires pour que les travaux effectués soient des plus enrichissants pour moi. **À tous les autres que je n'ai pas mentionné et qui ont influencé de près ou de loin à mes études graduées** : Tout simplement... merci!

Finalement, je veux remercier les organismes suivants pour leurs contributions financières : les IRSC, le FRSQ et le FER de la Faculté de pharmacie de l'Université Laval. De plus, merci à tout son personnel, spécialement Louise Montreuil, et, au Dr Denis Richard et tout le personnel du Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec.

## Table des matières

Résumé.....	ii
Avant-propos .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	viii
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1. Le diabète de type 2 .....	2
1.1. Obésité et détériorations métaboliques.....	2
1.2. Généralités .....	3
1.3. Épidémiologie .....	3
1.4. Comparaison avec le type 1.....	4
1.5. Résistance à l'insuline .....	6
1.6. Compensation de la cellule bêta pancréatique .....	6
1.7. Initiation et progression de la dysfonction pancréatique.....	10
2. Glycosylation protéique .....	14
2.1. Historique .....	14
2.2. Dynamique des modifications O-GlcNAc .....	15
2.3. Activité et composantes de la voie des hexosamines .....	17
2.3.1. GFAT .....	18
2.3.2. OGT .....	19
2.3.3. O-GlcNAcase.....	20
2.4. Impact métabolique .....	21
2.4.1. Résistance à l'insuline et diabète de type 2 .....	22
2.4.1.1. Cascade de signalisation à l'insuline .....	22
2.4.1.2. Dysfonction et apoptose de la cellule bêta pancréatique .....	24
2.4.2. Régulation de la transcription.....	25
2.4.2.1. Métabolisme glucidique.....	25
2.4.2.2. Complexe transcriptionnel .....	25
2.4.2.3. Application à la cellule bêta pancréatique .....	26
2.4.3. Réponse inflammatoire.....	27
2.4.4. Stress cellulaire et stabilité protéique .....	27
3. Les sirtuines.....	29
3.1. Découverte et conservation .....	29
3.2. Famille des sirtuines .....	29
3.3. Activité et structure de Sirt1 .....	31
3.4. Métabolisme énergétique .....	33
3.4.1. Impact sur la signalisation à l'insuline .....	34
3.4.2. Muscle squelettique .....	35
3.4.3. Tissu adipeux.....	36
3.4.4. Foie .....	37
3.4.5. Pancréas .....	37

3.5. Inflammation .....	38
3.6. Prévention de la neurodégénération .....	39
3.7. Développement.....	40
3.8. Apoptose et survie cellulaire .....	41
<b>CHAPITRE II : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET .....</b>	<b>46</b>
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS .....</b>	<b>49</b>
Résumé.....	50
<b>HEXOSAMINES STIMULATE APOPTOSIS BY ALTERING SIRT1 ACTION AND     LEVELS IN RODENT PANCREATIC <math>\beta</math>-CELLS.....</b>	<b>51</b>
<b>CHAPITRE IV: CONCLUSIONS.....</b>	<b>78</b>
Références.....	86
<b>ANNEXE.....</b>	<b>100</b>
Résumé.....	101
<b>SITE-SPECIFIC MODULATION OF SIRT1 MRNA IN THE BRAIN OF AGING     MOUSE.....</b>	<b>102</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Prévision de l'augmentation de la prévalence mondiale du diabète de type 2 entre 2005 et 2025 (Dans International Diabetes Federation : Diabetes Atlas 2006, Brussels, International Diabetes Federation, 2007).....	4
Figure 2 : Évolution parallèle de l'échec de la fonction pancréatique et du diabète de type 2 (Dans Prentki M, JCI, 2006) .....	5
Figure 3 : Protéome des facteurs présentant une modification O-GlcNAc. Les substrats connus sont regroupés selon leur fonction respective. La plupart des facteurs identifiés sont impliqués dans la régulation génique. Cette observation peut représenter un biais par le fort intérêt de l'étude des facteurs de transcription et des protéines de régulation cellulaire (Adapté de Love DC, STKE Science, 2005) .....	14
Figure 4 : Le cycle d'O-GlcNAc sur sérine/thréonine des protéines nucléaires ou cytoplasmiques est contrôlé par les deux enzymes fortement conservées OGT et O-GlcNAcase. Ce processus est similaire en cinétique au processus de phosphorylation en réponses à certains états métaboliques. (Dans Hart. GW, Nature, 2007).....	16
Figure 5 : Les protéines O-GlcNAc sont directement impliquées les événements de transcription et de signalisation impliquant le glucose (Dans Copeland RJ., AJPEM, 2008).....	22
Figure 6 : Les sept sirtuïnes chez les mammifères sont classées en quatre catégories selon la les caractéristiques phylogénétique moléculaires (Adapté de Michan S, Biochem J, 2007).....	30
Figure 7 : Les sirtuïnes sont des déacétylases dépendantes du NAD <sup>+</sup> et des mono-ADP-ribosyl transférases qui contrôle une vaste gamme de protéines impliquées dans le métabolisme et la survie cellulaire (Dans Michan S, Biochem J, 2007).....	32
Figure 8 : L'activité déacétylase de Sirt1 est impliquée dans les différentes fonctions métaboliques (Dans Liang F, Nature Rev Endo, 2009) .....	34

**Liste des abréviations**

ADP : Adénosine diphosphate  
AMPK: Adénosine monophosphate kinase  
APP: Amyloid precursor peptid  
AROS: Active regulator of Sirt1  
ATF4: Activating transcription factor 4  
ATP: Adénosine triphosphate  
Bad: Bcl-2 associated agonist cell death  
Bax: Bcl-2-associated X protein  
BCA3: Breast cancer associated 3  
Bcl-2: B-cell lymphoma-2  
Bim: Bcl-2-like 11  
CBP: CREB binding protein  
CDK-4: Cyclin dependant kinase  
Cdkn1b: Cyclin dependant kinase inhibitor  
CEBP/α: CCAAT/enhancer binding protein alpha  
CHOP: C/EBP homologous protein  
cIF2α : Eukaryotic initiation factor 2 alpha  
CREB: CAMP responsive element binding protein  
E2F1: E2F transcription factor 1  
EGFR: Estrogen growth factor receptor  
eNOS: Endothelial nitric oxide synthase  
Epo: Érythropoïétine  
Foxa2: Forkhead box A  
Foxo1 (3a) (4): Forkhead box O 1 (3a) (4)  
GADD45: Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45  
GDH: Glutamate déshydrogénase  
GFAT : Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase  
GLP1: Glucagon like peptide-1  
GLUT2 (4): Glucose transporter 2 (4)  
GPR40: Free fatty acid receptor-1  
GSK3: Glycogen synthase kinase  
GTP: Guanosine triphosphate  
HDAC4: Histone deacetylase 4  
HIC1: Hypermethylated in cancer1  
HIF2α: Hypoxia inducible factor 2-alpha  
HNF4α: Hepatocyte nuclear factor 4-alpha  
HSF1: Heat-shock factor 1  
hsp: Heat-shock protein



HSP: Hexosamine synthesis pathway  
 IAP-2: Apoptosis inhibitor-2  
 IGF-1: Insulin growth factor  
 IKK $\beta$ : Inhibitor kappa kinase  $\beta$   
 IL-1 $\beta$  (6) : Interleukine-1 $\beta$  (6)  
 IMC : Indice de masse corporelle  
 iNOS: Inducible nitric oxide synthase  
 IRS-1 (2): Insulin receptor substrate 1 (2)  
 JNK: Mitogen-activated protein kinase 8  
 KO: Knock-out  
 LXR: Liver X-receptor  
 MAPK: Mitogen activated kinase  
 MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1  
 MEF2: Myocyte enhancing factor 2  
 MnSOD: Superoxide dismutase 2  
 mTOR: Mammalian target of rapamycin  
 Myc: Myelocytomatosis oncogene  
 MyoD: Myogenic differentiation  
 NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide adenosine dinucleotide  
 NCoR: Nuclear receptor co-repressor  
 NEDD8: Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8  
 NF $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B  
 Nmnat : Nicotinamide nucleotide adenylytransferase  
 O-GlcNAc : O- $\beta$ -*N*-acétylglucosamine  
 O-GlcNAcase : O-acétylglucosaminidase  
 OGT: O-acétylglucosamine transférase  
 PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1  
 PARP1: Poly (ADP-ribose) polymerase 1  
 pCAF: p300/CBP-associated factor  
 PDK1: 3-Phosphoinositide dependant protein kinase  
 PDX-1: Pancreatic and duodenal homeobox 1  
 PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferators-activated receptor gamma coactivator 1 alpha  
 PI3k: Phosphatidylinositol 3-kinase  
 PI<sub>3</sub>P: Phosphatidylinositol 3-phosphate  
 PML: Promyelocytic leukemia  
 POZ: Poxvirus and zinc finger  
 PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferators-activated receptor gamma  
 Ptpn1: Protein tyrosine phosphatase non-receptor 1  
 PUGNAc: O-(2-Acétamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino M-phenyl carbanate  
 PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

RE: réticulum endoplasmique  
ROCK-1: Rho-associated kinase 1  
ROS: Reactive oxygen species  
SENP1: SUMO1/sentrin specific peptidase 1  
SIR2: Silent information regulator 2  
SIRT1 (2-3-4-5-6-7): Sirtuine 1 (2-3-4-5-6-7)  
SMRT: Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor  
SOCS: Suppresseur de signalisation des cytokines  
TCF7L2: Transcription factor 7-like 2  
TGF- $\beta$ : Transforming growth factor bêta  
TLE1: Transducin-like enhancer of split-1  
TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha  
TORC2: CREB regulated transcription coactivator 2  
TPR: tétratricopeptidiques  
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling  
UCP1 (2): Uncoupling protein 1 (2)  
UDP: Uridine diphosphate  
VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

## **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## 1. Le diabète de type 2

### 1.1. Obésité et détériorations métaboliques

L'accès facilité à l'alimentation rapide riche en énergie, l'inactivité physique et le vieillissement de la population sont des facteurs qui ont été identifiés pour expliquer l'épidémie actuelle et grandissante d'obésité. L'accumulation d'un excès de masse adipeuse est fortement corrélée avec le développement de pathologies connexes comme la résistance à l'insuline menant parfois au diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, les dysfonctions hépatiques sévères et l'apnée du sommeil. Cependant, ces éléments de détérioration métabolique ne sont pas toujours retrouvés chez les obèses avec résistance à l'insuline. L'utilisation de l'indice de masse corporelle (IMC) est le seul outil employé afin de cibler la population à risque avec de valeurs critiques de plus de  $25 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  pour un surplus de poids et plus de  $30 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  pour l'obésité. La caractérisation du tissu adipeux, qui, au départ, a été décrit comme lieu de stockage des lipides inerte, a changé cette conception. Le tissu adipeux est maintenant reconnu comme un lieu d'entreposage dynamique qui libère une très grande variété d'adipokines [1]. Sa localisation ectopique en périphérie des viscères abdominales et la physiologie des adipocytes retrouvés à cet endroit serait fortement reliées aux effets délétères dans l'apparition des maladies métaboliques reliées à l'obésité [2] [3]. C'est pourquoi l'utilisation combinée de la mesure du tour de taille, qui tient compte de la déposition abdominale de gras, et de l'IMC est actuellement encouragée pour le diagnostic des patients [4]. Ainsi, ce nouvel outil permettra de mieux définir rapidement le profil des individus obèses à risque. La croissance de la population obèse, tant chez les jeunes que les adultes, ne cesse d'augmenter depuis déjà plusieurs années pour atteindre plus de 400 millions d'adultes dans le monde seulement par calcul de l'IMC [5]. Cette tendance est fortement corrélée avec l'accroissement épidémique des cas de diabète de type 2.

## 1.2. Généralités

Les différents types de diabète sont reliés à l'insuffisance pancréatique pour la sécrétion d'insuline. Les cellules endocrines responsables de la production d'insuline se retrouvent à l'intérieur des îlots de Langerhans. Le pancréas est composé d'environ 2% de ces structures et la composition majeure de celles-ci en cellules bêta, qui sécrètent l'insuline, et en cellules alpha, qui sécrètent le glucagon, est variable selon l'organisme étudié [6] [7]. La libération d'insuline en réponse à l'élévation de la glycémie est contrôlée par la métabolisation du glucose via le transporteur facilité de glucose 2 (GLUT2), ce qui favorise l'augmentation de la concentration d'ATP. La dépolarisation de la membrane de la cellule bêta par la fermeture des canaux potassiques est reliée à cette élévation du ratio ATP/ADP. L'augmentation du calcium intracellulaire, générée par l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel électrique, est associée à la libération de l'insuline [8]. C'est pourquoi la perturbation du métabolisme de la cellule bêta pancréatique est reliée au développement de la pathologie du diabète de type 2.

## 1.3. Épidémiologie

La prévalence globale du diabète de type 2 augmente significativement depuis déjà plusieurs années. Une étude montre que les prévisions établies pour l'an 2000 à la fin des années 90 ont sous-évalué la progression de la maladie [9]. Les nouvelles statistiques estiment le nombre d'individus touchés à 171 millions en 2000, ce qui est 11% plus élevé que la prédiction. Ces nouvelles données suggèrent par extrapolation qu'en 2030, le nombre mondial d'individus atteints dépassera les 330 millions [10]. Ces travaux sont basés sur des facteurs démographiques et sont très conservateurs puisque ces prévisions sont calculées en considérant des variables comme l'obésité stable. D'ailleurs, la Fédération Internationale du Diabète prévoit un essor très rapide de la pathologie (Figure 1).

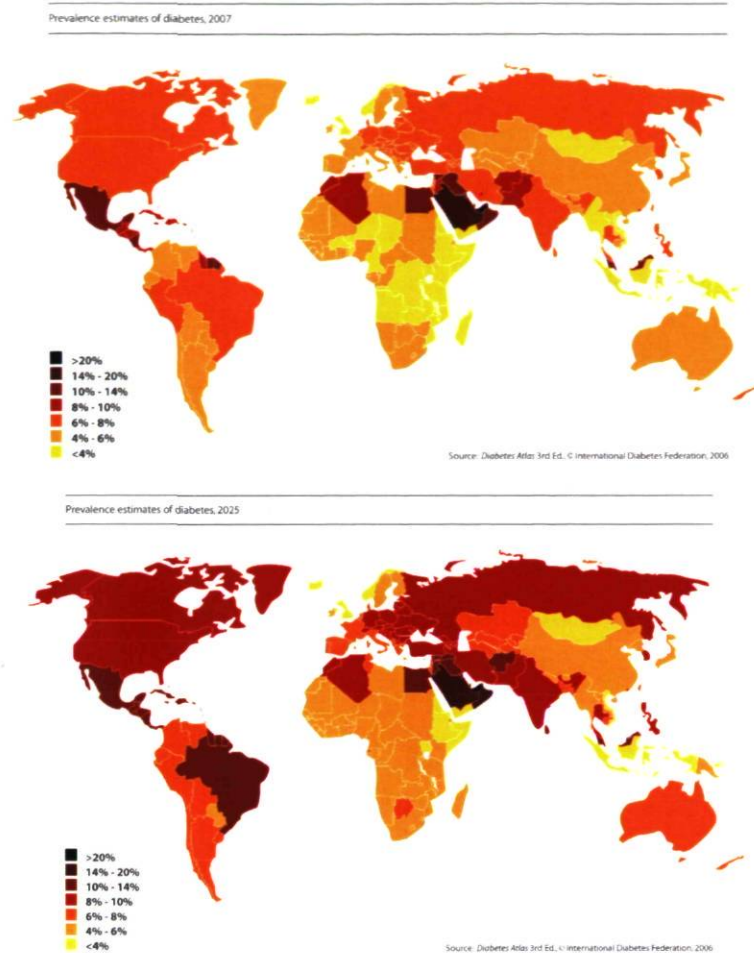


Figure 1 : Prédiction de l'augmentation de la prévalence mondiale du diabète de type 2 entre 2005 et 2025 [11].

#### 1.4. Comparaison avec le Type 1

Le diabète de type 1 est une maladie caractérisée par la destruction auto-immune des cellules bêta du pancréas, qui sont responsables de la sécrétion d'insuline. Ce déséquilibre immunitaire est normalement rencontré en jeune âge, quoique certains cas cliniques montrent une progression plus lente de ce phénomène. Les individus frappés par cette pathologie sont dépendants de l'injection d'insuline, la plupart du temps d'origine naturelle ou recombinante, afin de contrôler leur glycémie à des niveaux normaux. L'évolution rapide du diabète de type I se divise en deux principales étapes. Tout d'abord,

les îlots de cellules bêta pancréatiques sont infiltrés par des lymphocytes T CD4+ auxiliaires et CD8+ activés. Ensuite, les processus de mort cellulaire par le développement d'un état inflammatoire complexe mènent à l'hyperglycémie soutenue [12]. Les modèles mécanistiques d'initiation de l'état inflammatoire sont actuellement encore débattus. Cependant, l'activation de la mort cellulaire est généralement associée à un cercle vicieux d'inflammation locale catalysée par la production synergique de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires et pancréatiques [13].

Contrairement au diabète de type I, l'apparition des symptômes et le développement du diabète de type 2 (Figure 2) s'associent avec l'obésité, le vieillissement et la génétique. Cette maladie est caractérisée par l'élévation prolongée et marquée de la glycémie bien au-dessus de la valeur basale moyenne de 5mM de glucose sanguin. Cette hyperglycémie à jeun, jumelée à la hausse des lipides circulants et des facteurs proinflammatoires, est associé à la dysfonction pancréatique [14]. La synergie de ces facteurs délétères montre que la persistance de cet état chez les individus aux îlots pancréatiques à susceptibilité génétique cause le diabète de type 2. Cet état est caractéristique de l'échec des cellules bêta à répondre à la demande via l'apparition de phénomène d'apoptose [15].

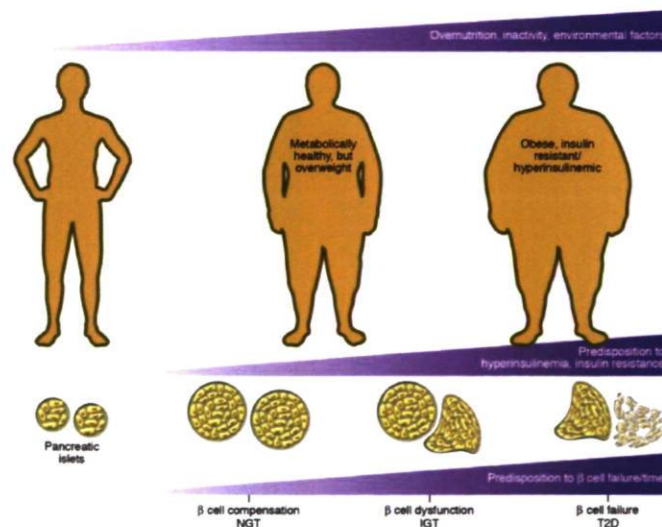


Figure 2 : Évolution parallèle de l'échec de la fonction pancréatique et du diabète de type 2 [16].

### **1.5. Résistance à l'insuline**

L'insuline sécrétée par le pancréas agit de façon centrale et périphérique (muscle, tissu adipeux, foie). La signalisation cellulaire de l'insuline est un processus complexe et finement contrôlé par un vaste réseau de protéines kinases. Le docteur Taniguchi a fort bien résumé les connaissances actuelles sur la cascade de signalisation et ses étapes de contrôle critiques [17]. Brièvement, la liaison de l'insuline à son récepteur provoque l'activation de sa fonction kinase. Le récepteur phosphoryle sur une tyrosine des substrats du récepteur à l'insuline (IRS). C'est à ce moment que, selon le contexte, la transmission du signal se divise : la voie de la PI3K-Akt/PKB pour l'action métabolique de l'insuline ou la voie MAPK pour la différenciation et la croissance cellulaire. Les IRS phosphorylent la PI3K qui catalyse la formation du PIP<sub>3</sub>. Ces messagers lipidiques permettent aux PDK1 d'activer Akt/PKB par la phosphorylation de résidus sérines/thréonines. Le complexe inactive GSK3 et AS160, afin de promouvoir, respectivement, la synthèse du glycogène et la translocation de GLUT4 à la membrane par activation de petites GTPases. L'intégrité du réseau est très sensible à l'action des phosphatases, à la phosphorylation inhibitrice sur des sérines et aux protéines SOCS qui sont tous des éléments favorisés en condition de résistance à l'insuline. L'interrelation connue entre les dépôts ectopiques et le développement d'un état pathologique inflammatoire est grandement étudié dans le contexte de la résistance à l'insuline [18] [19] [20] [21] [22]. Ces effets métaboliques sont des conséquences directes de l'impact du tissu adipeux, à l'échelle systémique [23], dans le développement de la résistance à l'insuline lors de l'instabilité métabolique.

### **1.6. Compensation de la cellule bêta pancréatique**

La perte de sensibilité à l'insuline de certains tissus est associée à l'augmentation de la concentration glucidique sanguine. Lorsque couplé à des surcharges nutritionnelles importantes rencontrées chez des individus aux mauvaises habitudes alimentaires, la cellule bêta est contrainte à redoubler d'efforts. Elle est forcée d'augmenter de façon significative la sécrétion d'insuline afin de favoriser le transport actif du glucose par de membres de la famille des récepteurs sensibles à l'hormone comme GLUT4. Pour ce faire, le pancréas



entre en phase de compensation. Cette réponse pour contrer la résistance à l'insuline est gouvernée en partie par une modulation dynamique des processus métaboliques, de prolifération et de survie cellulaire des îlots pancréatiques.

La majorité des études sur la compensation des cellules bêta par augmentation de la masse suggère l'implication majeure de la prolifération dans ce processus [24] [25]. Cependant, une étude de Butler et ses collaborateurs montre que la néogénèse est aussi impliquée dans l'accroissement de la masse des îlots. La néogénèse des cellules bêta des obèses normoglycémiques, exposées à des concentrations lipidiques élevées, augmente dans des pancréas humains alors qu'une régression de 50% est constatée chez les hyperglycémiques et les diabétiques [15]. Par contre, ce sujet est actuellement grandement controversé.

La prolifération de la cellule bêta est en partie dépendante du glucose. Les récents travaux montrent que l'exposition directe à des concentrations aiguës de glucose et l'hyperinsulinémie conséquente sont responsables de l'expansion cellulaire. Plusieurs études démontrent que la perturbation de la signalisation par délétion des récepteurs à l'insuline spécifiques à la cellule bêta occasionne des phénotypes différents. La réduction de la signalisation pour la souris résistante à l'insuline  $\beta$ IRKO est associée à une diminution de la masse des cellules ciblées dans le modèle transgénique, même en absence d'hyperglycémie [26]. L'absence de stimulation de la cascade de l'insuline par l'IGF-1, pour le même type de modèle murin, ne perturbe pas l'hyperplasie des îlots pancréatiques, mais plutôt la capacité de la cellule bêta à sécréter l'insuline [27]. Ainsi, l'activation spécifique de la voie Foxo1-Pdx-1 par la liaison de l'insuline à son récepteur est grandement impliquée dans l'accroissement de la masse de cellules bêta par prolifération en situation catalysée de résistance à l'insuline au foie ou par l'administration d'une diète riche en lipide [28].

L'altération génétique en aval du récepteur permet aussi d'identifier l'implication de cette voie signalétique dans le contrôle de la masse cellulaire. La perte d'interaction

spécifique d'IRS-2 à son récepteur par délétion [29] et l'absence de phosphorylation d'Akt dépendante de PDK-1 [30] génèrent des modèles *in vivo* de souris caractérisés par une diminution marquée de la compensation par faible densité de cellules bêta pancréatiques. Un mécanisme associé à un effecteur de la cascade à l'insuline, Foxo1, est rattaché à l'expansion des îlots du pancréas. L'activité kinase d'Akt-PKB dépendante de l'insuline est responsable de la séquestration de Foxo1 au cytoplasme, qui favorise l'expression et de PDX-1. En situation de résistance à l'insuline *in vivo* par délétion d'IRS-2, la désorganisation des îlots pancréatiques est causée par la translocation de Foxo1. Cet étude montre que la combinaison avec un génotype Foxo1<sup>+/-</sup> permet de rétablir une densité et une masse de cellules bêta semblables au contrôle. Le mécanisme suggéré est déterminé par l'alternance de liaison physique répressive de Foxo1 et activatrice de Foxa2 de la transcription du régulateur de prolifération PDX-1 [31].

L'exposition directe au glucose montre aussi son propre rôle dans les processus de prolifération cellulaire. L'utilisation d'une souris génétiquement modifiée pour la glucokinase (GK<sup>+/-</sup>) conduit à l'absence d'accroissement de la population de cellules bêta dans les îlots en condition de diète riche en lipides [32]. De plus, une autre étude a préalablement démontré que l'infusion de glucose chez la souris durant 4 jours est couplée à une augmentation combinée de 80% de la masse et de 98% de la prolifération des cellules bêta [33].

D'autres processus de contrôle de la prolifération sont aussi identifiés par l'utilisation des animaux transgéniques. La dynamique de transition lors de la réplication cellulaire par les cyclines est contrôlée par des kinases. Une étude de suractivation de la cycline kinase 4 (CDK4) spécifique pour la cellule bêta montre une augmentation marquée de la prolifération tout en conservant une nature non-tumorale [34]. Les travaux plus récents permettent de confirmer le rôle important de cette enzyme dans le processus de prolifération de la cellule bêta. En utilisant des modèles *in vivo* diabétiques et en supprimant l'expression de l'inhibiteur de CDK4, Cdkn1b, Uchida et ses collaborateurs constatent une prolifération accrue et une augmentation de la masse des îlots pancréatiques [35]. De plus, la stabilité de cet inhibiteur est limitée par sa complexification avec le facteur

Spk2, qui coordonne sa dégradation par le protéasome par ubiquitination. Lors de la répression de ce facteur chez un modèle nourri avec une diète riche en lipides, la prolifération et la masse des cellules bêta sont fortement limitées par inhibition massive de CDK4 par Cdkn1b [36]. Finalement, la perturbation par délétion spécifique à la cellule bêta de certains facteurs de transcription comme HNF4 $\alpha$  [37] est rattachée à l'absence d'hyperplasie nécessaire pour compenser la résistance à l'insuline transitoire rencontrée chez les souris femelles en gestation. C'est aussi ce qui est constaté pour PPAR $\gamma$  *in vivo* en surcharge lipidique par accumulation probable dans les îlots [38].

Néanmoins, l'exposition modérée aux lipides est associée à la compensation des cellules bêta au début de la résistance à l'insuline. La même étude de Steil pour le glucose a employé une exposition similaire aux lipides qui mène à des augmentations respectives des 125 et 54% pour la prolifération et l'expansion de la masse des cellules bêta [33]. De plus, chez un modèle canin à alimentation essentiellement lipidique, une équipe note, contrairement au glucose des élévations concertées d'environ 2,5 fois de l'expression du récepteur au *glucagon like peptide 1* (GLP-1) au pancréas et des concentrations sériques de GLP-1 [39]. Cette incrétine, sécrétée par les cellules L de l'intestin, est utilisée par les cellules bêta pour promouvoir sa survie, sa prolifération et sa fonction via une stimulation synergique de la cascade de signalisation de l'insuline et des cibles Foxo1/Pdx-1 via une action sur l'EGFR [40]. Un modèle *in vivo* KO pour Pdx-1 dans la cellule bêta montre d'ailleurs l'incapacité de l'exendin-4, un analogue synthétique de GLP-1 d'activer les processus de production et de sécrétion d'insuline requis [41]. L'activation du récepteur GPR40, fortement exprimé dans les cellules bêta, par des acides gras a été identifiée comme voie de stimulation complémentaire de l'insuline. L'effet globale est régit par une accentuation de la sécrétion d'insuline par implication du calcium [42]. Enfin, la communication directe entre les facteurs endocriniens lipidiques et le pancréas est démontré. En plus de son action centrale neuroendocrinienne, la leptine peut contrôler les fonctions de sécrétion et de production d'insuline via la présence de son récepteur sur les cellules bêta *in vitro* [43]. Ces interactions systémiques permettent un contrôle juste et précis de la fonction pancréatique qui est grandement influencé par son environnement composé de multiples innervations comme pour l'axe hépatique-cerveau-pancréas [44]. La

présence de récepteurs pour les protéines de transduction du signal Wnt montre également que l'activation de cette voie de signalisation est impliquée dans la prolifération [45] et la fonction de la cellule bêta [46].

### 1.7. Initiation et progression de la dysfonction pancréatique

L'exposition prolongée à des charges nutritionnelles élevées, en conditions de détérioration métabolique associée à l'obésité, est jumelée avec les prédispositions génétiques dans l'induction de la dysfonction pancréatique qui conduit au diabète de type 2. Il est aussi à noter que la perte de l'intégrité des mécanismes de compensation présentés est reliée à l'initiation des processus d'échec pancréatique. Alors, la détérioration de la fonction pancréatique s'enclenche lorsque le processus de compensation ne suffit plus.

L'identification de différents polymorphismes sur des gènes impliqués dans le métabolisme des tissus sensibles à l'action de l'insuline, incluant la cellule bêta, permet de cibler un profil génétique qui serait susceptible de développer le diabète de type 2. Les récentes collaborations pour les études couvrant tout le génome permettent d'identifier plusieurs loci génétiques, en lien avec la fonction de la cellule bêta, qui confèrent un risque additionnel de rendre insuffisante la compensation du pancréas [47]. Ces découvertes renforcent aussi le concept d'un réseau polygénique à la base de la maladie. Deux gènes présentent des polymorphismes plus courants : *KCNJ11* et le *transcription factor 7-like2* *TCF7L2*. Le premier gène est associé à l'expression d'une composante (Kir6.2) d'un canal potassique couplé à la synthèse de l'ATP. Une vaste étude d'association confirme que le polymorphisme sur le résidu aminé 23 est relié au développement du diabète de type 2 [48]. Pour *TCF7L2*, une étude de plusieurs populations montre que la présence fréquente du polymorphisme, chez des individus homo ou hétérozygotes, est rattachée respectivement à un risque accru de développer le diabète de type 2 [49]. Une récente étude propose un rôle d'un polymorphisme de *TCF7L2* dans le métabolisme de sécrétion d'insuline et de son action périphérique [50]. Des données *in vitro* d'atténuation et de surexpression sur des îlots humains ont montré respectivement une réduction de la

survie et de la prolifération des cellules bêta et une résistance accrue de ces mêmes cellules à la suite d'une exposition à des facteurs diabétogènes [51].

La forte demande métabolique, engendrée par les taux élevés d'acides gras et de glucose circulants, est reliée à l'activité accrue de la mitochondrie. La production de dérivés actifs oxygénés (ROS) est corrélée avec la hausse du gradient de la mitochondrie ce qui demande l'intervention de la protéine UCP2. Cet état cellulaire est protecteur pour la cellule bêta, qui exprime les enzymes de détoxification des ROS en faible quantité, mais est contrebalancé par la diminution de sa fonction dans la sécrétion de l'insuline par utilisation d'ATP [52]. Une étude démontre également que la surexpression de la glutathione peroxidase permet de réduire le stress oxydatif normalement retrouvé dans les cellules bêta pancréatiques des sujets diabétiques [53]. Ainsi, les ROS sont appelés à jouer un rôle d'initiation et d'accentuation de la dysfonction pancréatique.

La synergie néfaste de l'inactivité physique et de l'excès calorique, fréquemment rencontrée dans la population obèse, est soulevée pour expliquer la détérioration métabolique associée à la glucolipotoxicité. Le rôle de la charge d'acides gras libres qui favorise le processus compensation, est muté en élément perturbateur de la réponse à l'insuline en corrélation avec l'apparition de l'hyperglycémie [54]. Prentki et ses collaborateurs ont démontré que l'exposition simultanée des cellules bêta de rats et humaines à des concentrations croissantes de glucose et d'acides gras saturés augmente significativement la mort par apoptose [55]. Le traitement avec le peptide GLP-1 synthétique permet de limiter l'amplitude des processus apoptotique en présence de palmitate et glucose via la promotion de gène de survie comme Bcl-2 et IAP-2 [56]. Une autre étude montre aussi l'effet délétère du palmitate, combiné à l'hyperglycémie, par la production de céramides qui active l'apoptose par la voie de la mitochondrie. Ces effets ne sont pas observés avec l'utilisation d'acides gras mono-insaturés qui sont moins sensibles à la métabolisation qui est associée à la production de céramides [57]. Finalement, ces observations sont aussi répertoriées pour des traitements avec des acides gras seulement [58].

Les concentrations toxiques de lipides et de glucides, retrouvées chez les individus hyperglycémiques, sont associées à l'enclenchement des processus apoptotiques. L'implication de plusieurs voies est identifiée et est dépendante du stimulus présent. Une étude constate que l'activation de la voie des caspases est rencontrée lors d'un déséquilibre de l'homéostasie à l'extérieur de la cellule. En supprimant la caspase 8, la tolérance au glucose est favorisée par l'augmentation de la survie des cellules bêta chez la souris nourrie avec une diète riche en lipides sans changement de prolifération [59]. De plus, une surcharge de glucose sur la cellule bêta pancréatique entraîne la production autocrine de la cytokine proinflammatoire *interleukine-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), qui, captée par la cellule, active les cascades apoptotiques dépendantes de NF $\kappa$ B [60]. La production de cette cytokine est aussi observée dans cette étude pour dans des pancréas diabétiques. Le même type de mécanisme est confirmé en inhibant le récepteur IL-1. Ce blocage empêche l'induction de la mort cellulaire par exposition à une surcharge gluco-lipidique [61]. Une récente étude propose un rôle majeur et pivotale du facteur proapoptotique situé au carrefour des voies de réponses métaboliques aux facteurs extracellulaires et de la promotion de la mort cellulaire par implication de la mitochondrie. Danial et ses collaborateurs ont découvert que la suppression de Bad est caractérisée par une amélioration quantitative marquée de l'organisation de la masse des cellules bêta en comparant les animaux nourris sous une diète riche en lipides. Cet effet est probablement relié à la diminution de la susceptibilité des îlots à l'apoptose, mais est aussi associé à la promotion de la compensation par l'amélioration de la fonction de la cellule bêta par localisation optimale de la glucokinase par interaction physique de Bad phosphorylé [62].

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) est provoqué par un déséquilibre important entre dans la maturation protéique en situation de forte demande comme la résistance à l'insuline prolongée. Il est démontré que l'accumulation de la protéine Chop, un marqueur important du stress du RE, est associée à l'apoptose des cellules bêta pancréatiques chez des patients atteints de diabète de type 2 [63]. Les stratégies développées pour contrer ce type d'évènement permettent de mieux comprendre l'impact de ce mécanisme de stress apoptotique. L'utilisation de l'analogue synthétique de GLP-1 chez des animaux diabétiques provoque la diminution du stress exercé sur le RE via

l'implication d'ATF4 [64]. De plus, la dissipation de cette surcharge est aussi influencée par eIF2 $\alpha$  qui assure l'action centrale de surveillance de l'accumulation des protéines à mauvaises conformations. Le groupe de Kaufman a identifié que la délétion de ce facteur [65] favorise l'apparition du diabète de type 2 chez des animaux en compensation par exposition lipidique, possiblement sous l'action délétère de Chop [66]. L'accumulation de plaque amyloïdique, comme pour la neurodégénération, est un processus qui montre une association étroite avec l'apoptose engendrée par le stress du RE [63]. Même si ce sujet est controversé, il est intéressant de noter que l'utilisation de la rosiglitazone, un ligand antidiabétique de PPAR $\gamma$ , prévient l'apoptose dépendante des fibres d'amyloïde sur les cellules bêta [67].

En résumé, plus de 90% des diabétiques sont atteints du diabète de type 2. Au cours du développement de la maladie, ces individus vivent une phase de compensation qui protège les tissus des conséquences délétères de la résistance à l'insuline. La perte de ce processus, par exposition prolongée à des surcharges métaboliques, rend la cellule bêta pancréatique vulnérable à des événements d'apoptose pathologique, qui accentue l'état d'hyperglycémie et mène au diabète de type 2 franc.

## 2. Glycosylation protéique

### 2.1. Historique

Le processus de glycosylation protéique par liaison en O- $\beta$ -N-acétylglucosamine (O-GlcNAc) a été pour la première fois clairement identifié il y a maintenant plus de vingt-cinq ans [68]. Cette découverte élargit la vision réductrice de la glycosylation protéique comme simple étiquette moléculaire permettant la distribution extracellulaire et la constitution des matrices membranaires. Les premiers indices permettant d'observer ce type de modification post-traductionnelle sont obtenus par l'identification de protéines de pores nucléaires, les nucléoporines, qui présentent une organisation structurale avec des motifs aminés fortement glycosylés (Holt GD, JBC, 1986). L'implication directe de ces modifications dans le transport nucléaire n'est pas confirmée, mais cette découverte suscite l'engouement pour l'O-GlcNAc, ce qui engendre la découverte depuis ce temps de plus de 500 protéines modifiées par O-GlcNAc chez les mammifères [69]. Ces différents facteurs sont impliqués dans tous les réseaux de signalisation et les composantes structurales de la cellule (Figure 3).

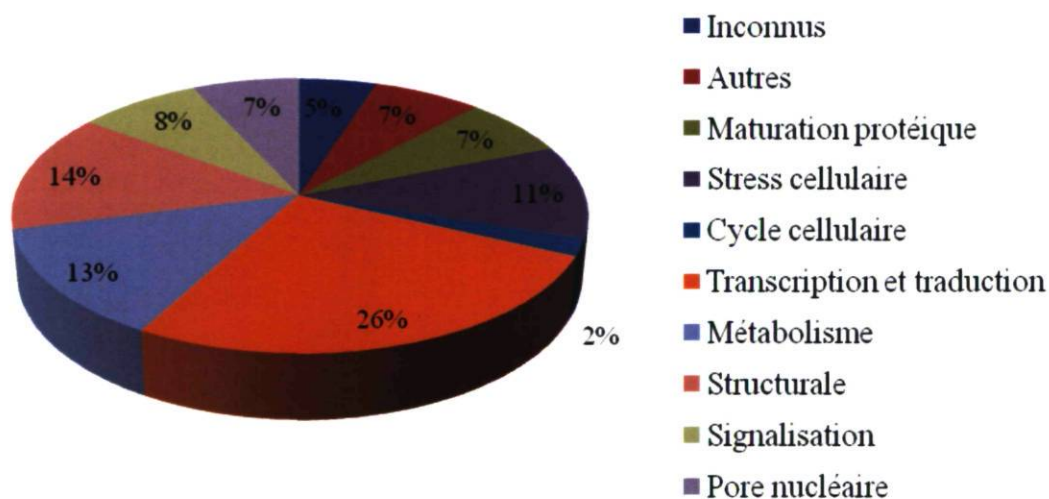


Figure 3 : Protéome des facteurs présentant une modification O-GlcNAc. Les substrats connus sont regroupés selon leur fonction respective. La plupart des facteurs identifiés sont



impliqués dans la régulation génique. Cette observation peut représenter un biais par le fort intérêt de l'étude des facteurs de transcription et des protéines de régulation cellulaire [69].

Ce type de modification est fréquemment rencontré, mais l'absence de charge nette, l'action très rapide des hydrolases cellulaires et l'absence d'une séquence consensus à haut degré de conservation ont retardé l'identification des protéines qui sont glycosylées de façon transitoire [70]. Heureusement, l'amélioration des stratégies méthodologiques (anticorps spécifiques) et analytiques (spectrométrie de masse) a favorisé grandement l'étude de protéines sujettes à une modification O-GlcNAc et permet maintenant de conceptualiser le mécanisme d'O-GlcNAc.

## **2.2. Dynamique des modifications O-GlcNAc**

Le processus d'O-GlcNAc ne peut être regroupé avec la glycosylation classique en raison des nombreuses divergences observées entre ces 2 modifications. Cette dernière est surtout retrouvée au niveau des organelles de transport protéique et à l'intérieur de la membrane extracellulaire tandis que l'O-GlcNAc est identifiée sur une grande variété de protéines cytoplasmiques et nucléaires. Ces modifications sont parfois rencontrées sur plusieurs résidus aminés d'une même protéine, mais, contrairement à la glycosylation classique, le même acide aminé n'est pas glycosylé en série lorsqu'il est déjà modifié. Toutefois, c'est la nature dynamique de l'O-GlcNAc qui le sépare du processus de glycosylation traditionnelle. Les protéines membranaires sont modifiées en permanence par oligo-glycosylation alors que l'O-GlcNAc est régulée de façon analogue à la phosphorylation [70]. L'O-GlcNAc s'effectue par la liaison de l'hexosamine sur un groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine (Figure 4). La dynamique de cette modification est contrôlée par des activités enzymatiques.

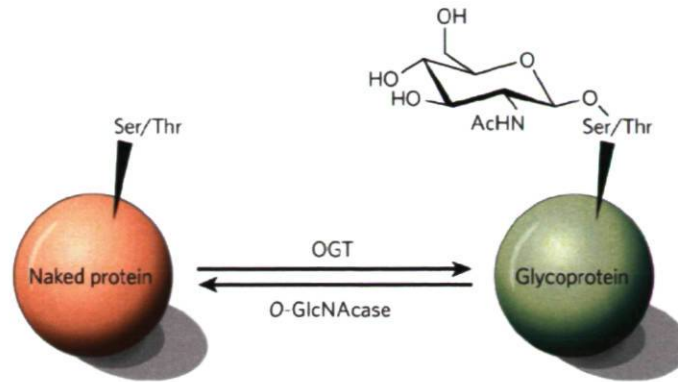


Figure 4 : Le cycle d'O-GlcNAc sur sérine/thréonine des protéines nucléaires ou cytoplasmiques est contrôlé par les deux enzymes fortement conservées OGT et O-GlcNAcase Ce processus est similaire en cinétique au processus de phosphorylation en réponses à certains états métaboliques [70].

Sous un état glycosylé, l'activité et les interactions avec des partenaires protéiques peuvent être perturbées. Certains résidus thréonines ou sérines sont ciblés à la fois par des événements de phosphorylation et de glycosylation. Les modifications alternatives entre ces processus sont notamment identifiées chez l'oncogène Myc pour la thréonine 58 [71]. L'état phosphorylé catalysé par la kinase de la synthèse de glycogène (GSK3) se caractérise par une activité transcriptionnelle accrue du facteur oncogénique, qui est perdue lors de la glycosylation compétitive [72]. Par contre, la compétition entre résidus adjacents est aussi rencontrée. C'est ce qui est observé pour le suppresseur de tumeur p53. Par exemple, des chercheurs ont montré que la sérine 149 sous un état glycosylé inhibe la phosphorylation sur la thréonine 155, probablement via un changement conformationnel ou une altération stérique. Cette dynamique montre aussi la diminution de la liaison d'ubiquitine qui entraîne p53 vers la dégradation [73]. La sérine 1177 de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS), qui est phosphorylé par Akt, est aussi ciblée par une alternance compétitive directe ou indirecte entre l'O-GlcNAc et la phosphorylation puisque le site de glycosylation n'est pas identifié avec précision [74]. Ces modifications d'O-GlcNAc, qui sont en interrelation avec celle de phosphorylation, doivent être contrôlées par un système enzymatique qui permet un contrôle cinétique précis.

### 2.3. Activité et composantes de la voie des hexosamines

La voie de signalisation des hexosamines (HSP) a été identifiée pour la première fois dans les années 50-60. Ce sentier métabolique est défini comme un senseur de la biodisponibilité des nutriments pour la fonction cellulaire. Les récents travaux sur l'HSP permettent de suggérer son implication majeure et coordonnée avec les voies de la kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK) et de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR). Ce consortium métabolique assure la régulation de l'homéostasie énergétique systémique [75]. Une récente étude démontre d'ailleurs que la phosphorylation sur la sérine 243 d'une enzyme clé de l'HSP, la glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT), est contrôlée par l'AMPK [76].

D'un point de vue cellulaire, 2 à 3% de l'utilisation du glucose est utilisé par l'HSP selon les types cellulaires en conditions métaboliques normales [77]. En surcharge nutritionnelle, cette voie peut être suractivée par l'action inhibitrice des acides gras libres sur la glycolyse [78] et par la suppression du stockage de glycogène. Le produit ultime de cette voie est l'uridine diphosphate (UDP)-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc), qui est le substrat utilisé pour les réactions de glycosylation. Ce métabolite est composé d'un nucléotide, de liaisons phosphates à haute teneur énergétique et de trois dérivés métaboliques (glucidique, aminé, lipidique), ce qui lui confère une structure complète comme senseur d'énergie [79].

La voie HSP est soumise à un contrôle enzymatique par la GFAT. La métabolisation du glucose par voie HSP est principalement limitée par l'action de cette enzyme cytoplasmique qui transfère un groupement aminé à partir de la L-glutamine sur fructose-6-phosphate. Les excès nutritionnels sont, cette fois, visés dans l'augmentation de l'activité de GFAT par l'élévation des niveaux de résidus aminés circulants. La voie peut être suractivée par l'hyperglycémie ou par l'exposition directe à la glucosamine, un puissant agoniste à usage controversé dans le traitement de l'ostéoarthrite [80] [81]. La glucosamine est phosphorylée, au coût d'une molécule d'ATP, par l'hexokinase et contourne l'étape de la GFAT [82]. L'acétylation et l'addition d'UDP sont respectivement

catalysés sur la glucosamine-6-phosphate. L'UDP-GlcNAc formé est alors utilisé pour la glycosylation classique ou par l'O-acétylglucosamine transférase (OGT), qui l'utilise comme substrat pour les modifications post-traductionnelles sur des sérines/thréonines clés de facteurs protéiques. Finalement, l'O-acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase), qui enlève le groupement, s'exprime en parallèle à l'OGT afin de maintenir la balance des protéines glycosylées.

### **2.3.1. GFAT**

La GFAT est impliquée dans l'effet négatif d'une surcharge nutritionnelle, mais ce rôle est encore controversé. Les premières études de surexpression chez la souris, par le groupe de McClain, permettent d'observer de la résistance à l'insuline dans les tissus adipeux et musculaires [83]. Cet effet serait attribuable à la perturbation de la localisation de GLUT4 à la membrane ou de son transport vésiculaire [84]. Les travaux sur l'inhibition de l'enzyme montrent aussi son implication dans la pathologie en diminuant la résistance à l'insuline pour des adipocytes primaires [85]. Cependant, des cellules musculaires en culture, provenant de souris surexprimant la GFAT, ne présentent pas un profil de résistance à l'insuline. La surexpression ciblée de l'enzyme dans les adipocytes *in vivo* permet de montrer un phénotype d'insulinorésistance. Cet effet est engendré par la diminution drastique des taux d'adiponectine [86]. De plus, la rétro-inhibition de la GFAT exercée par l'élévation de la concentration d'UDP-GlcNAc soulève aussi certains doutes dans l'implication déterminante de cette enzyme dans la pathologie du diabète de type 2. Néanmoins, une étude *in vivo* de surexpression de l'enzyme dans les cellules bêta pancréatiques de souris a produit des animaux résistants à l'insuline en périphérie, ce qui montre tout de même l'implication de l'HSP dans la pathologie [87].

### 2.3.2 OGT

Cette enzyme de la voie HSP est constituée de trois domaines principaux. La partie C-terminale est composée des motifs catalytiques qui assurent l'activité enzymatique d'OGT. Ce domaine est formé de plis Rossmann qui favorisent, grâce à des résidus spécifiques, la liaison de l'UDP-GlcNAc [88]. À l'opposé, la section N-terminale est constituée de 3 à 16 répétitions tétratricopeptidiques (TPR). Ces structures seraient impliquées dans la spécificité de l'action de l'enzyme dans les processus de contrôle transcriptionnel et de signalisation cellulaire par glycosylation. Cette région protéique est également étudiée dans la dynamique de l'interaction avec les substrats protéiques [89]. Malgré sa localisation à environ 80% nucléaire, cette enzyme est aussi rencontrée dans le cytoplasme. Un des deux autres isoformes, comptant moins de TPR, ont été découverts pour la mitochondrie. La structure en trois dimensions de l'enzyme révèle que le domaine à régions riches en TPR est très similaire à celui des importines [90]. Les domaines ci-haut sont reliés par un domaine de très grande variabilité en longueur et composition selon les espèces. La structure fonctionnelle d'OGT est entraînée par l'homodimérisation de ces domaines TPR. Cette structure flexible permet des interactions permissives et une grande adaptabilité pour les cibles protéiques à structures variables.

L'importance vitale de la glycosylation protéique par OGT est démontrée par des essais de délétion dans des cellules embryonnaires. Cette intervention montre un phénotype de non viabilité, ce qui suggère un rôle majeur dans le développement [91]. En considérant l'implication centrale de cette enzyme dans les processus d'O-GlcNAc et glycosylation classique, ces conclusions sont logiques. La fonction d'OGT est souvent reliée à la cascade de signalisation de l'insuline. Le stade *dauer* retrouvé chez *C. elegans* se caractérise par une dormance avec stockage préalable de nutriments qui est déclenché lors de conditions non favorables à la croissance. L'utilisation d'un modèle de vers avec délétion pour *daf-2* (un isoforme du récepteur à l'insuline) est caractérisée par l'entrée constitutive en stade *dauer* par inhibition de la cascade de signalisation de l'insuline. Cependant, lors d'un croisement avec un mutant *ogt-1* viable, le vers n'est plus susceptible d'entrer en *dauer*, ce qui montre l'importance d'OGT dans la cascade de signalisation [92]. Une étude de

surexpression *in vivo* d'OGT sur le muscle et le tissu adipeux montre le développement d'un phénotype similaire au diabète de type 2, et ce, même sous faible surexpression. Cette dernière génère des organismes présentant de l'hyperleptinémie et de la résistance à l'insuline [93].

Une récente étude a permis d'identifier un nouveau domaine de liaison d'OGT à la membrane plasmique via une molécule de PI<sub>3</sub>P. Cette découverte permet de mieux comprendre le rôle d'OGT en localisation cytoplasmique. Cet ancrage d'OGT, par translocation induite par l'insuline, provoque la perturbation de la signalisation de l'insuline en conditions de surcharge nutritionnelle. Cette inhibition du signal dans les adipocytes est caractérisée par la phosphorylation inhibitrice sur sérines d'IRS-1 et de l'inactivation d'Akt [94]. Cet étude supporte grandement les résultats déjà connus sur l'interaction qu'OGT a pour la protéine phosphatase 1 qui permettrait d'assurer un contrôle précis dans les balances entre glycosylation et phosphorylation [95] [96].

### 2.3.3 O-GlcNAcase

Contrairement à OGT, l'O-GlcNAcase se divise à 80% dans le cytoplasme et 20% au noyau [97]. Cette enzyme bifonctionnelle, qui lors du clivage par le médiateur apoptotique caspase-3, est composée de deux domaines fonctionnels à activités catalytiques. La partie N-terminale est caractérisée par l'activité glycosidase envers les protéines O-GlcNAc, tandis que la fraction C-terminale est associée à l'activité acétylase de l'enzyme [98]. Ces deux activités pourraient être impliquées dans la répression transcriptionnelle en réduisant la glycosylation de certains facteurs de transcription tout en acétylant les histones.

Le gène humain de l'O-GlcNAcase, MGEA5, est identifié comme un des locus de susceptibilité pour le diabète de type 2. Les analyses de polymorphismes chez un échantillon de la population mexicaine-américaine montre la présence codon stop à l'intérieur d'une région intronique. Cette anomalie est associée à une augmentation de 25%

de l'incidence pour le développement du diabète de type 2 dans cette population [99]. Par contre, une étude sur les indiens Pima, qui ont une forte susceptibilité génétique pour le diabète de type 2 [100], ne peut identifier de polymorphismes dans les régions exoniques [101].

Ces considérations génétiques métaboliques poussent la recherche à vérifier l'implication de l'O-GlcNAcase dans la signalisation à l'insuline. La délétion d'*oga-1*, l'homologue d'O-GlcNAcase chez *C. elegans*, est associée avec l'augmentation du phénotype larvaire mimant la perturbation de la cascade de signalisation à l'insuline [102]. De plus, l'augmentation de protéines glycosylées par inhibition de l'O-GlcNAcase en utilisant l'inhibiteur PUGNAc est associé à la perturbation du transport du glucose dans le muscle squelettique [103].

#### **2.4. Impact métabolique**

En plus des éléments mentionnés ci-dessus qui touchent les enzymes de l'HSP, différentes études ont permis de découvrir de multiples implications de l'activation de cette voie dans le contrôle des processus cellulaires et dans l'étiologie de pathologies (Figure 5).

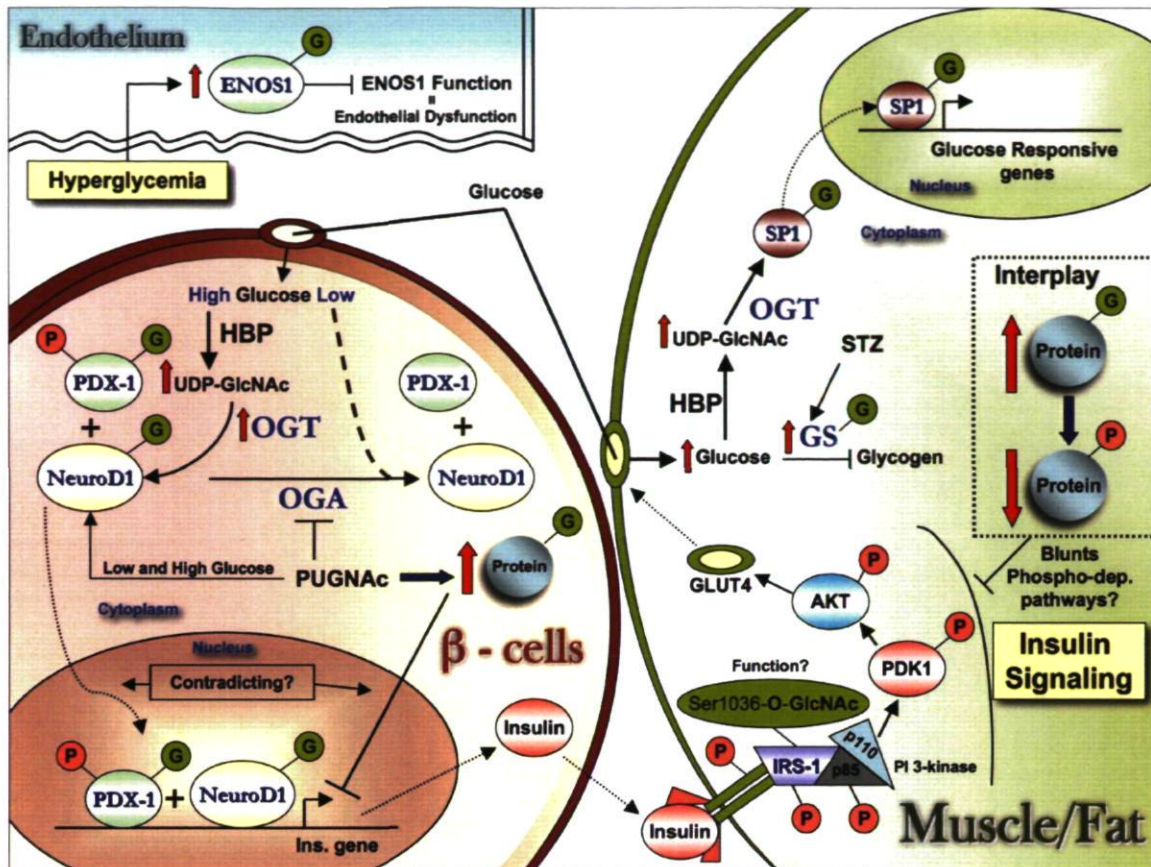


Figure 5 : Les protéines O-GlcNAc sont directement impliquées dans les événements de transcription et de signalisation impliquant le glucose [104].

## 2.4.1. Résistance à l'insuline et diabète de type 2

### 2.4.1.1. Cascade de signalisation à l'insuline

Plusieurs études montrent l'impact de l'augmentation de la glycosylation protéique dans la perturbation de la voie de l'insuline. Ces travaux sont essentiellement effectués pour le muscle, le tissu adipeux et le foie. Cependant, la variabilité entre les modèles utilisés semble donner des conclusions qui sont quelques fois contradictoires.

L'utilisation de la glucosamine, couplée à l'insuline active la voie HSP et permet d'augmenter les niveaux de glycosylation protéique dans le muscle de rats. Les animaux



ainsi traités sont caractérisés par une résistance à l'insuline systémique qui serait en partie générée par l'inhibition de la phosphorylation des tyrosines au profit de la glycosylation des IRS [105]. D'autres études montrent aussi la perturbation de la voie de signalisation de l'insuline par la hausse des produits glycosylés en employant le PUGNAC sur les adipocytes [106] et dans des cellules endothéliales coronariennes en conditions hyperglycémiantes [107]. La sérine 1036 est identifiée *in vitro* comme site de glycosylation en utilisant les deux techniques d'activation de la voie HSP employés dans les deux dernières études. À première vue, sa localisation n'est pas susceptible de perturber les sites de phosphorylation majeurs d'IRS-1, mais l'analyse tridimensionnelle de l'organisation des résidus aminés serait à considérer [108]. Par contre, une étude montre que la surexpression de l'O-GlcNAcase et l'atténuation d'OGT ne peuvent renverser le phénotype d'insulinorésistance dans des adipocytes soumis à une forte concentration de glucose. La phosphorylation catalytique sur la sérine 473 d'Akt n'est pas altérée dans ce modèle [109].

L'expression protéique de GLUT4 n'est pas modifiée lors de l'exposition à la glucosamine ou à de fortes concentrations de glucose malgré l'altération du signal en aval du récepteur de l'insuline [110]. La translocation membranaire du récepteur est contrôlée par plusieurs facteurs protéiques comme la protéine Munc-18, qui elle est impliquée dans le processus de fusion membranaire par contact. L'exposition d'adipocytes à la glucosamine entraîne la glycosylation de ce facteur, ce qui pourrait perturber son activité régulatrice [111].

La découverte de la dynamique de translocation et d'activation d'OGT par l'insuline permet d'établir un mode d'action de l'enzyme précis *in vivo*. La surexpression virale d'OGT et d'un isoforme ne pouvant se lier au PI<sub>3</sub>P permet d'évaluer l'impact métabolique de son rôle dans l'arrêt de la signalisation à l'insuline hépatique. La capacité de l'insuline d'inhiber la production de glucose hépatique est perturbée chez le modèle de surexpression d'OGT. Cette limitation est caractérisée par l'augmentation de la transcription des gènes de néoglucogénèse et la diminution des gènes glycolytiques, ce qui favorise la glucotoxicité. Le mutant ne montre aucune de ces modifications ce qui montre l'impact de la localisation membranaire d'OGT dans la résistance à l'insuline [94].

#### 2.4.1.2. Dysfonction et apoptose de la cellule bêta pancréatique

Ces processus centraux dans l'étiologie du diabète de type 2 sont, en partie, catalysés par l'O-GlcNAc. Une étude, qui n'implique pas la cellule bêta, montre que l'inhibition de l'enzyme Emeg32 de la voie HSP chez la souris prévient l'inactivation d'Akt. Ainsi, le rôle anti-apoptotique d'Akt est préservé [112].

Différentes études montrent que le processus de glycosylation protéique serait impliqué dans l'apoptose des cellules bêta. L'utilisation de la streptozotocine, un analogue de O-GlcNAc impliqué dans la nécrose des cellules du pancréas, entraîne l'augmentation de l'apoptose dans les cellules bêta [113] [114]. Cependant, ce composé possède des propriétés alkylantes qui peuvent entraîner des dommages à l'ADN. Malgré la diminution de l'apoptose entraînée par l'utilisation de PUGNAc, la glycosylation et la perte de l'intégrité génomique pourraient agir en synergie pour accélérer les événements apoptotiques. De plus, la surexpression de GFAT et le traitement avec la glucosamine chez le rat entraînent la dysfonction des cellules bêta. La diminution marquée de l'expression génique de la glucokinase, de GLUT2 et de l'insuline, jumelée à la diminution de l'activité transcriptionnelle de PDX-1, est favorisée par la hausse du stress oxydatif cellulaire [115].

Chez le rat Goto-Kakizaki, un modèle diabétique non-obèse, l'activité d'OGT et la concentration de protéines glycosylées est fortement augmentée dans les îlots pancréatiques. La diminution de la sécrétion d'insuline chez ces animaux est aggravée par l'inactivation du PUGNAc [116]. Finalement, une élégante étude *in vitro* avec des îlots fraîchement isolés et des cellules Rin-m5f démontre que l'élévation des protéines O-GlcNAc par des traitements de glucose/glucosamine augmente l'apoptose des cellules bêta. La glycosylation de composantes de la signalisation de l'insuline empêche la phosphorylation de Foxo1. Cet état entraîne l'augmentation de l'expression du facteur proapoptotique Bim [117].

## **2.4.2. Régulation de la transcription**

### **2.4.2.1. Métabolisme glucidique**

Les facteurs de transcription sont aussi ciblés par la glycosylation [118]. Leurs activités sont modulées par cette modification post-traductionnelle. Plusieurs études démontrent l'importance d'O-GlcNAc dans les tissus périphériques qui sont reliés ou sensibles au métabolisme glucidique.

Le facteur de transcription Sp1 est glycosylé sur plusieurs résidus, en conditions hyperglycémiantes ou en utilisant l'inhibiteur de l'O-GlcNAcase PUGNAc dans des cellules endothéliales. Ce processus est renversé par l'utilisation de délétion, d'inhibition d'OGT et par la surexpression de l'O-GlcNAcase [119]. Sp1 glycosylé est recruté sur le promoteur PAI-1, un facteur associé à l'incidence d'accident cardiovasculaire favorisé par le syndrome métabolique. Une autre étude a aussi observé des effets similaires, mais qui seraient catalysés par l'altération mitochondriale par stress oxydatif résultant d'une surcharge glucidique. Le flux de glucose est alors dévié vers la soupape métabolique qu'est la voie HSP [120].

Foxo1, un régulateur central du métabolisme [121], est aussi visé par la glycosylation sur plusieurs résidus, particulièrement la sérine 317. L'activation de l'HSP favorise cette modification et active l'activité transcriptionnelle de Foxo1. La glucotoxicité est alors potentialisée par l'augmentation de la transcription de gènes favorisant la néoglucogénèse [122].

### **2.4.2.2. Complexe transcriptionnel**

La modulation de l'activité des facteurs de transcription est aussi contrôlée par la glycosylation de cofacteurs, qui sont des protéines se liant aux facteurs de transcription et qui modulent finement leur activité. Les études avec des cellules hépatiques identifient des rôles dans l'activation et la répression transcriptionnelle. TORC2, un coactivateur de

CREB, est séquestré à l'état phosphorylé sur les sérines 70 et 171 par la protéine 14-3-3 dans le cytoplasme. Sa glycosylation, en situation mimant l'hyperglycémie, provoque sa translocation au noyau. La glucotoxicité rencontrée lors de résistance à l'insuline pourrait ainsi être augmentée par l'activation des gènes, induits par CREB, de la néoglucogénèse [123].

À l'opposé, OGT est recruté sur des promoteurs par le corépresseur mSim3a. Une déacétylase d'histones est ajoutée au complexe via un recrutement impliquant la glycosylation ou la proximité physique d'OGT. Cette édification protéique assure une synergie dans la répression transcriptionnelle [124].

#### **2.4.2.3. Application à la cellule bêta pancréatique**

La sécrétion de l'insuline est contrôlée par un réseau complexe de facteurs transcriptionnels qui assurent une réponse optimale lors des fluctuations glucidiques. L'activation de la voie HSP est utilisée comme senseur métabolique pour catalyser une libération suffisante d'insuline en condition d'hyperglycémie.

La sécrétion d'insuline s'élève par la glycosylation de PDX-1 et NeuroD1, ce qui augmente leur liaison au promoteur de l'insuline [125] [126]. Dans cette dernière étude, l'alternance dans l'interaction de NeuroD1 avec OGT et O-GlcNacase serait impliquée dans la liaison au promoteur selon l'état métabolique présent.

L'expression d'un troisième facteur Maf1, favorisant la production d'insuline, serait engendrée par l'intermédiaire de protéines glycosylés inconnues. L'expression de ce facteur est favorisée par l'utilisation d'inhibiteur de l'O-GlcNacase ou diminué par l'atténuation de l'expression d'OGT [127].

### 2.4.3. Réponse inflammatoire

L'activation de la voie NF $\kappa$ B est bien caractérisée pour implication dans la promotion de l'oncogénèse et de l'inflammation [128]. Les études établissant le lien entre la glycosylation et cette voie signalétique montrent des effets qui semblent très spécifiques aux types cellulaires employés.

D'abord, en élevant le glucose ou en mimant l'activation de l'HSP, la glycosylation de NF $\kappa$ B s'est élevée dans des cellules mésangiales. NF $\kappa$ B est recruté sur le promoteur du facteur inflammatoire VCAM-1. Ce dernier est impliqué dans la néphropathie associée au diabète de type 2 [129]. Par contre, l'utilisation de la glucosamine, lors de rémission post-hémorragie cardiaque, diminue l'activation de cette même voie. Par conséquent, le profil inflammatoire systémique observé est aussi réduit [130]. Finalement, la glycosylation d'IKK $\beta$  sur la sérine 733 empêche l'inhibition par phosphorylation et favorise l'activation constitutive de NF $\kappa$ B dans le développement de tumeurs [131].

### 2.4.4. Stress cellulaire et stabilité protéique

L'exposition cellulaire à différents stress (métabolique, UV, thermique, etc.) est accompagnée de l'utilisation de l'O-GlcNAc [132]. Les niveaux de protéines glycosylées sont rapidement élevés en cours de stress. L'élimination du groupement UDP-GlcNAc est effectuée immédiatement à la fin de l'épisode de stress. C'est pourquoi la résistance aux stress est augmentée lors de l'activation d'OGT. Ces facteurs protéiques sont accompagnés de chaperones moléculaires qui préviennent l'agglomération et limitent la diffusion inappropriée des protéines [133]. L'expression de protéines de chocs thermiques (hsp) est fortement augmentée lors des stress [134]. L'élévation de la concentration de glucose favorise aussi l'activation de la glycosylation d'hsp70 dans le muscle [135].

De plus, une récente étude démontre l'interrelation entre le processus de glycosylation et d'ubiquitination en présence de chocs thermiques. Les traitements de

glucosamine ou l'exposition au PUGNAc entraînent une hausse simultanée des deux processus. L'utilisation d'un inhibiteur de l'ubiquitine ne peut diminuer la glycosylation [136]. Les résultats de cette étude suggèrent que la durée d'application d'un stress pourrait favoriser la dégradation par protéasome. L'état transitoire de glycosylation/ubiquitination observée, en plus de l'alternance avec la phosphorylation, argumente en faveur du rôle capital joué par la glycosylation protéine dans la régulation de la signalisation.

La stabilité protéique de Sp1 par glycosylation est assurée par liaison directe d'UDP-GlcNAc, ce qui la protège de la dégradation par le protéasome [137]. Toutefois, cette unité de dégradation protéique peut être inhibée par sa propre glycosylation. Le domaine à activité ATPase du protéasome est ciblé par cette modification qui l'empêche d'exercer son action [138].

Le stress du réticulum endoplasmique (ER) et les agrégats protéiques peuvent être catalysés par la glycosylation. L'accumulation des protéines O-GlcNAc est identifiée dans des tissus et cellules qui sont impliquées dans l'athérosclérose. Cette observation est liée au stress ER en simulant l'hyperglycémie qui active la voie HSP [139]. Finalement, la progression de la plaque amyloïde, qui est caractéristique de la maladie d'Alzheimer, est normalement contrôlée par l'activité du protéasome. Cependant, l'inhibition de celui-ci par glycosylation limiterait l'élimination du réseau de  $\beta$ -amyloïde/tau/ubiquitine [140] [141].

En somme, l'activation de l'HSP provoque l'augmentation de la glycosylation protéique. Cette soupape métabolique est particulièrement active lors en présence de surcharges nutritionnelles. L'augmentation des modifications post-traductionnelles engendrées sur certaines cibles protéiques, métaboliquement actives, entraîne la perturbation de leurs activités, qui placent la cellule dans une situation précaire d'adaptation pour répondre au maintien de l'homéostasie cellulaire.

### 3. Les sirtuines

#### 3.1. Découverte et conservation

Les sirtuines ont été identifiées pour la première fois chez *S.cerevisiae* à la fin des années 70 [142]. Le premier gène découvert chez la levure, MAR1, est renommé *silent information regulator 2* (SIR2) d'après son implication dans la suppression des processus transcriptionnels, notamment en régions télomériques [143] [144]. Les mécanismes à la base de ces processus se sont précisés chez cet organisme par le rôle de SIR2 dans le contrôle de la structure même de l'ADN [145] et la transcription de l'ADN ribosomal [146]. De plus, cette protéine est associée à la préservation de la stabilité génomique par sa contribution dans les activités de réparation de l'ADN [147].

Le groupe de Leonard Guarente montre par des études de surexpression de SIR2 chez la levure [148] et de son homologue SIR2.1 chez *C.elegans* [149] que les organismes modifiés présentent un phénotype d'extension de la durée de vie. Ces découvertes relient ainsi SIR2 au concept de la promotion de la longévité. La déviation phylogénétique entre ces deux organismes montre ainsi le haut degré de conservation des sirtuines [150].

#### 3.2. Famille des sirtuines

Les homologues de SIR2 chez les mammifères sont renommés avec la nomenclature Sirt-x. Cette famille est actuellement composée de sept membres, soit Sirt1-7. Les différents isoformes ont une conservation du site catalytique de plus de 270 acides aminés, bordé de région N et C-terminale de longueur et composition variable. Ces différentes enzymes possèdent soit une activité déacétylase, soit une activité ADP-ribosyl transférase ou les deux. Les sept sirtuines sont regroupées en 4 classes distinctes (Figure 6) [151] [152].



Figure 6: Les sept sirtuines chez les mammifères sont classées en quatre catégories selon les caractéristiques phylogénétique moléculaires [153].

Le premier membre de cette famille est retrouvé en majorité au noyau sur l'euchromatine. C'est la sirtuine mieux caractérisée en raison de sa forte activité déacétylase impliquée dans un grand nombre de fonctions métaboliques qui seront discutées en détail plus tard. Sirt2 est essentiellement concentrée au cytoplasme. Avec Sirt5, qui n'a pas de fonction connue, cet isoforme est le seul dont la structure est cristallisée [154]. Son activité déacétylase est reliée au contrôle de la réponse aux stress, du cycle cellulaire et de la différenciation via les protéines Foxo et la tubuline [155] [156] [157].

Sirt3 est localisé strictement dans la mitochondrie. La découverte de polymorphismes sur le gène de cette sirtuine montre son implication dans la promotion de la longévité chez l'homme [158]. De plus, son expression, favorisée par la restriction calorique et l'exposition au froid, et sa double fonction enzymatique sont impliquées dans le métabolisme mitochondriale du tissu adipeux brun en agissant sur l'expression d'UCP1 via une interrelation avec PGC-1 $\alpha$  [159]. La sirtuine 4 est aussi retrouvée dans la mitochondrie. Un important rôle dans le métabolisme de la cellule bêta pancréatique a été découvert par l'équipe du Dr Guarente. L'ADP-ribosylation de la glutamate déshydrogénase (GDH) par Sirt4 est associée à une diminution de la production d'ATP par la métabolisation de la glutamine et, donc, d'une réduction de la sécrétion d'insuline. L'utilisation de modèles de restriction calorique ou déficients en Sirt4 permet de rétablir la sécrétion d'insuline par l'utilisation d'acides aminés [160].



La délétion du gène de la sirtuine 6 chez la souris est caractérisée par une grande perturbation du génome, du métabolisme glucidique, lipidique et du développement [161]. L'instabilité génomique associée à ce phénotype est confirmée par le groupe de Chua. L'activité déacétylase de Sirt6 sur la lysine 9 des histones 3 est impliquée dans la préservation de l'état génomique des télomères qui sont sensibles aux fluctuations métaboliques [162] et dans la répression de p65-NFκB [163]. Finalement, l'équipe du Dr Guarente montre que l'isoforme nucléolaire 7 est impliqué dans la régulation de la transcription de l'ADN ribosomale par son interaction avec les histones et l'ARN polymérase I. L'atténuation de l'expression de Sirt7 par petit ARN interférant est couplée à l'apoptose [164].

### **3.3. Activité et structure de Sirt1**

La découverte de l'activité secondaire d'ADP-ribosyltransférase [165], qui suggérait son implication majeure dans la déacétylation chez l'homologue de la protéine Sirt1, SIR2 chez la levure, précède l'identification de son activité déacétylase. Une étude de mutation H364Y du site catalytique montre une inhibition complète de la déacétylation des lysines 9 et 14 de l'histone 3 et de la lysine 14 de l'histone 4. Une mutation dans le site d'ADP-ribosyltransférase G270A ne diminue que de 20% le potentiel de déacétylation [166].

La figure suivante montre l'activité double qui caractérise la protéine Sirt1. Les récentes études de cristallisation de Sirt2 [154] et de développement d'activateur et d'inhibiteur de Sirt [167] améliorent grandement la compréhension détaillée du mécanisme de déacétylation. L'utilisation du NAD<sup>+</sup> comme substrat dans les deux réactions démontre que l'activité de Sirt1 agit comme senseur des niveaux d'énergie et de l'état redox cellulaire (Figure 7).

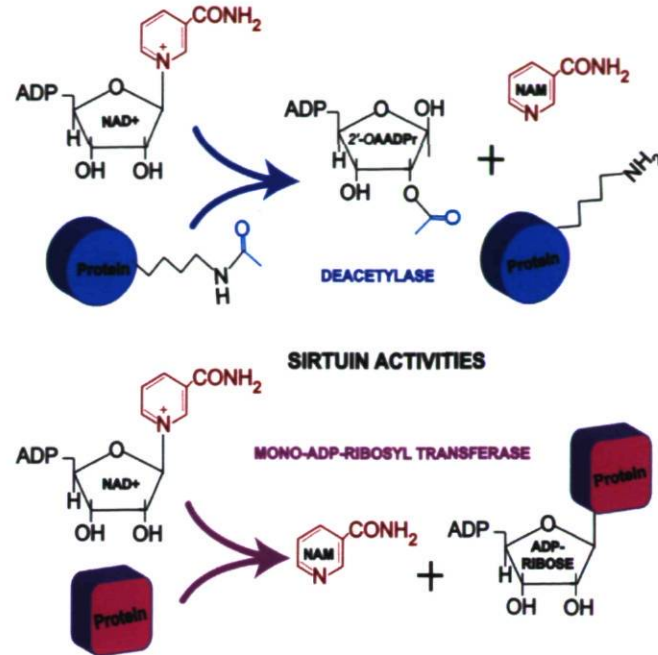


Figure 7 : Les sirtuines sont des déacétylases dépendantes du NAD<sup>+</sup> et des mono-ADP-ribosyl transférases qui contrôlent une vaste gamme de protéines impliquées dans le métabolisme et la survie cellulaire [153].

Cette importante propriété métabolique relie la protéine Sirt1 au concept de restriction calorique. Celle-ci est caractérisée par la réduction de plus ou moins 30% des calories nutritionnelles totales, tout en conservant la proportion de chaque nutriment essentiel. L'utilisation de ce principe montre le prolongement de la durée de vie chez la levure [168], la drosophile [169] et chez *C.elegans* via DAF-16 et 14-3-3 [170]. Ces différentes études relient la protéine Sirt1 au concept d'extension de la longévité. Il est important de noter que la restriction calorique est la seule méthode éprouvée non génétique qui retarde le vieillissement. Des études de surexpression de Sirt1 chez les animaux génèrent des phénotypes similaires aux effets engendrés par la restriction calorique, qui sont la diminution de la masse adipeuse et du cholestérol et l'augmentation de l'homéostasie glucidique et du rythme métabolique par consommation d'oxygène accrue [171] [172].

En plus de la restriction calorique, l'utilisation du resvératrol, un polyphénol antioxydant, est identifié comme activateur de la protéine Sirt1. Des souris nourries avec une diète riche en lipides sont obèses, résistantes à l'insuline, hyperglycémiques et sujettes aux complications hépatiques. Une étude où des animaux sont traités avec le resvératrol permet de renverser les trois derniers symptômes en plus d'améliorer la résistance à l'exercice [173]. Enfin, depuis quelques temps, le développement d'activateurs de Sirt1 est en pleine croissance afin d'augmenter la spécificité de l'activation et de diminuer les doses administrées.

La transcrite et la protéine Sirt1 sont soumis à des événements de régulation qui assurent sa stabilité ou modifient son activité. L'ARN messenger de Sirt1 est lié par le facteur HuR en conditions normales. Lors d'un stress, la phosphorylation de HuR est provoquée par l'association d'une kinase du contrôle du cycle cellulaire (Chk2). Cette modification d'HuR entraîne ainsi la libération du transcrite de Sirt1 qui est susceptible d'être dégradé [174]. Ensuite, une récente étude identifie 13 résidus aminés phosphorylés *in vivo* sur la protéine Sirt1. L'action de phosphatase *in vitro* est associée à la diminution de l'activité déacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup> de Sirt1. De plus, certains de ces résidus sont phosphorylés par des kinases du cycle cellulaire [175]. Finalement, Sirt1 est aussi modifié par sumoylation. Ce changement post-traductionnel sur la lysine 734 contrôle de façon cruciale son activité de déacétylation. En absence de stress sévère à l'ADN, Sirt1 est sumolyé et peut réprimer son substrat apoptotique par déacétylation. Lors de dommages génomiques importants, la désumoylase SENP1 cible Sirt1 et provoque l'apoptose cellulaire par inhibition de l'activité enzymatique de Sirt1 [176].

### **3.4. Métabolisme énergétique**

La régulation de l'activité de Sirt1 est un facteur crucial dans la réponse aux constants changements métaboliques de l'organisme. La figure suivante est un portrait global de l'implication de Sirt1 dans l'homéostasie énergétique (Figure 8).

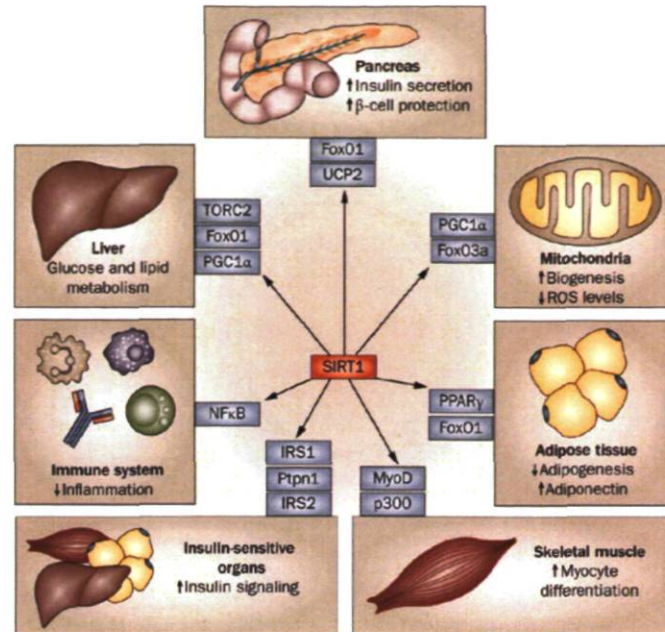


Figure 8 L'activité déacétylase de Sirt1 est impliquée dans les différentes fonctions métaboliques [177].

### 3.4.1. Impact sur la signalisation à l'insuline

Sirt1 est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique de plusieurs cellules et tissus sensibles à l'action de l'insuline. L'activité de Sirt1 est associée à la régulation positive de plusieurs composantes de la voie de signalisation à l'insuline. Une récente étude démontre que l'activation de Sirt1 permet d'inhiber la transcription de la phosphatase Ptpn1. Cette enzyme est, entre autre, activée en condition de surcharge nutritionnelle, ce qui entraîne la perturbation de la cascade à l'insuline via la déphosphorylation des tyrosines catalytiques sur le récepteur à l'insuline et IRS-1. L'activation de Sirt1 par l'exposition au resvératrol chez des modèles *in vitro* et *in vivo* de résistance à l'insuline permet de lever l'inhibition exercée par Ptpn1 en diminuant son expression [178]. Un autre groupe de chercheurs a réussi à identifier IRS-2 comme cible de déacétylation par Sirt1. Un modèle cellulaire KO pour Sirt1 est caractérisé par l'augmentation de l'acétylation d'IRS-2 jumelée à la diminution de sa phosphorylation

catalytique sur tyrosines. L'activation d'Akt en aval par la PI3K est ainsi fortement diminuée [179].

Enfin, l'atténuation de l'expression de Sirt1 dans les adipocytes 3T3-L1 est corrélée avec la diminution de la captation du glucose par la perturbation de la translocation de GLUT4 à la membrane. Ces effets sont attribués à l'activation de la phosphorylation de JNK, qui favorise l'activité inflammatoire cellulaire, à la hausse simultanée de la phosphorylation inhibitrice en sérine d'IRS-1 et à l'inactivation tyrosine-dépendante des membres de la voie de signalisation à l'insuline. La réactivation de Sirt1 permet de renverser ces actions délétères sur la cascade signalétique [180].

### **3.4.2. Muscle squelettique**

La régulation du métabolisme du tissu musculaire par Sirt1 est caractérisée par l'augmentation de la dépense énergétique et de l'utilisation des substrats nutritionnels au détriment de l'expansion tissulaire. Premièrement, Sirt1 est impliqué dans la répression de l'activité transcriptionnelle MyoD, un facteur de différenciation musculaire, par la régulation de l'état d'acétylation de ce dernier. Lors du développement musculaire, les niveaux NAD<sup>+</sup> cellulaire sont abaissés, ce qui inhibe l'activité déacétylase de Sirt1. En situation d'activité catabolique élevée, la concentration du NAD<sup>+</sup> est augmenté et favorise la déacétylation de MyoD. Le processus moléculaire impliquant Sirt1 a été découvert. La répression transcriptionnelle de MyoD via Sirt1 est contrôlée par le recrutement de cette sirtuine au complexe d'acétylation composé de MyoD et de p300/CAF (pCAF). Les trois niveaux d'inhibition sont assurés par la déacétylation de l'acétylase pCAF, de MyoD et des histones 3 sur les lysines 9 et 14 du promoteur des myosines [181]. Un mécanisme complémentaire est identifié pour le facteur de différenciation musculaire MEF2. Cette étude permet d'observer le même type d'inhibition par l'activité déacétylase de Sirt1 sur ce facteur, mais en collaboration avec une autre déacétylase d'histones, HDAC4. Cette enzyme est composée d'une sous-unité de modification par sumoylation qui permet de maintenir l'inhibition de l'acétylation par compétition du site aminé [182].

PGC-1 $\alpha$  est le régulateur central de l'homéostasie énergétique du muscle. Auwerx et ses nombreux collaborateurs proposent d'élégants mécanismes liant la déacétylation de PGC-1 $\alpha$  et Sirt1. Cette modification dans le tissu musculaire est corrélée avec l'augmentation de la biogénèse et de l'activité mitochondriale. Par conséquent, l'activation de cette sirtuine par le resvératrol dans le muscle de souris favorise l'homéostasie énergétique [183]. L'utilisation d'un activateur plus spécifique de Sirt1, le SRT1720, entraîne aussi l'amélioration de la capacité de respiration oxydative *in vivo* [184]. Enfin, un lien majeur est établi entre la restriction calorique et l'activité de Sirt1 dans le muscle. En situation de déplétion de substrats nutritionnels, l'AMPK est activée. Elle peut ainsi favoriser l'activation de PGC-1 $\alpha$  en augmentant la déacétylation par Sirt1 via deux mécanismes : par l'augmentation des niveaux de NAD<sup>+</sup> et par la phosphorylation obligatoire de PGC-1 $\alpha$  pour la déacétylation par cette sirtuine [185]. Finalement, un autre laboratoire constate que l'oxyde nitrique généré par eNOS augmente l'expression de Sirt1, qui génère un meilleur potentiel mitochondrial dans les vascularisations musculaires [186].

### 3.4.3. Tissu adipeux

La première implication de Sirt1 dans le métabolisme du tissu adipeux est associée à l'activité du régulateur central de l'adipogénèse PPAR $\gamma$ . Le recrutement et la liaison des corépresseurs NCoR et SMRT avec la protéine Sirt1 sont augmentés par activation au resvératrol ou surexpression de la sirtuine. Les promoteurs de gènes d'adipogénèse sont occupés par ce complexe, ce qui a pour effet de diminuer l'accumulation de gras dans le tissu par la réduction du stockage dans les adipocytes [187]. Par ce concept, lors de la restriction calorique, l'activation de Sirt1 est jumelée avec l'augmentation de la lipolyse, qui accentue la concentration d'acides gras libres dans la circulation et la captation pour la  $\beta$ -oxydation.

Une étude *in vitro* montre également que le contrôle de la libération d'adiponectine par le tissu adipeux est fortement influencé par l'activation de Foxo1 par déacétylation dépendante de Sirt1. La protéine déacétylée est alors liée au promoteur de l'adiponectine. L'expression de cette adipokine, qui améliore la sensibilité à l'insuline, est doublée par le

renforcement de la liaison du coactivateur CEBP/ $\alpha$  sur Foxo1, toujours sous le contrôle de Sirt1 [188].

#### **3.4.4. Foie**

L'action de Sirt1 dans le tissu hépatique est reliée à la promotion de la néoglucogénèse lors d'un jeûne ou de la restriction calorique. Un mécanisme finement contrôlé pour la production de glucose hépatique, par alternance de facteurs transcriptionnels sur des gènes cibles, est influencée par Sirt1. La sécrétion du glucagon, lors d'un jeûne, entraîne l'activation de p300 par déphosphorylation sur la sérine 89. L'acétylation p300-dépendante de TORC2 sur la lysine 628 est accompagnée par l'activation des gènes de la néoglucogénèse. Par contre, en prolongation de jeûne, l'association de Sirt1 à TORC2 provoque sa déacétylation et sa dégradation subséquente [189]. Le relais de la néoglucogénèse pourrait être assuré par la rétention de Foxo1 dans la fraction nucléaire [190]. Une autre étude montre que l'inhibition de la glycolyse et l'activation de la néoglucogénèse sont contrôlés par l'interaction de Sirt1, HNF-4 et PGC-1 $\alpha$  [191]. L'activité déacétylase de Sirt1 cible aussi le facteur de transcription LXR. La génération de souris KO pour Sirt1 viables est caractérisée par d'importantes anomalies dans le métabolisme [192].

#### **3.4.5. Pancréas**

Le métabolisme de la cellule bêta pancréatique est aussi influencé par Sirt1. En condition de forte activité métabolique dans la mitochondrie, UCP2 est active afin de découpler les gradients de protons générés par l'oxydation des substrats. Cette protéine découplante utilise en contre partie de l'ATP qui, dans les cellules bêta, est impliquée dans le processus de sécrétion d'insuline. L'expression d'UCP2 est contrôlée par la répression transcriptionnelle exercée par l'occupation du promoteur d'UCP2 par Sirt1. Les expériences de suppression [193] et de surexpression de Sirt1 [194] *in vivo* montrent respectivement une diminution et une hausse de la sécrétion d'insuline via les fluctuations d'ATP causées par l'activité d'UCP2.

La protéine Sirt1 est aussi appelée à favoriser la survie des cellules bêta pancréatiques lors de choc aigu rencontré lors d'une hyperglycémie transitoire. Ce type de stress provoque la formation de corps prémyélotique au noyau (PML). Une étude démontre qu'un stress majeur, non chronique, engendre l'acétylation de Foxo1 et sa translocation nucléaire dans le PML. Sirt1 est recruté dans ce complexe pour déacétyler Foxo1 afin de transcrire des gènes de survie de façon temporaire. Le PML est formé pour protéger Foxo1 déacétylé qui est sujet à dégradation rapide par ubiquitination [195].

### 3.5. Inflammation

La détérioration métabolique, associée à l'obésité et au diabète de type 2, est favorisée par l'accroissement de l'état pro-inflammatoire via la libération accrue de cytokines. L'activation de la voie de NFκB est grandement impliquée dans le phénomène. La sous-unité catalytique p65 d'NFκB est ciblée par l'activité déacétylase de Sirt1. Le processus de déacétylation par Sirt1, avec ou sans resvératrol, est observé directement dans un système *in vitro* sur la lysine 310 de p65-NFκB. Le traitement avec le nicotinamide ou l'utilisation de la forme non-fonctionnelle H363Y de Sirt1 ne change pas l'état d'acétylation de p65-NFκB [196]. L'état déacétylé de p65 est associé à une réduction de sa transactivation et ainsi de son activité transcriptionnelle. Une récente étude démontre également que le contrôle de l'activité de NFκB implique la liaison entre Sirt1 et le *transducin-like enhancer of split-1* (TLE1). Cette interaction ne montre pas d'impact dans le processus de déacétylation de p65-NFκB, mais serait plutôt impliquée dans la co-répression transcriptionnelle sur les promoteurs ciblés par NFκB [197].

Une étude de surexpression de Sirt1 dans les cellules bêta pancréatiques montre l'importance de la déacétylation de NFκB dans la survie cellulaire suite à l'exposition à des cytokines proinflammatoires. Ces dernières entraînent la diminution des niveaux de Sirt1 et catalysent la transcription de la synthase d'oxyde nitrique inductible (iNOS) qui est entre partie contrôlée par NFκB acétylé sur la lysine 310. La surexpression de Sirt1 dans les



cellules Rin-m5f et des îlots pancréatiques primaires permet de préserver la fonction et la cellulaire des cellules bêta par inhibition de l'activité transcriptionnelle de p65-NFκB via sa déacétylation [198].

L'impact de Sirt1 dans la protection de l'état inflammatoire a aussi été investigué *in vivo*. En générant un modèle de souris transgénique à surexpression modéré de Sirt1, Pfluger et son équipe montrent l'impact de cette sirtuine sur l'état inflammatoire des animaux soumis à une diète riche en lipides. En plus d'avoir une meilleure tolérance au glucose au foie et une protection contre les risques de stéatose hépatique, l'expression hépatique de marqueurs inflammatoires TNF-α et IL-6 est réduite chez les animaux qui surexpriment Sirt1 sous la diète lipidique. La diminution de l'expression NFκB-dépendante de ces facteurs est associée à une corrélation inverse caractérisée par l'augmentation des enzymes antioxydantes comme MnSOD qui est sous contrôle de PGC1-α [199] Sirt1 serait ainsi au centre de cette action synergique anti-inflammatoire. Enfin, l'exposition de cellules pulmonaires *in vivo* aux toxines présentes dans la fumée de cigarette entraîne l'augmentation de l'expression de marqueurs inflammatoires (MCP-1; TNF-α et IL-6) respectivement dans le liquide bronchique et les poumons. En exposant des monocytes-macrophages aux mêmes toxines, la réduction de Sirt1 est jumelée à l'augmentation de l'acétylation de p65-NFκB et ainsi à l'élévation de l'inflammation pulmonaire [200].

### **3.6. Prévention de la neurodégénération**

Une importante étude utilisant des souris qui possèdent une résistance pour la dégénérescence axonale identifie que l'activation de Sirt1 par le NAD<sup>+</sup> est impliquée dans le phénotype. La partie Nmnat, synthétisant le NAD<sup>+</sup>, de la protéine chimérique rencontrée chez la souris Wallarian (wld<sup>s</sup>) est responsable de la préservation axonale. Le traitement des explants neuronaux des souris wld<sup>s</sup> avec le sirtinol et l'inhibition spécifique de Sirt1 par interférence en ARN provoquent le phénomène de dégénération axonale. La protection contre cette dernière est assurée par le resvératrol [201].

La restriction calorique montre des effets contre la neurodégénération. Plusieurs études observent l'implication de la protéine Sirt1 dans ce processus. Qin et ses collaborateurs évaluent l'impact de la Sirt1 chez des modèles *in vivo* et *in vitro* de la maladie d'Alzheimer. Ils ont découvert que l'augmentation des niveaux et de l'activité de Sirt1 est associée à l'augmentation du clivage du peptide précurseur amyloïdique (APP) par l' $\alpha$  sécrétase. Cette enzyme génère une forme inactive de peptide A $\beta$  qui préviendrait l'initiation de la pathologie. L'action protectrice de Sirt1 serait essentiellement contrôlée par l'inhibition de ROCK-1, qui permet d'activer l' $\alpha$  sécrétase [202]. Une récente découverte du même laboratoire montre que c'est potentiellement l'inactivation de Foxo3a par déacétylation via Sirt1 qui pourrait produire ces effets protecteurs [203].

L'activation de Sirt1 et son impact sur la voie NF $\kappa$ B sont aussi reliés dans la prévention de l'effet toxique associé à l'accumulation de la plaque amyloïde. La surexpression de Sirt1 ou le traitement avec resvératrol favorise la déacétylation de p65-NF $\kappa$ B sur la lysine 310 en situation d'activation de la microglie (macrophage du cerveau) par les peptides amyloïdique [204]. Ainsi, Sirt1 est associé à la prévention de la neurodégénération par inhibition de l'inflammation. Enfin, une récente étude chez des sujets humains atteints d'Alzheimer montre que la réduction de l'expression et des niveaux protéiques de Sirt1 est couplée à l'accumulation de la protéine *tau* dans la plaque  $\beta$ -amyloïde [205].

### 3.7. Développement

L'étude de l'implication de Sirt1 dans le développement est difficile puisque la délétion complète classique de la sirtuine est caractérisée par la génération de modèles animaux présentant un très haut taux de létalité au stade embryonnaire. En utilisant des croisements avec des origines génétiques différentes, les chercheurs ont réussi à produire des modèles de plus en plus viables. À la naissance, les animaux sont beaucoup plus petits que le groupe contrôle. De plus, les mâles adultes développent un phénotype de stérilité caractérisé par de l'atrophie aux testicules et une dysfonction majeure dans le nombre et la

physiologie des spermatozoïdes [206]. Une autre étude montre également un phénotype très similaire à ce dernier travail en démontrant en plus des défauts dans le développement cardiaque, rétinien, oculaire et ganglionnaire [207]. Ces études démontrent le rôle majeur de cette protéine et l'importance de sa conservation dans les espèces.

### 3.8. Apoptose et survie cellulaire

Le rôle métabolique de Sirt1 dans la régulation des processus d'apoptose et de survie cellulaire est très complexe. Selon les facteurs ciblés, le type cellulaire visé et la nature de l'implication mécanistique de Sirt1, cette dernière est comparable à une lame à deux tranchants : pro ou antiapoptotique.

Plusieurs études s'attardent à l'impact de Sirt1 sur le suppresseur de tumeur p53. Ce gardien du génome est activé lors de différents stress afin de contrôler la destinée cellulaire. Il peut arrêter le cycle cellulaire afin de permettre la réparation associée aux dommages ou tout simplement déclencher l'apoptose. En présence de stress, p53 est fortement acétylé dans sa partie C-terminale régulatrice. Sirt1 est lié à p53 physiquement sous certaines conditions de stress afin d'exercer son activité déacétylation. Ce processus est caractérisé par la perte de l'activité pro apoptotique de p53 suite à l'exposition à des stress génomiques et oxydatifs [208]. L'équipe du Dr Guarente montre aussi que la lysine 380 de p53 est particulièrement ciblée par Sirt1 [209]. Une autre étude démontre également en utilisant des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour Sirt1 que les lysines acétylées entre 370 et 380 sont sensibles à l'action de Sirt1 [207].

Une étude plus récente montre que l'action de Sirt1 sur p53 est fortement influencée par le facteur *hypermethylated in cancer1* (HIC1). L'interaction physique entre HIC1 et Sirt1 via un domaine POZ, prévient la déacétylation de p53 en plus d'inhiber la transcription de Sirt1. Ce phénomène est ainsi relié à l'action apoptose p53 via l'augmentation de Noxa et la diminution de Bcl-2. L'utilisation de méthodes de délétion ou répression d'HIC-1, mimant l'hyperméthylation de son promoteur relié au vieillissement,

montre la restauration de l'activité de Sirt1 qui pourrait favoriser le développement tumoral [210].

Sirt1 est aussi soumis à d'autres éléments de contrôle dans l'équilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose. Dans la même optique que HIC1, le microARN miR-34A est identifié comme répresseur de l'expression de Sirt1. Ce résultat est marqué par le maintien de l'activité de p53, par l'augmentation de l'expression de PUMA et de p21. La transcription de miR-34A est en plus contrôlée par p53 ce qui assure une forte inhibition de Sirt1 [211]. Enfin, dans les cellules souches embryonnaires, Sirt1 est impliqué dans la localisation de p53 suite à un stress oxydatif. D'après cette étude, la sirtuine empêche la translocation nucléaire de la forme cytoplasmique de p53 pour détoxifier les ROS. Ce processus est ainsi accompagné par la translocation mitochondriale de p53 et de Bax afin d'engendrer l'apoptose [212]. Une autre étude démontre que le régulateur actif de Sirt1 (AROS) est un facteur crucial pour le contrôle de la déacétylation de p53 *in vitro* et *in vivo* [213].

L'insuffisance cardiaque associée à l'hypertrophie du cœur est, en partie, causée par les phénomènes d'apoptose. L'apoptose dépendante de l'activité de PARP1 est jumelée à la diminution de NAD<sup>+</sup> et, par conséquent, de l'activité de Sirt1 dans les monocytes de cœur en insuffisance [214]. La surexpression modérée de Sirt1 couplée au rétablissement des niveaux de NAD<sup>+</sup> chez la souris, est caractérisée par la réduction de l'apoptose associée à l'hypertrophie cardiaque. Cet effet est contrôlé par l'inhibition de l'activité apoptotique de p53 [215]. De plus, l'hypertrophie cardiaque est un processus essentiel lors du développement, mais qui doit être modéré lors du vieillissement. Ce phénomène est caractérisé par la variation de concentration d'une histone modifiée H2A.Z. Une étude a déterminé que les niveaux de H2A.Z sont gérés via la déacétylation par Sirt1. La surexpression ou l'activation par le resvératrol de Sirt1 favorise l'ubiquitination successive de cette histone [216]. Le contrôle de l'apoptose est aussi influencé par Sirt1 dans le tissu rénal. L'activité déacétylase de la sirtuine est impliquée dans la déacétylation de p53 lors d'un stress oxydatif [217]. De plus, le même auteur démontre aussi que l'apoptose est prévenue dans les cellules mésangiales soumises à un stress apoptotique par le TGF- $\beta$  en

utilisant la surepression de Sirt1 afin de déacétyler les lysines 64 et 70 de Smad7. Ce changement d'état est associé à la susceptibilité de ce facteur par le protéasome [218].

L'action de Sirt1 dans le processus d'apoptose est aussi contrôlée par les facteurs différents de p53. La famille des facteurs de transcription Foxo est impliquée dans l'intégration de la réponse cellulaire suite à des modifications d'ordre énergétique et/ou de stress environnemental. Plusieurs études démontrent que les isoformes de Foxo sont déacétylés par Sirt1. L'interaction de cette sirtuine avec les membres de la famille Foxo est assurée par la liaison à un domaine LXXLL [219]. Brunet et Motta ont découvert que cette association en complexe, accompagné de la déacétylation de Foxo3a, est impliquée dans la survie lors d'un stress oxydatif. L'activité transcriptionnelle de Foxo3a déacétylé est associée à l'arrêt du cycle cellulaire par p27 [220] et l'activation de la machinerie de contrôle des dommages cellulaire par GADD45 [221]. L'inhibition de Sirt1 par un traitement de nicotinamide et par l'interférence en ARN montre aussi une perte importante de l'activité transcriptionnelle de Foxo4 pour la résistance aux stress induite par GADD45 [222]. Les mêmes effets de promotion de survie, dépendante de Sirt1, sont observés pour l'isoforme 4 via, cette fois, la promotion de l'enzyme antioxydante MnSOD [223].

La mitochondrie est ciblée par la translocation par la translocation de facteurs proapoptotiques, comme Bax, qui conduit à la mort cellulaire. En réponse à un stress important, le facteur de réparation de l'ADN Ku70 est rapidement acétylé par CBP, ce qui favorise l'apoptose via l'incapacité à séquestrer Bax. Une étude de Cohen permet de relier l'activité déacétylase de Sirt1 sur les lysines 539 et 542 assure la formation du complexe Ku70/Bax qui prévient l'apoptose [224]. Wang et ses collaborateurs ont identifié que l'interaction de Sirt1 avec le régulateur du cycle cellulaire et d'apoptose E2F1, favoriserait la survie cellulaire. Ce laboratoire montre aussi qu'E2F1 active la transcription *in vivo* et *in vitro* de Sirt1 suite en condition basale et lors d'un stress de nature génomique. La surepression et l'inhibition de Sirt1 et E2F1 permettent de constater que Sirt1 réduit la transcription des gènes proapoptotiques par interaction avec E2F1 afin de promouvoir la survie lors de stress [225]. Finalement, un court rapport montre que Sirt1 est clivé par les

caspases lors de l'induction de l'apoptose et que cette action entraîne un changement dans la localisation de la sirtuine [226].

L'interaction avec d'autres facteurs peut aussi promouvoir l'apoptose dans les processus de contrôle de l'expansion des cellules tumorales. La protéine BCA3, qui est associée au cancer du sein, est modifiée par neddylation par la NEDD8. Cette modification post-traductionnelle est liée au processus de dégradation protéique et montre son implication dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p65-NFκB. Ce processus est, en partie, assuré par le recrutement de Sirt1 dans le complexe [227]. Un phénomène similaire est observé avec des cellules cancéreuses, mais dans le contrôle de l'apoptose dépendante de p53. Les lysines 373 et 382 de p53 sont protégées de la déacétylation par Sirt1 par l'inhibition de l'enzyme par la liaison physique avec p33, ce qui favorise l'apoptose [228].

Deux études très récentes ont également constaté l'importance de l'action de Sirt1 dans la réponse aux divers stress environnementaux. Premièrement, Westerheide montre que l'association de Sirt1 avec Hsf1 assure et prolonge la réponse aux chocs thermiques suite à un stress cellulaire. Ce type de réponse est conféré par la déacétylation de la lysine 80 d'HSF1 qui est essentielle pour la liaison sur le promoteur d'Hsp70. Le maintien de cette réponse permet ainsi de protéger la cellule lors de conditions métaboliques précaires [229]. Ensuite, Sirt1 est aussi impliqué dans la réponse aux chocs hypoxiques. Ce type de stress est en partie contrôlé par HIF-2α qui exerce un contrôle sur la transcription de l'érythropoïétine (Epo), un facteur qui favorise la survie. La régulation de cette activité transcriptionnelle *in vitro* et *in vivo* est favorisée par la déacétylation d'HIF-2α par Sirt1. L'interaction entre les deux protéines est primordiale dans le contrôle de développement en hypoxie, mais pourrait aussi être rencontrée par l'exposition à d'autres types de stress cellulaires [230].

Brièvement, le haut degré de conservation de la protéine Sirt1 à travers les espèces montre que ce corépresseur à activité déacétylase exerce un impact majeur sur l'homéostasie cellulaire. Plusieurs études suggèrent que cette protéine est en partie

responsable de la régulation des processus de survie cellulaire qui dépendent de l'état énergétique cellulaire.

## **CHAPITRE II : HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET**



D'une part, l'apoptose des cellules bêta pancréatiques est associée à la progression du diabète de type 2 [15]. L'hyperglycémie rencontrée chez les patients atteints de cette maladie agit en synergie avec la charge lipidique pour conduire à l'échec pancréatique [55]. Plusieurs scénarios complémentaires [66] [63] sont proposés pour définir la perte de compensation de la fonction pancréatique. Le passage du glucose par la soupape métabolique qu'est l'HSP accélère ce processus de dysfonction et de mort de la cellule bêta [117] puisqu'elle exprime OGT à des concentrations plus élevées. La métabolisation de l'excès glucidique par cette voie conduit à la glycosylation de facteurs protéiques qui peuvent voir leur fonction perturbée selon le site aminé de la modification post-traductionnelle [73] [105] [231]. Cependant, l'identité et la contribution respectives de ces facteurs restent à ce jour incomplètes.

D'autre part, la déacétylase Sirt1 est un corépresseur, majoritairement nucléaire, qui est impliqué dans l'homéostasie énergétique via son activité enzymatique dépendante du NAD<sup>+</sup>. La conservation de cette sirtuine montre que son expression protéique est aussi intimement liée aux fluctuations des nutriments comme le glucose [232] [233]. Ce facteur protéique, senseur de l'état redox, est fortement relié à la promotion de la survie cellulaire par des interactions connues avec, par exemple, Foxo [195] [224] [229].

L'état des connaissances et la problématique à la base cette présente étude nous amène donc à poser l'hypothèse que la voie des hexosamines induit l'apoptose des cellules bêta pancréatiques par la réduction des niveaux et/ou de l'activité de Sirt1 par un mécanisme moléculaire impliquant sa glycosylation. Pour tester cette hypothèse, cinq objectifs généraux de l'étude ont été réalisés.

Le premier objectif était de déterminer que l'activation de la voie des hexosamines entraîne la mort des cellules bêta pancréatiques *in vitro*. L'impact des conditions d'hyperglycémie et d'exposition dépendante du temps et de la dose à la glucosamine sur les processus apoptotiques a été mesuré par marquage au Bleu Trypan, à l'Annexine-V et au TUNEL.

Le deuxième objectif était de comparer les programmes transcriptionnels apoptotiques déclenchés par l'activation de l'HSP par le glucose ou la glucosamine. Les niveaux d'ARNm extraits d'un modèle *in vitro* suite aux traitements ont été évalués par utilisation de la technique de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel couplée à la transcription inverse.

Le troisième objectif était d'établir la dynamique quantitative de modification qualitative et quantitative de Sirt1 et des facteurs apoptotiques protéiques suite aux traitements. Les extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été caractérisés par immunobuvardage et immunofluorescence.

Le quatrième objectif était d'évaluer le potentiel protecteur de Sirt1 chez la cellule bêta dans la résistance au stress engendré par l'activation de l'HSP. Les traitements à la glucosamine d'une lignée de cellule bêta transfectée avec un adénovirus à ARN interférant pour Sirt1 a été utilisé comme modèle *in vitro*.

Le dernier objectif était d'établir un mécanisme moléculaire à la base de l'induction de l'apoptose des cellules bêta impliquant la déacétylase Sirt1. L'étude d'interactions protéiques et de liaisons au promoteur en fonction du temps a été effectuée conjointement à la mesure d'expression génique et protéique.

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS**

## Résumé

*Objectif/Hypothèse* : La promotion de la survie cellulaire observée chez les différents modèles étudiés, par l'implication de Sirt1, est rattachée au métabolisme énergétique et à la concentration glucidique. Le but de cette présente étude était de déterminer si la perturbation de l'activité de Sirt1 est impliquée dans l'induction de l'apoptose activé par la voie de synthèse des hexosamines (HSP). *Méthodologie* : Les cellules bêta pancréatiques Nit-1 ont été exposées à des traitements aigus de glucosamine, qui entre et active directement la voie HSP, pour des temps et doses d'incubation variables. Les niveaux d'expression, la localisation cellulaire et l'activité des marqueurs apoptotiques ont été déterminés par PCR quantitatives, immunobuvardages et co-immunoprécipitations. *Résultats* : La glucosamine a induit l'apoptose des cellules Nit-1 de façon dose et temps-dépendante. Les niveaux protéiques, notamment au cytoplasme, et l'état de glycosylation de Sirt1 ont été modifiés par l'activation de l'HSP en fonction du temps. L'atténuation génétique de l'expression de Sirt1 a sensibilisé la cellule bêta aux événements d'apoptose enclenchés par l'activation de l'HSP. *Conclusion* : Ces découvertes suggère que l'apoptose de la cellule bêta est concomitante avec la glycosylation de Sirt1 causant une diminution des niveaux de Sirt1, et, enfin, provoquant une réduction de son activité anti-apoptotique.

**Hexosamines stimulate apoptosis by altering Sirt1 action and levels in rodent  
pancreatic b-cells**

Mathieu Lafontaine-Lacasse, Geneviève Doré & Frédéric Picard<sup>1</sup>

Centre de recherche de l'institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec,  
Laval University, Québec, QC, Canada, G1V 4G5

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed

Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec

Y3106 Pavillon Marguerite-d'Youville

2725 Chemin Ste-Foy

Québec, QC G1V 4G5

Canada

phone: (418) 656-8711 ext 3737

fax: (418) 656-4942

email: [Frederic.Picard@crhl.ulaval.ca](mailto:Frederic.Picard@crhl.ulaval.ca)

running title: Role of Sirt1 in hexosamine-induced apoptosis

word count: 3396

words in abstract: 150

**ABSTRACT**

*Aims/hypothesis:* The activity and levels of Sirt1, which promotes cell survival in several models, have been shown to be linked to glucose concentrations and cellular energy metabolism. The present study aimed to determine whether impaired Sirt1 activity is involved in the induction of apoptosis by the nutrient-sensing hexosamine biosynthesis pathway (HBP). *Methods:* Pancreatic Nit-1 b-cells were acutely treated at different doses and times with glucosamine, which directly enters and stimulates the HBP. Expression levels, cellular localization, and activity of apoptosis-related markers were determined by qPCR, immunoblotting and co-immunoprecipitation. *Results:* Glucosamine dose- and time-dependently induced Nit-1 cell apoptosis. HBP stimulation time-dependently modified Sirt1 glycosylation status and protein levels, notably in the cytoplasm. Genetic knockdown of Sirt1 expression resulted in higher susceptibility to HBP-stimulated apoptosis. *Conclusions/interpretation:* These findings suggest that HBP-induced b-cell apoptosis is concomitant with Sirt1 glycosylation, triggering a decrease in Sirt1 levels, thus reducing its anti-apoptotic activity.

**Keywords:** Sirt1, glucosamine, hexosamine, beta-cell, apoptosis, glycosylation, E2F1

## INTRODUCTION

Hyperglycemia occurring after a meal or during diabetes or aging is detrimental to several system, especially in sensitive tissues such as the brain and the pancreas, in which it has been shown that prolonged hyperglycemia leads to cell death through apoptotic signals. Pancreatic b-cells suffer from long-term high glucose levels via the induction of oxidative stress, stimulation of pro-apoptotic events, and ATP depletion from reduced glucose metabolism [1-3]. The molecular mechanisms linking hyperglycemia and the induction of apoptotic gene expression are, however, not fully determined.

Glucose metabolism through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) has been hypothesized to mediate many of the adverse effects of hyperglycemia and to be involved in the pathogenesis of type 2 diabetes and glucose toxicity [4-6]. Rate-limiting enzymes in the HBP are glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), which catalyzes the formation of glucosamine-6-phosphate from fructose-6-phosphate and glutamine, and O-glucosamineacetyl transferase (OGT), which attaches a UDP-acetylglucosamine group to a target protein and is over-expressed in pancreas. Adipocytes [7], fibroblasts, and rodents [4, 8-10] exposed to glucosamine, which directly enters and stimulates the HBP, develop insulin resistance. In addition, HBP activation induces defects in insulin production and secretion by attenuating the activity of glucokinase in b-cells [8, 11, 12]. Similar to animals exposed to glucosamine, transgenic animals overexpressing GFAT either in skeletal muscle, fat, or liver also develop insulin resistance [5, 9]. Less is known about the effects of HBP in humans. Although GFAT levels have been shown to correlate inversely with glucose disposal rate [13] and fasting glycemia [14] in humans, this issue remains controversial, as others have found that HBP has no impact on insulin sensitivity [15]. In contrast, stimulation of HBP by glucosamine was demonstrated to cause apoptosis in both rodent [2, 16, 17] and human [18] pancreatic b-cells, despite the upregulation of cell survival factors such as MafA [19].

Transcription factors and other protein components of the nucleus can become glycosylated, which triggers rapid change of affinity, specificity and stability of

components in protein complexes. For example, this applies in b-cells to PDX-1 [20, 21] and Hsp60, which detaches from Bax upon HBP stimulation and triggers Bax translocation to the mitochondria [22].

SIRT1 is a deacetylase enzyme mostly located in the nucleus but also found in the cytoplasm under certain conditions [23]. Its NAD-dependent activity suggests that this protein may sense the metabolic state of cells and modulate gene expression accordingly. SIRT1 was shown to impact on cell survival through physical binding with p53, HSF1, Hif-2a, FOXO and Ku70 ([24, 25] and reviewed in [26]). Importantly, SIRT1 and its yeast homolog SIR2 appear to be very sensitive to changes in cellular glucose content such as those occurring upon caloric restriction [27-33]. In cultured pancreatic beta cells, overexpression of Sirt1 was shown to protect against cytokine toxicity [34]. Moreover, glucosamine treatment in the hepatic HepG2 cell line acutely reduces SIRT1 protein levels [35]. In this context, we postulated the hypothesis that the hexosamine pathway could induce b-cell death through a reduction in SIRT1 level and/or activity due to direct glycosylation of the protein.

## **RESEARCH DESIGN AND METHODS**

### **Cell culture and treatment**

Mouse Nit-1 and rat Rin-m5F cell lines were bought from ATCC (Rockville). Cells were cultured in Ham's F12K medium (Sigma-Aldrich) containing 5mM of glucose added with 1,5g/L sodium bicarbonate and 10% of heat-inactivated dialyzed bovine serum. Cells were cultured at 37°C in a humidified incubator at 5% of CO<sub>2</sub>. Experiments were typically performed at a 80% confluence. Following the treatments, all cells (including those floating in the supernatant) were harvested, centrifuged in collection tubes for mRNA and protein extractions, and were frozen at -20°C until subsequent analysis. Viral production and infection was performed exactly as previously described [36]. Infected cells were kept in a medium containing puromycin throughout the studies.



### **Measurement of cell death**

Cell death and apoptosis were quantified using three complementary approaches to prevent misinterpretation. Cells were harvested by treatment with a cell dissociation buffer (an enzyme free Hank's based solution; GIBCO) and combined to floating cells. Dead cells were counted based on dye exclusion after trypan blue staining in a hemacytometer. Annexin V assays were used to measure cell death through reorganization of phosphatidylserine in cell membrane. Briefly, cells were resuspended in annexin binding buffer (10mM HEPES pH=7,4, 140mM NaCl and 5mM CaCl<sub>2</sub>) containing annexin-V-FITC (Roche Diagnostic) and Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) for 10 min in the dark. Cells were washed three times with ice-cold PBS, plated on slides and allowed to dry. Cells were then coverslipped with MOWIOL 4-88 mounting medium (Calbiochem). TUNEL assays were conducted following exactly as per manufacturer's instructions for adherent cells (Roche Diagnostic). For TUNEL assays, floating cells were not taken into account, which at least underestimated apoptosis ratios. Slides were analyzed by microscopy (IX-81 by Olympus). Pictures were taken using an Evolution<sup>TM</sup> QEi camera and image Pro Plus 6,0 software (Media Cybernetics).

### **RNA analysis and real-time quantitative RT-PCR**

Total RNA from cultured cells was extracted according to the standard protocol provided with RNAspin mini isolation kit (GE Healthcare) and quantified by Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad). A reverse transcription step was carried on 1 µg of the purified RNA, by using oligo dT and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) at 42 °C for one hour. Relative quantification of cDNA amplification was performed on reactions containing 40 ng of cDNA, 0.25 µM of sense and antisense primers, 2 µM of MgCl<sub>2</sub> and SYBR Green JumpStart<sup>TM</sup> Taq ReadyMix<sup>TM</sup> without MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) in a final volume of 20 µL for each reaction. Amplification and detection of specific products were obtained with the Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research) with optimized cycle profile (caution was set to prevent amplification artifacts) for each PCR primers (primer sequences and qPCR protocols available on request). qPCR data were normalized over

HPRT expression (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) used as a housekeeping gene.

### **Protein extraction and western blot analysis**

Cells were scraped in lysis buffer A (10 mM of HEPES pH=7.9, 10 mM of KCl, 100  $\mu$ M of EDTA, 100  $\mu$ M of EGTA, 1 M DTT (1:1000) and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) (1:1000)) and combined to floating cells fraction. NP40 was added to each sample before vigorous mixing and nucleus recovery through centrifugation. Then, nuclei were resuspended in lysis buffer C (20 mM of HEPES pH=7.9, 400 mM of NaCl, 1 mM of EDTA, 1 mM of EGTA, 1 M DTT (1:1000) and Protease Inhibitor Cocktail (1:1000)) and submitted to mixing. Proteins were recovered in the supernatant and dosed on a UV plate reader by DC Protein Assay (Bio-Rad). 20  $\mu$ g of each sample were resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. After a 2-h transfer, membranes were blocked in a 5% milk (in BSA-1X) for 35 minutes. Then, membranes were incubated with different primary antibodies at 4°C overnight against: Bax (1:500) (Santa Cruz sc-526), c-Jun (1:700) (Santa Cruz sc-45), E2F1(1:700) (Santa Cruz sc-193), p53 (1:700) (Santa Cruz sc-6243), p65-NFKB (1:700) (Santa Cruz sc-372), Sirt-1 (1:2000) (Upstate 07-131), ubiquitin(1:700) (Santa Cruz sc-9133), and glycosylated proteins (Affinity BioReagents MA1-072). The measure of actin (1:25000) (Upstate MAB1501) was used as a loading control. The next day, membranes were rinsed four times in wash buffer (TBS 1x with Tween 20 and NP40) before incubation for one hour at 4°C with respective horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000) (Amersham). Membranes were washed four times in wash buffer and tagged proteins were visualized by ECL system (GE Healthcare).

### **Immunofluorescence**

Cells were plated on coverslips and treated with 5 mM of glucosamine for 1, 5 and 24 h. Cells were fixed in methanol at 4 °C for 10 min. After 3 washes with ice cold PBS, non-

specific binding sites were saturated with 1% BSA-PBS for 10 minutes at room temperature. Then, cells were incubated with Bax, c-jun, E2F1, p53, p65 and Sirt-1 antibodies (1:25) in 1% BSA-PBS. Secondary antibodies used were fluorescein (FITC) affinipure goat anti-rabbit or mouse IgG (H+L) (1:1000) (Jackson ImmunoResearch) with nuclear staining with Hoechst 33258 (1:1000) in 1% BSA-PBS. Coverslips were mounted on slides using Vectashield mounting medium (VectorLabs) and analyzed by microscopy (IX-81 by Olympus). Pictures were acquired using an Evolution<sup>TM</sup> QEi camera and image Pro Plus 6,0 software (Media Cybernetics).

### **Chromatin immunoprecipitation**

Nit-1 cells were cross-linked with 1% paraformaldehyde at room temperature after 6, 12, 18 and 24 h of 5 mM glucosamine treatment. Cells were washed three times with ice cold PBS and scraped in ChIP lysis buffer (HEPES 50 mM pH=7.5; 140 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; proteinase inhibitor cocktail 1:1000). Cells were sonicated to shear DNA by repeating seven cycles of sonication: 9 s at 30% of the maximum amplitude (Sonifier Cell Disrupter 185, Branson) with 1 minute pauses of 10 s on dry ice followed by 50 s on ice. After taking fractions of sheared DNA for inputs, samples were pre-cleared with 50  $\mu$ L of Protein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) beads and 20  $\mu$ g salmon sperm ssDNA (Invitrogen) for one hour at 4 °C. Supernatants were then split to incubate with 50  $\mu$ L of beads, 20  $\mu$ g of ssDNA and with 4  $\mu$ g of rabbit IgG (Santa-Cruz, sc-2027) as negative control and with 4  $\mu$ g of E2F1 antibody for ChIP assay and were rocked overnight at 4 °C. On the next day, samples were washed twice with ChIP lysis buffer, one time with ChIP lysis buffer high salt (50 mM HEPES pH=7.5; 0.5 M NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; proteinase inhibitor cocktail 1:1000), twice with wash Buffer (Tris 10 mM pH=8,0; LiCl 250 mM; 0.5% (v/v) NP40; EDTA 1 mM) and twice with TE (Tris 10 mM pH=8.0 and EDTA 10mM). Beads were eluted (Tris pH=8,0; 1% (v/v) SDS, EDTA 10mM) with two rounds of heating at 65 °C separated by vortexing. Combined supernatants and inputs were heated at 65 °C overnight. The next day, DNA were purified using PCR Purification Kit (Quiagen) followed by PCR on a c-myc promoter binding site with specific primers (Forward: 5'-GCGGGGGCTCCTAGATAACTC-3' Reverse: 5'-

CGGCTCCGGGGTGTAAC-3'). Amplification results were obtained by migration on 1% EtBr agarose gel.

### **Statistical Analysis**

Data are presented as means  $\pm$  standard error. The main and interactive effects were analyzed by ANOVA. When justified by ANOVA analysis, differences between individual group means were analyzed by Fisher's PLSD test. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### *HBP stimulation induces apoptosis in b-cells*

Treatment with high glucose concentration (30 mM) did not provide visual evidence of potential effect on growth and survival of NIT-1 pancreatic  $\beta$ -cells (Fig 1B). No significant change in morphology, organization and number of floating cells were observed comparatively to those of control cells. In contrast, HBP stimulation by glucosamine treatment induced a drastic increase in the number of floating cells resulting from disorganization of more than 50% of  $\beta$ -cell colonies (Fig 1C-J). Cells treated with glucosamine lost almost every ultrastructural features such as beta granules and well-developed rough endoplasmic reticulum. These findings were confirmed by Annexin V staining (Fig 1G-I-K). The impact of glucosamine treatment was not due to osmotic or pH modification, as control solutions with mannitol or pH comparable to that of glucosamine did not result in any change in cell death (data not shown). Statistical analysis of cell death ratio indicated that 5 mM glucosamine stimulated cell death within 18 to 24 hours of treatment (Fig. 1L). The significant impact of glucosamine was also observed in rat Rinm5F b-cells (Fig. 1M), indicating that the effect of HBP stimulation on cell death is not species-specific. Further tests using highly sensitive TUNEL assays indicated that a 48 hour-treatment with a lower dose of 1 mM glucosamine also increased cell death (Fig 2).

These findings demonstrate that HBP stimulation even by a low dose of glucosamine induces b-cell apoptosis.

*HBP stimulation modulates the levels and cellular location of pro-apoptotic factors*

Previous studies suggested that glucosamine treatment of rat b-cells results in reduced insulin synthesis [37], and in the inactivation of the IRS1/PI<sub>3</sub>K pathway, leading to increased c-Jun/JNK and a downregulation of FOXO1 activity [18, 37]. In the present study, further analysis of apoptotic pathways by real-time quantitative PCR revealed that glucosamine treatment dose-dependently stimulated the mRNA expression of Myc, Bax, Jun and the p65 unit of NFκB (Fig. 3). In contrast, fatty acid synthase expression levels were significantly down-regulated by glucosamine treatment. However, no change in insulin, Apaf-1, and Sirt1 mRNA levels were observed (Fig. 3).

Determination of protein cellular location and expression levels confirmed the increase in Bax levels upon glucosamine treatment, which was mainly observed in the nucleus (Fig. 4A). Overall ubiquitination of protein did not change upon treatment (Fig. 4A). Consistent with previous findings in hepatic HepG2 cells [35], western blotting of cellular compartments and immunofluorescence revealed a robust decline in the cytoplasmic fraction of Sirt1 24 h after incubation with glucosamine (Fig 4A-B). This diminution in Sirt1 protein expression while mRNA levels remained constant suggests that Sirt-1 protein degradation might be increased by HBP stimulation. Cytoplasmic protein levels of p65-NFκB and p53 were reduced (Fig 4A). Interestingly, E2F1 levels were slightly diminished in the nucleus although E2F1 appeared to translocate to the nucleus after 5 h of treatment (Fig 4B). Consistent with this concept, binding of E2F1 on the Myc promoter was increased after 6 hrs of HBP stimulation, but was greatly reduced at 24 hrs (Fig. 5), suggesting an active contribution to apoptosis.

### *HBP affects Sirt1 level and activity*

Given the possibility that Sirt1 serves as a node interacting with and inhibiting pro-apoptotic factors such as E2F1 and p53 while stimulating anti-apoptotic others such as HSF1, a time-course study was performed to document the decrease in Sirt1 protein level upon glucosamine treatment. A significant reduction was observed both in the cytoplasm and the nucleus 24 hrs after the beginning of the incubation period (Fig. 6A). To determine how the HBP can influence Sirt1, we next postulated that glycosylation could impact on Sirt1 since other post-translational modifications such as sumoylation can modulate its activity [38]. Using an antibody specific for glycosylated modification [39], co-immunoprecipitation assays revealed that, before glucosamine addition, Sirt1 appears to be very slightly glycosylated (Fig. 6B). In sharp contrast, stimulation of the HBP rapidly (within 5 hours) resulted in a robust glycosylation of Sirt1 (Fig. 6B). Because levels of cytoplasmic and nuclear fractions of Sirt1 were not changed during this period (Fig 6A), these findings suggest that HBP stimulation triggers Sirt1 glycosylation, affecting its stability and leading to degradation.

### *Sirt1 knockdown exacerbates apoptotic susceptibility to HBP*

To confirm that reduced Sirt1 contributes to HBP-induced apoptosis, virus-mediated, specific Sirt1 knockdown (T1 KD) [36] was performed in Nit-1 cells, which resulted in a 60% decrease in its protein level (Fig. 6C). In normal condition, death ratios were similar between control and T1KD cells (Fig. 6D). In contrast, compared to control cells, T1 KD cells were significantly more susceptible to apoptosis when incubated with glucosamine (Fig. 6D). These findings further indicate that modulation of Sirt1 contributes to HBP-induced cell death in pancreatic beta cells.

## **DISCUSSION**

It has previously been shown that stimulation of the HBP results in apoptosis in several models of pancreatic b-cells. The findings of the present study indicate that this pathway

rapidly modifies Sirt1 protein by O-glycosylation, altering Sirt1 location, levels, and consequent activity, resulting in concomitant transactivation of pro-apoptotic target genes such as Myc.

Several studies have reported increased Sirt1 protein levels [27, 33, 40] and nuclear accumulation [27] under conditions of low glucose concentrations. In line with this, a recent report showed that glucosamine reduced Sirt1 protein expression in HepG2 cells [35]. These observations suggest that stimulation of HBP by glucosamine affects Sirt1 stability, a concept supported by our findings that glucosamine reduces Sirt1 protein but not mRNA levels (Fig. 3-4), and that glycosylation of Sirt1 is rapidly induced by glucosamine treatment (Fig. 5). Phosphorylation of Sirt1 has been hypothesized to play a significant role in its deacetylase activity [41], and glycosylation was shown to affect the same protein motifs than phosphorylation [3], although the exact site for Sirt1 glycosylation remains unknown at this point. Thus, the balance between phosphorylation and glycosylation, in association with the reported sumoylation modification of Sirt1 [38], could represent a fine-tuning regulatory mechanism of Sirt1 activity. Moreover, prolonged glycosylation was previously shown to modulate protein ubiquitination [42], a mechanism that could have contributed to the decrease in Sirt1 levels in the present study. Given the proposed links between Sirt1 and longevity [43, 44] and the increase in HBP activity shown in aged rats [10], more studies are required to better analyze how HBP stimulation controls Sirt1 protein status.

The present study confirms that HBP stimulation by glucosamine triggers b-cell apoptosis and subsequent cell death, at a dose even lower than those used in previous reports [2, 16-18]. On the one hand, consistent with strong annexin staining, Myc and NF $\kappa$ B transactivation, morphologic differences observed after glucosamine exposure as well as modified expression patterns of genes such as fatty acid synthase (FAS) showed that cell metabolism was robustly altered, likely in a time-dependent manner. On the other hand, the mRNA expression of some pro-apoptotic factors was not significantly changed upon 5 mM glucosamine treatment, suggesting activation of specific pathways implicated in apoptosis. These could be linked to altered mitochondrial function [40] and production of reactive

oxygen species, as Sirt1 controls the expression of UCP2 in pancreatic b-cells [45, 46] and consequently insulin secretion. Indeed, the reduction of Sirt1 protein would likely affect many pathways involved in cell cycle and apoptosis. Previous data indicate that Sirt1 can inhibit E2F1 activity through direct physical interaction [47]. Our present findings suggest that glycosylation of Sirt1 could disrupt its docking to E2F1, which could then stimulate the binding of E2F1 to the Myc promoter (Fig 5), triggering transactivation of the gene and induction of apoptosis. However, to date, attempts to pinpoint one exclusive specific mechanism (e.g. via altered Sirt1 docking to E2F1, FOXO, or HSF1) have not been conclusive, leading to the speculation that Sirt1 acts in intricate, non-independent networks.

In contrast with previous findings that the hyperglycemic condition induces b-cell apoptosis [48, 49], high glucose concentrations in the medium did not result in any sign of cellular death, either morphologic (Fig. 1) or with mRNA expression analysis (Fig. 3). Because metabolism of Nit-1 cells does not appear highly responsive to glucose (e.g. no increase in insulin mRNA expression under 30 mM glucose for 24 hrs, Fig. 3), this discrepancy could be attributable to the use of different cell lines, although this remains to be experimentally tested.

While confirming that stimulation of the HBP triggers b-cell apoptosis, our present findings reveal that this effect is associated with changes in the glycosylation status of Sirt1, which leads to degradation and consequently impaired activity, allowing transactivation of pro-apoptotic genes. The relevance of this novel mechanism remains, however, to be demonstrated in vivo or using isolated islets. In addition, compared to that of other established HBP-induced pro-apoptotic pathways, the relative contribution of this molecular mechanism to overall cell death still to be clarified. Finally, the findings described herein suggest that post-translational modifications of Sirt1 might play an important role in the responses of b-cell to metabolic stresses.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Yves Deshaies for critical reading of the manuscript. M. L.-Lacasse is a recipient from FER, FRSQ and IRSC studentships. F Picard holds a CIHR New Investigator Award (MSH-123508). Grants from the CIHR (MOP-66967) and Diabète Québec supported this work.

**REFERENCES**

- [1] Kaneto H, Xu G, Song KH, et al. (2001) Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 276: 31099-31104
- [2] Anello M, Spampinato D, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AM (2004) Glucosamine-induced alterations of mitochondrial function in pancreatic beta-cells: possible role of protein glycosylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E602-608
- [3] Zachara NE, Hart GW (2004) O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta* 1673: 13-28
- [4] Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318: 1315-1321
- [5] Hebert LF, Jr., Daniels MC, Zhou J, et al. (1996) Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest* 98: 930-936
- [6] Rossetti L, Hawkins M, Chen W, Gindi J, Barzilai N (1995) In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J Clin Invest* 96: 132-140
- [7] Considine RV, Cooksey RC, Williams LB, et al. (2000) Hexosamines regulate leptin production in human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3551-3556
- [8] Shankar RR, Zhu JS, Baron AD (1998) Glucosamine infusion in rats mimics the beta-cell dysfunction of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47: 573-577

- [9] Veerababu G, Tang J, Hoffman RT, et al. (2000) Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes* 49: 2070-2078
- [10] Einstein FH, Fishman S, Bauman J, et al. (2008) Enhanced activation of a "nutrient-sensing" pathway with age contributes to insulin resistance. *FASEB J*
- [11] Balkan B, Dunning BE (1994) Glucosamine inhibits glucokinase in vitro and produces a glucose-specific impairment of in vivo insulin secretion in rats. *Diabetes* 43: 1173-1179
- [12] Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H (2002) Glucosamine-induced beta-cell dysfunction: a possible involvement of glucokinase or glucose-transporter type 2. *Pancreas* 24: 228-234
- [13] Daniels MC, Ciaraldi TP, Nikoulina S, Henry RR, McClain DA (1996) Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in cultured human skeletal muscle cells: relationship to glucose disposal rate in control and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects and regulation by glucose and insulin. *J Clin Invest* 97: 1235-1241
- [14] Monauni T, Zenti MG, Cretti A, et al. (2000) Effects of glucosamine infusion on insulin secretion and insulin action in humans. *Diabetes* 49: 926-935
- [15] Pouwels MJ, Jacobs JR, Span PN, Lutterman JA, Smits P, Tack CJ (2001) Short-term glucosamine infusion does not affect insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2099-2103

- [16] Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE (2001) The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J* 356: 31-41
- [17] Okuyama R, Yachi M (2001) Cytosolic O-GlcNAc accumulation is not involved in beta-cell death in HIT-T15 or Min6. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 366-371
- [18] D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, et al. (2004) Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *Faseb J* 18: 959-961
- [19] Vanderford NL, Andrali SS, Ozcan S (2007) Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 282: 1577-1584
- [20] Akimoto Y, Hart GW, Wells L, et al. (2007) Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology* 17: 127-140
- [21] Gao Y, Miyazaki J, Hart GW (2003) The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys* 415: 155-163
- [22] Kim HS, Kim EM, Lee J, et al. (2006) Heat shock protein 60 modified with O-linked N-acetylglucosamine is involved in pancreatic beta-cell death under hyperglycemic conditions. *FEBS Lett* 580: 2311-2316
- [23] Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 282: 6823-6832

- [24] Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323: 1063-1066
- [25] Dioum EM, Chen R, Alexander MS, et al. (2009) Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 324: 1289-1293
- [26] Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J (2007) Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 21: 1745-1755
- [27] Nedachi T, Kadotani A, Ariga M, Katagiri H, Kanzaki M (2008) Ambient glucose levels qualify the potency of insulin myogenic actions by regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E668-678
- [28] Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305: 390-392
- [29] Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-2128.
- [30] Chen D, Bruno J, Easlou E, et al. (2008) Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev* 22: 1753-1757
- [31] Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, et al. (2007) Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* 4: e76
- [32] Nisoli E, Tonello C, Cardile A, et al. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317

- [33] Kanfi Y, Peshti V, Gozlan YM, Rathaus M, Gil R, Cohen HY (2008) Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett* 582: 2417-2423
- [34] Lee JH, Song MY, Song EK, et al. (2009) Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 58: 344-351
- [35] Sun C, Zhang F, Ge X, et al. (2007) SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6: 307-319
- [36] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429: 771-776
- [37] Andreozzi F, D'Alessandris C, Federici M, et al. (2004) Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 145: 2845-2857
- [38] Yang Y, Fu W, Chen J, et al. (2007) SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 9: 1253-1262
- [39] Sayeski PP, Kudlow JE (1996) Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 271: 15237-15243
- [40] Balestrieri ML, Rienzo M, Felice F, et al. (2008) High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1. *Biochim Biophys Acta* 1784: 936-945
- [41] Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, et al. (2004) Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12130-12135

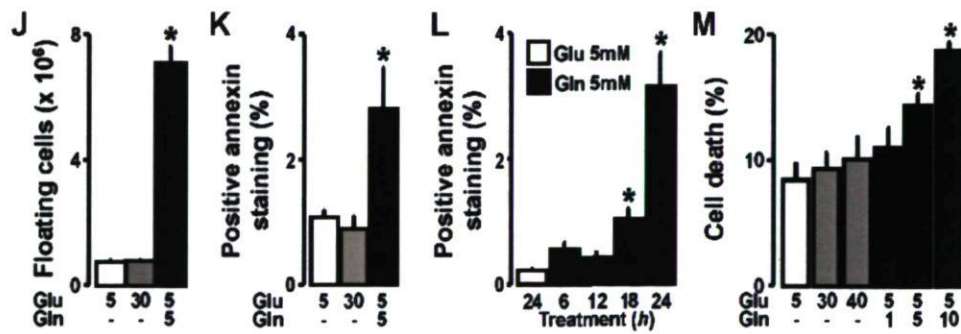
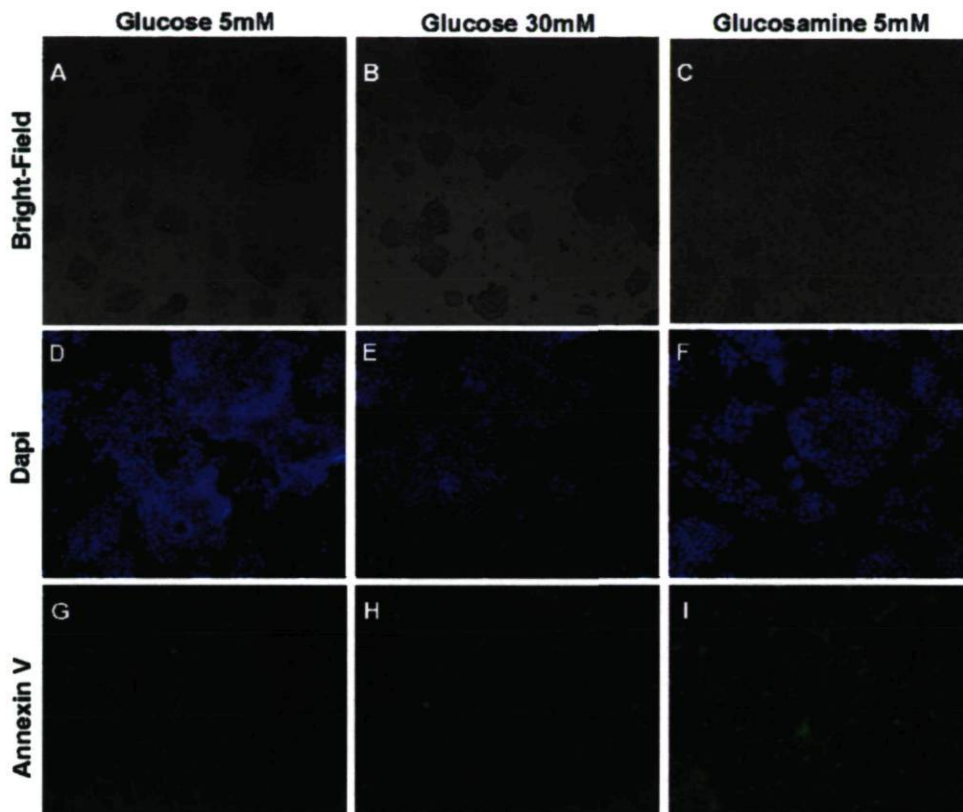
- [42] Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, et al. (2008) Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J* 22: 2901-2911
- [43] Bordone L, Cohen D, Robinson A, et al. (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6: 759-767
- [44] Guarente L (2008) Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 132: 171-176
- [45] Bordone L, Motta MC, Picard F, et al. (2005) Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic beta Cells. *PLoS Biol* 4: e31
- [46] Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, et al. (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2: 105-117
- [47] Wang C, Chen L, Hou X, et al. (2006) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 8: 1025-1031
- [48] Kim WH, Lee JW, Suh YH, et al. (2005) Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54: 2602-2611
- [49] Ortega-Camarillo C, Guzman-Grenfell AM, Garcia-Macedo R, et al. (2006) Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells. *Mol Cell Biochem* 281: 163-171

## FIGURE LEGENDS

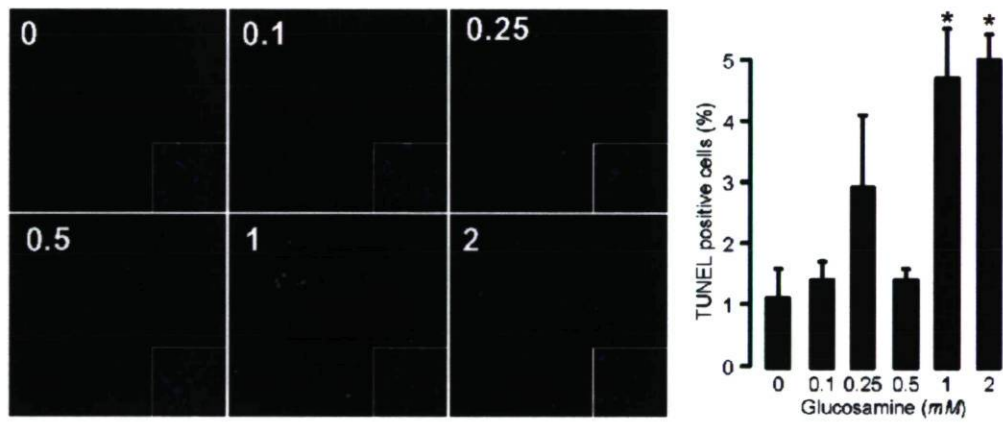
- Figure 1**      Glucosamine triggers cell death in Nit-1 cells. Pictures taken at the end of the treatment period (24 hrs) with focus put on dead floating cells (**A to C**). **D to F**: Cell nucleus fluorescent staining (Hoechst) and **G to I**: Immunofluorescent Annexin V staining. **J**: Death of Nit-1 cells by cell count with Trypan Blue. Data shown were obtained from seven independent experiments done in duplicate. **K**: Cells count of positive annexin staining seen in G-I corrected for total cell number (D-F). **L**: Time-course of positive annexin staining in Nit-1 cells after 5 mM glucosamine treatment. **M**: Dose-response of cell death in Rinm5F cells treated with glucosamine for 24 hours. Data shown were obtained from at least three independent experiments done in duplicate. Bars are mean  $\pm$  S.E.M. \* indicates a significant effect ( $p < 0.05$ ) compared to control group in white bars.
- Figure 2**      HBP stimulation by glucosamine induces apoptosis in pancreatic b-cells. Dose-response of cell death in Nit-1 cells treated with glucosamine for 48 hours. TUNEL assays (representative left panels) were done at the end of the incubation period. Data shown were obtained from at least two independent experiments done in duplicate. Bars are mean  $\pm$  S.E.M. \* indicates a significant effect ( $p < 0.05$ ) compared to control group.
- Figure 3**      Glucosamine triggers an apoptotic transcriptional program in Nit-1 cells after 24 hours of treatment. Quantitative real-time PCR were corrected for mRNA levels of GAPDH as housekeeping gene. Data shown were obtained from three independent experiments done in duplicate. Bars represent fold change compared to the 5mM of glucose control condition (dotted line). Asterisks indicate a statistical difference from control group of glucose 5mM (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).



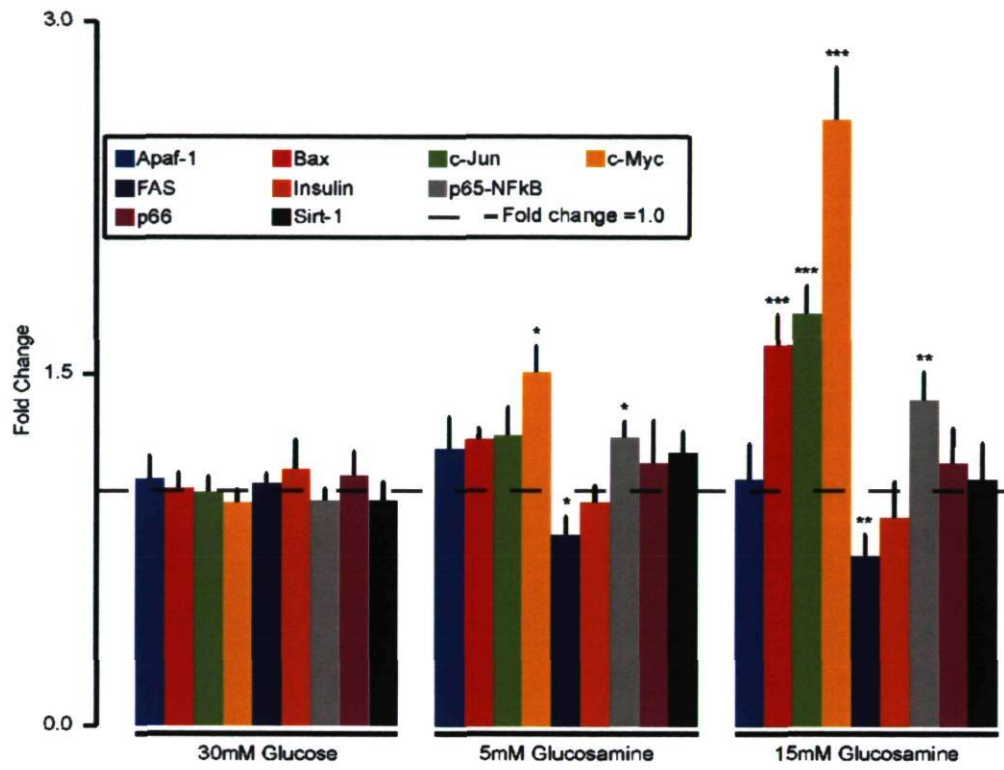
- Figure 4 Effects of glucosamine treatment on protein levels in Nit-1 cells harvested after 24 hours of glucosamine treatment (A). Actin levels are shown as loading controls. (B) Time-course showing protein localization using immunofluorescence in Nit-1 cells treated with 5 mM glucosamine. Cell nuclei are shown in blue (Hoechst).
- Figure 5 Stimulation of HBP by glucosamine activates E2F1. (A) ChIP assay on E2F1 and IgG (control)-immunoprecipitated DNA from Nit-1 cells treated with 5 mM glucosamine for 6 to 24 hours. A sequence containing E2F1 response elements from the Myc promoter was amplified by specific primers. Data shown are representative of three independent experiments.
- Figure 6 Stimulation of HBP by glucosamine alters Sirt1 protein stability and activity. (A) Sirt1 protein levels at 0-24 hours after glucosamine exposure in Nit-1 cells. (B) Glycosylation status of Sirt1 before and 5 hours after glucosamine exposure in Nit-1 cells. Data shown are representative of three independent experiments done in duplicate. (C) Sirt1 protein levels in Nit-1 cells infected with viruses produced through an empty (pSuper) plasmid, or with a sequence specifically targeting Sirt1 (T1 KD) [36]. (D) Cell death in infected cells (see C) incubated or not with 5 mM glucosamine for 12 hours. Results are mean  $\pm$  SEM. of three independent experiments done in triplicate. \* indicates significant effect of glucosamine; † indicates significant difference with empty virus.



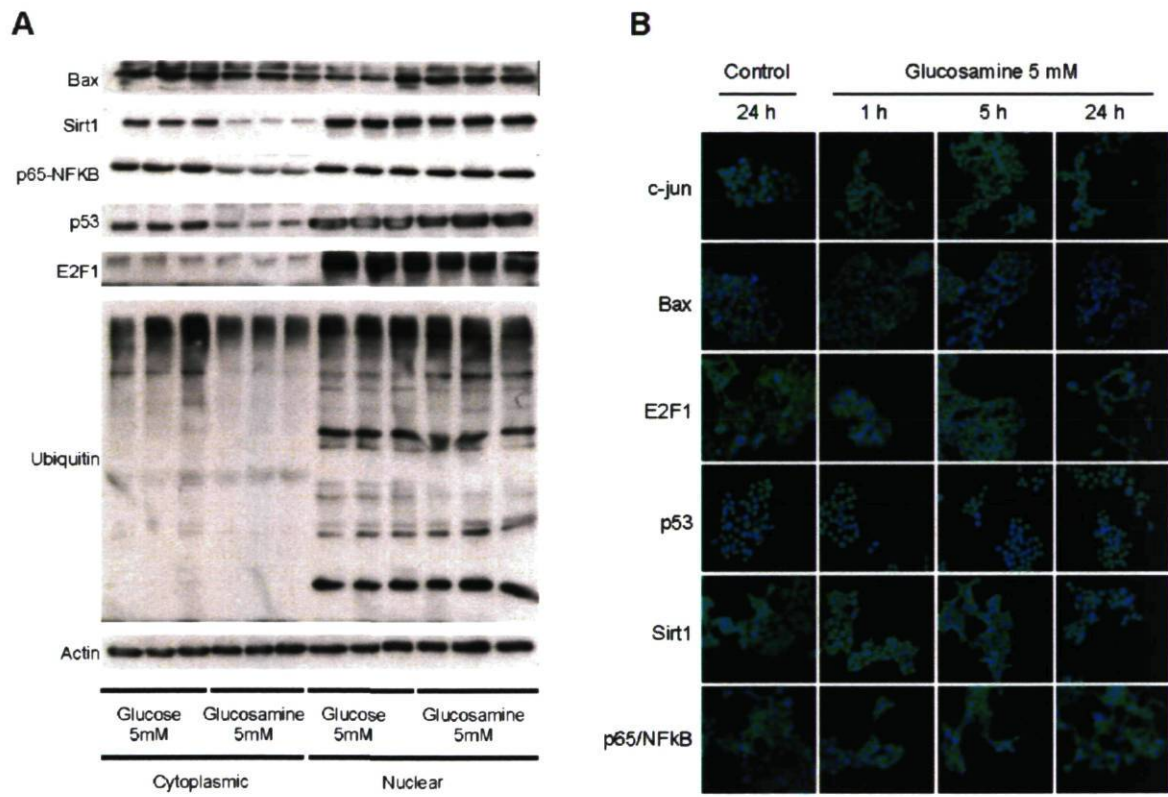
**Figure 1**



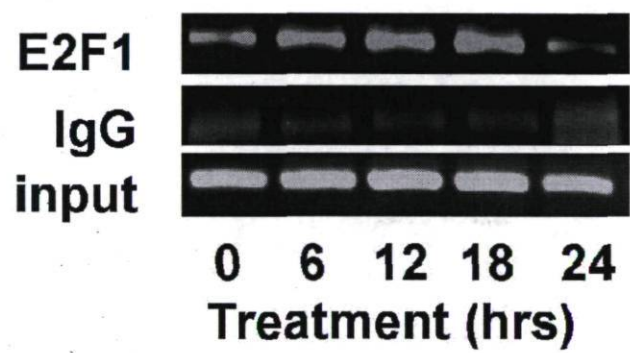
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

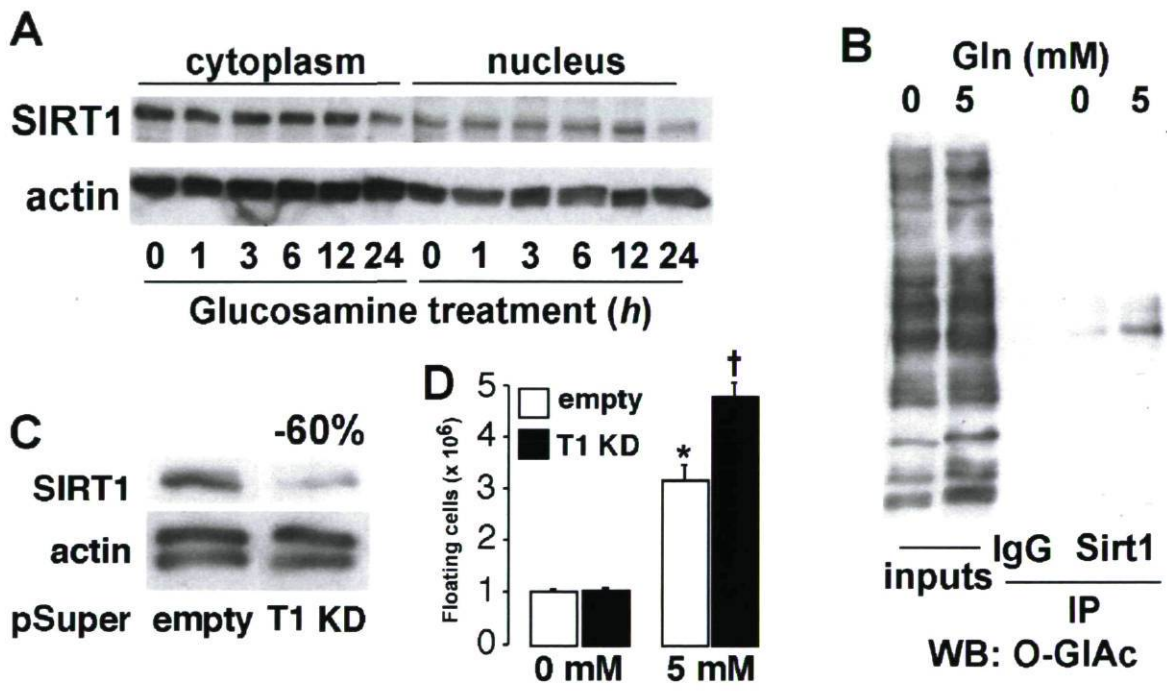


Figure 6

## **CHAPITRE IV : CONCLUSIONS**



Le diabète de type 2 est caractérisé par l'échec de la fonction pancréatique à préserver le processus de compensation permettant de pallier à la perte de la sensibilité à l'insuline. Cette dysfonction résulte en partie du renversement de la prolifération cellulaire vers la surreprésentation des processus apoptotiques [15]. L'hyperglycémie associée au diabète de type 2 est susceptible d'activer la voie de l'HSP, qui agit comme gestionnaire des concentrations non métabolisés par les voies standards. La principale conséquence de cette activation est l'augmentation du processus de l'O-GlcNAc des protéines régulatrices des fonctions cellulaires [69]. De plus, le corépresseur nucléaire Sirt1, par son activité déacétylase, est sensible à l'état métabolique de la cellule en raison de sa dépendance enzymatique envers le ratio  $NAD^+/NADH$  [153]. Ce facteur est également un fin régulateur des fonctions métaboliques et une protéine importante impliquée dans la destinée cellulaire. Enfin, en se situant au carrefour entre la réponse métabolique et les processus de survie, le présent ouvrage propose que la protéine Sirt1 soit impliquée dans la protection de la cellule bêta pancréatique contre l'apoptose induite par l'activation de l'HSP.

L'exposition de la cellule bêta pancréatique Nit-1 au glucose et à la glucosamine a montré que ces composés n'ont pas le même potentiel d'activation de l'HSP pour ce modèle *in vitro*. L'analyse qualitative des cultures en champs clair après 24h de traitement a permis d'observer une augmentation très marquée de la désorganisation des îlots cellulaire lors de la présence de 5mM de glucosamine. Le nombre de cellules flottantes colorées au bleu Trypan, donc, morte, en apoptose ou en nécrose, a corrélé les ces observations par un accroissement d'environ sept fois la quantité retrouvée pour une condition mimant l'hyperglycémie et de celle retrouvée pour le groupe contrôle. Le changement de couleur du milieu de culture observé après ajout de glucosamine a d'abord soulevé un doute quant à l'implication d'un changement drastique de pH pour expliquer la forte hausse de mort cellulaire. Cependant, l'utilisation parallèle d'un milieu sans glucosamine à pH acide, équivalent à celui du milieu avec glucosamine-HCl, n'a pas induit de mort cellulaire (données non présentées). Ainsi, le marquage à l'annexine-V, qui permet de mesurer l'insertion ectopique de phosphatidylsérine sur la surface externe de la membrane cellulaire, ont confirmé les dommages associés à la mort cellulaire uniquement pour le traitement avec la glucosamine. Plusieurs études ont rapporté une augmentation

significative de la mort cellulaire suite à l'exposition de différents modèles *in vitro* à des concentrations équivalentes ou supérieures de glucosamine [117] [234, 235]. Par contre, le type cellulaire employé dans cette présente étude n'a pas permis de démontrer l'impact de l'activation de l'HSP par une situation de surcharge glucidique. La capacité métabolique élevée ou la faible capacité de stimulation indirecte de ce modèle *in vitro* en situation d'exposition à des doses aiguës de glucose pourraient un facteur qui permet d'expliquer ces observations.

Également, cette hausse de mort cellulaire suite au traitement avec la glucosamine dans le modèle Rin-m5f [117] a aussi été observée, ce qui a éliminé la possibilité d'un effet spécifique à la lignée cellulaire Nit-1. De plus, des données préliminaires dans le laboratoire ont aussi montré la susceptibilité des cellules Neuro2A à l'apoptose par activation de l'HSP (données non présentées). L'expression élevée de l'OGT chez la cellule neuronale différenciée, comme pour la cellule bêta, serait une cause de cette observation puisque des traitements similaires sur d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes embryonnaires de souris, n'ont pas induit de mort cellulaire (données non présentées). Ainsi, l'activation directe de la voie HSP par la glucosamine est rattachée à l'augmentation de la mort cellulaire pour les cellules pancréatiques Nit-1.

Le modèle de cellules Nit-1 a montré que le processus de mort cellulaire était dépendant de la dose et du temps d'exposition. L'utilisation du marquage par TUNEL a permis de mesurer le niveau minimale de susceptibilité apoptotique du modèle à des doses d'exposition aiguë à la glucosamine. Malgré l'atteinte du seuil de significativité avec une concentration de 1mM de glucosamine, qui est grandement supérieure au dosage plasmatique retrouvée chez les individus ingérant la posologie normale de trois capsules de 500mg de glucosamine, cette dose a été utilisée sur une période de 48h et ne peut être représentative d'une exposition chronique régulière. Par contre, la concentration réelle de glucosamine dans l'environnement des îlots pancréatique ainsi que la captation *in vivo* de la cellule bêta sont inconnues, d'où l'incapacité d'établir un lien causale à ce jour. De plus, l'utilisation d'une fenêtre cinétique plus large et plus définie avec une dose constante serait très utile afin de caractériser avec précision et plus de justesse la dynamique apoptotique de

ces cellules sous l'effet de la glucosamine. L'emploi d'un outil de mesure du clivage de la caspase-3 pourrait faciliter grandement cette mesure et ajouter une preuve supplémentaire aux évidences obtenues dans cette étude. Néanmoins, notre modèle a montré une sensibilité à l'activation directe de l'HSP par la glucosamine sur la survie de la cellule bêta, ce qui nous a permis de mesurer l'impact sur l'expression génique du traitement.

Le portrait d'expression génique a confirmé le profil apoptotique obtenu par les observations morphologiques identifiées pour le traitement des cellules Nit-1 avec la glucosamine. Les niveaux de transcription pour les facteurs c-Myc, c-Jun, Bax et p65-NFκB ont démontré un débalancement proportionnel des voies apoptotiques et du contrôle du cycle cellulaire uniquement pour les doses croissantes de glucosamine. La modulation par l'exposition au glucose n'a pas été enregistrée, ce qui a confirmé l'absence de changements dans l'organisation physiologique des cultures. La différence significative de l'expression des facteurs avec la glucosamine ont montré une spécificité dans l'activation des voies de réponses aux stress appliqués, puisque l'expression d'autres facteurs proapoptotiques comme Apaf-1 n'a pas changé avec les traitements. Bien entendu, l'expression génétique n'est pas un gage absolu de l'absence de changement de l'expression protéique. Par contre, un changement en amont de la traduction a généralement des conséquences sur l'expression de la protéine. Certains facteurs, ici avec expressions modifiées, comme Bax [224] et p65-NFκB [198] ont été associés à Sirt1 dans les processus de survie cellulaire. De plus, l'expression de la synthèse des acides gras a diminué de façon significative avec les traitements de glucosamine ce qui peut suggérer un débalancement important du métabolisme de la cellule bêta, puisque cette protéine a été associée en partie dans l'induction de l'apoptose et le problème de sécrétion d'insuline [236]. Cependant, la capacité de production d'insuline n'est pas perturbée par les traitements avec une expression constante du gène de l'insuline.

L'analyse des fractions protéiques cytoplasmique et nucléaire a révélé une perturbation dans la localisation, l'expression de Sirt1 et de certains facteurs qui lui ont été associés dans le contrôle de la survie cellulaire [220] [225] [229], ce qui nous a poussé à identifier un mécanisme qui implique Sirt1 dans la prévention de la mort cellulaire causée

l'activation de l'HSP. D'abord, les réductions des niveaux de p53, p65-NFκB et Sirt1 dans le cytoplasme ont suggéré le potentiel de relocalisation au noyau. Mis-à-part la combinaison d'observations montrant une tendance à la hausse de translocation nucléaire de p53, normalement associée à la survie cellulaire par contrôle du stress oxydatif [212], par immunobuvardage et immunofluorescence, le recrutement nucléaire n'est pas apparent pour les autres facteurs. Cependant, la translocation observée de Bax au noyau ou en périphérie est un signe de sa redistribution dans les membranes des organelles, qui est rattachée à l'induction de l'apoptose par accumulation de ROS au réticulum endoplasmique [237]. Enfin, l'effet majeur à constater est la diminution globale des niveaux protéiques de Sirt1. Ce résultat est différent du maintien de sa transcription génique avec les différents traitements avec la glucosamine. Il est ici suggéré que la stabilité de la protéine pourrait être diminuée par altération d'interaction protéine-protéine ou par modification post-traductionnelle. La réduction des niveaux protéiques de Sirt1 a aussi été observée dans les cellules hépatiques [178] suite à des traitements à la glucosamine. Ainsi, l'effet protecteur de Sirt1 serait perdu par altération de ses niveaux et de sa localisation. L'utilisation de méthodes de fractionnement du contenu cellulaire ou de co-localisations fluorescentes, par exemple pour les mitochondries ou le réticulum endoplasmique, pourrait aider à détailler la dynamique des changements observés en utilisant plusieurs points de référence dans le temps.

Ainsi, cette réduction des niveaux protéiques de Sirt1 et les changements d'expression de facteurs cibles de cette protéine ont conduit à la détermination d'un mécanisme pouvant relier ces observations à la diminution de la survie des cellules Nit-1 suite à l'exposition à la glucosamine. Le processus d'O-GlcNAc a été identifié comme l'élément terminal de l'activation de l'HSP. Donc, il a été proposé que cette modification post-traductionnelle, sous contrôle d'un processus senseur de l'environnement métabolique [75], puisse contribuer à son instabilité et/ou la perte de son activité. Les expériences de co-immunoprécipitations entre Sirt1 et les protéines glycosylées ont montré qu'après 5h d'exposition à la glucosamine, une augmentation substantielle de la glycosylation de Sirt1 par rapport au contrôle. Le changement d'état de cette protéine pourrait être un mécanisme qui protège temporairement Sirt1 contre la dégradation [136], qui est ensuite perdu par

exposition prolongée, mais, qui en retour, change son affinité pour la déacétylation de certaines cibles métaboliques impliquées dans la survie cellulaire [73] [221]. Cette modification post-traductionnelle a aussi montré une dépendance au temps d'exposition, qui corrobore l'observation séquentielle de l'initiation de la réduction des niveaux protéiques de Sirt1 à 12h post-traitement et l'augmentation significative de la mort cellulaire par exposition à la glucosamine. Cette étude a montré pour la première fois que Sirt1 est sensible à l'O-GlcNAc par activation directe de la voie. Bien que des études *in vivo* par infusion de glucosamine ou des traitements par culture primaire d'îlots pancréatiques doivent être effectuées pour valider le processus de glycosylation, l'utilisation de notre modèle pour identifier la localisation du dérivé aminé modifié par O-GlcNAc pourrait s'avérer utile. L'implication d'un résidu important pour l'activité catalytique de Sirt1 ou sensible à d'autres modifications post-traductionnelles, comme la sumoylation [176] et la phosphorylation [175], pourrait être obtenu en caractérisant la protéine modifiée à partir de notre modèle *in vitro*.

L'activité de déacétylation de Sirt1 sur plusieurs cibles protéiques est impliquée dans une multitude de voie métabolique, dont la survie cellulaire. Le moyen employé dans notre étude pour évaluer le potentiel protecteur de Sirt1 a été l'atténuation de son expression protéique par interférence en ARN suite à l'expression virale. La comparaison avec un modèle transfecté avec un vecteur ne contenant pas l'ARN interférant de Sirt1 a démontré la vulnérabilité accrue du modèle Nit-1 présentant une réduction de plus de 60% dans l'expression protéique de Sirt1 lors de l'exposition à la glucosamine. Les études de surexpression par la même technique n'ont pu être complétées en raison d'un effet sur la mort cellulaire d'un vecteur vide différent de celui employé pour l'atténuation. L'augmentation des niveaux de Sirt1, par surexpression, en situation d'exposition à des cytokines pro-inflammatoires a montré une protection accrue de la cellule bêta aux processus d'apoptose [198]. Malgré tout, la potentialisation de la mort cellulaire par cette manipulation *in vitro* a permis de confirmer l'implication de Sirt1 dans l'apoptose induite par l'activation directe de la voie des hexosamines. Cette observation s'inscrit dans les éléments qui peuvent contribuer à la diminution de la capacité endocrine totale du pancréas en insuline. L'utilisation d'un modèle *in vivo* de surexpression ou de délétion de Sirt1

exclusive pour les cellules bêta pourrait être des outils intéressants pour confirmer le rôle protecteur de cette sirtuine suite à l'activation délétère de la voie des hexosamines dans la dysfonction pancréatique.

Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été soulevées dans cette étude pour concilier les découvertes de la glycosylation de Sirt1 avec l'augmentation de la mort cellulaire associée à la réduction des niveaux de la sirtuine. Malheureusement, aucune explication complète n'a pu être découverte. La première hypothèse qui intégrait l'augmentation marquée de l'expression de c-Myc dans l'apoptose [238], la glycosylation de Sirt1 et l'interaction connue d'E2F1 et Sirt1 [225] a généré des résultats qui laissaient présager un mécanisme potentiel. L'augmentation de la liaison physique d'E2F1 sur le promoteur de c-Myc a corrélé avec beaucoup de justesse en fonction du temps avec l'apparition des caractéristiques apoptotiques du modèle Nit-1. Cependant, les essais de co-immunoprécipitations entre Sirt1 et E2F1 n'ont pas donné des résultats constants, qui n'ont pas permis d'associer la mort cellulaire à ce processus. Ainsi, le même type de conclusion a été tiré dans la recherche de dissociation d'un partenaire physique par glycosylation de Sirt1 pour Foxo1. Par contre, l'emploi d'un anticorps pour la forme phosphorylée de Foxo1 n'était peut être pas adéquate pour mesurer cette interaction. C'est pourquoi il serait intéressant de rattacher l'activité déacétylase de Sirt1, sous contraintes cinétiques serrées, avec la liaison de la forme acétylé des isoformes de Foxo avant d'éliminer complètement cette possibilité. Enfin, la découverte de l'interaction de Sirt1 et HSF1 par Westerheide [229] nous a amené à vérifier l'implication de la perte d'une réponse de résistance au stress par les chaperones moléculaires par glycosylation de Sirt1 par exposition dépendante du temps à la glucosamine. Cette fois, l'anticorps HSF1 utilisé n'a pas donné des résultats satisfaisants quant à la qualité de l'immunoprécipitation de la chromatine sur le promoteur d'hsp70 et de l'interaction avec Sirt1. Malgré tout, en se basant sur la structure du complexe HSF1/Sirt1 sur le promoteur de la chaperone, une immunoprécipitation de la chromatine indirecte par Sirt1 a été effectué, mais n'a toujours pas donné des résultats reproductibles.

Bref, si la nouvelle étude amène ici de nouvelles pistes innovatrices et démontre la contribution de Sirt1 à l'apoptose induite par l'activation de l'HSP, elle laisse également en

suspend le mécanisme moléculaire exact, surtout en ce qui a trait au(x) partenaire(s) de Sirt1 impliqué(s) spécifiquement.

Finalement, l'insertion de l'article en annexe montre que les neurones de régions spécifiques du système nerveux central ont montré une diminution des niveaux d'ARNm de Sirt1 *in vivo* associée au processus du vieillissement. Bien que la mesure d'expression protéique serait ici pertinente, il demeure néanmoins que ces données suggèrent que des fonctions métaboliques importantes, par exemple des différents neurones du noyau arqué, puissent être perturbées par la diminution de l'expression de Sirt1. Ainsi, en combinant les données de la glycosylation de Sirt1 et d'apoptose par activation de l'HSP avec cette réduction de Sirt1 au cerveau, l'accumulation de produits de glycosylation avancée, observée pour des pathologies associées au vieillissement comme la neurodégénération et le diabète de type 2, souligne l'importance *in vivo* d'un système biologique intégré où la glycémie touche plusieurs tissus par concomitante via un mécanisme impliquant, du moins en partie, Sirt1.

## Références

- [1] Waki H, Tontonoz P (2007) Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2: 31-56
- [2] Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145: 2273-2282
- [3] Motoshima H, Wu X, Sinha MK, et al. (2002) Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5662-5667
- [4] Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, et al. (2008) General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med* 359: 2105-2120
- [5] World Health Organization (2006) Fact Sheet no.311
- [6] Elayat AA, el-Naggar MM, Tahir M (1995) An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* 186 ( Pt 3): 629-637
- [7] Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, et al. (2005) Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53: 1087-1097
- [8] Bell GI, Polonsky KS (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414: 788-791
- [9] King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21: 1414-1431
- [10] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053
- [11] International Diabetes Federation (2007) *Diabetes Atlas 2006*
- [12] Mathis D, Vence L, Benoist C (2001) beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414: 792-798
- [13] Eizirik DL, Colli ML, Ortis F (2009) The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 5: 219-226
- [14] Leung N, Sakaue T, Carpentier A, Uffelman K, Giacca A, Lewis GF (2004) 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: 204-213
- [15] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110
- [16] Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802-1812
- [17] Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96
- [18] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-668



- [19] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336
- [20] Perreault M, Marette A (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-1143
- [21] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808
- [22] Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-362
- [23] Abel ED, Peroni O, Kim JK, et al. (2001) Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409: 729-733
- [24] Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46
- [25] Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. (2008) Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584-1594
- [26] Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, et al. (2004) Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in betaIRKO mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E41-49
- [27] Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, et al. (2002) beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet* 31: 111-115
- [28] Okada T, Liew CW, Hu J, et al. (2007) Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8977-8982
- [29] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391: 900-904
- [30] Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, et al. (2006) Ablation of PDK1 in pancreatic beta cells induces diabetes as a result of loss of beta cell mass. *Nat Genet* 38: 589-593
- [31] Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, et al. (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest* 110: 1839-1847
- [32] Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, et al. (2007) Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117: 246-257
- [33] Steil GM, Trivedi N, Jonas JC, et al. (2001) Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E788-796
- [34] Hino S, Yamaoka T, Yamashita Y, Yamada T, Hata J, Itakura M (2004) *In vivo* proliferation of differentiated pancreatic islet beta cells in transgenic mice expressing mutated cyclin-dependent kinase 4. *Diabetologia* 47: 1819-1830
- [35] Uchida T, Nakamura T, Hashimoto N, et al. (2005) Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat Med* 11: 175-182

- [36] Zhong L, Georgia S, Tschen SI, Nakayama K, Nakayama K, Bhushan A (2007) Essential role of Skp2-mediated p27 degradation in growth and adaptive expansion of pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 117: 2869-2876
- [37] Gupta RK, Gao N, Gorski RK, et al. (2007) Expansion of adult beta-cell mass in response to increased metabolic demand is dependent on HNF-4alpha. *Genes Dev* 21: 756-769
- [38] Rosen ED, Kulkarni RN, Sarraf P, et al. (2003) Targeted elimination of peroxisome-activated receptor gamma in beta cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 23: 7222-7229
- [39] van Citters GW, Kabir M, Kim SP, et al. (2002) Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5191-5198
- [40] Buteau J, Spatz ML, Accili D (2006) Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes* 55: 1190-1196
- [41] Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H, Drucker DJ (2005) beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes* 54: 482-491
- [42] Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, et al. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422: 173-176
- [43] Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, et al. (1997) Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 100: 2729-2736
- [44] Imai J, Katagiri H, Yamada T, et al. (2008) Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322: 1250-1254
- [45] Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, et al. (2007) Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6247-6252
- [46] Schinner S, Ulgen F, Papewalis C, et al. (2008) Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules. *Diabetologia* 51: 147-154
- [47] Doria A, Patti ME, Kahn CR (2008) The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab* 8: 186-200
- [48] Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, et al. (2003) Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 568-572
- [49] Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38: 320-323
- [50] Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, et al. (2007) Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 117: 2155-2163
- [51] Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K (2008) Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes* 57: 645-653
- [52] Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, et al. (2003) Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112: 1831-1842

- [53] Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP (2002) A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12363-12368
- [54] Stefan N, Stumvoll M, Bogardus C, Tataranni PA (2003) Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E1156-1161
- [55] El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, et al. (2003) Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144: 4154-4163
- [56] Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M (2004) Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia* 47: 806-815
- [57] Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (2003) Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52: 726-733
- [58] Lupi R, Del Guerra S, Fierabracci V, et al. (2002) Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin. *Diabetes* 51 Suppl 1: S134-137
- [59] Liadis N, Salmena L, Kwan E, et al. (2007) Distinct in vivo roles of caspase-8 in beta-cells in physiological and diabetes models. *Diabetes* 56: 2302-2311
- [60] Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110: 851-860
- [61] Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K (2008) The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 149: 2208-2218
- [62] Danial NN, Walensky LD, Zhang CY, et al. (2008) Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival. *Nat Med* 14: 144-153
- [63] Huang CJ, Lin CY, Haataja L, et al. (2007) 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: 2016-2027
- [64] Yusta B, Baggio LL, Estall JL, et al. (2006) GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* 4: 391-406
- [65] Scheuner D, Vander Mierde D, Song B, et al. (2005) Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 11: 757-764
- [66] Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ (2008) Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 118: 3378-3389
- [67] Lin CY, Gurlo T, Haataja L, Hsueh WA, Butler PC (2005) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6678-6686
- [68] Torres CR, Hart GW (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem* 259: 3308-3317

- [69] Love DC, Hanover JA (2005) The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005: re13
- [70] Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007) Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446: 1017-1022
- [71] Chou TY, Hart GW, Dang CV (1995) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270: 18961-18965
- [72] Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens. *J Biol Chem* 277: 19229-19235
- [73] Yang WH, Kim JE, Nam HW, et al. (2006) Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* 8: 1074-1083
- [74] Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108: 1341-1348
- [75] Marshall S (2006) Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE* 2006: re7
- [76] Eguchi S, Oshiro N, Miyamoto T, et al. (2009) AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes Cells* 14: 179-189
- [77] Bouche C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB (2004) The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev* 25: 807-830
- [78] Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L (1997) Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 99: 2173-2182
- [79] Wells L, Vosseller K, Hart GW (2003) A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol Life Sci* 60: 222-228
- [80] Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, et al. (2006) Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 354: 795-808
- [81] Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG (2009) Effect of glucosamine or chondroitin sulfate on the osteoarthritis progression: a meta-analysis. *Rheumatol Int*
- [82] Heart E, Corkey RF, Wikstrom JD, Shirihai OS, Corkey BE (2006) Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E143-E148
- [83] Hebert LF, Jr., Daniels MC, Zhou J, et al. (1996) Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *J Clin Invest* 98: 930-936
- [84] Cooksey RC, Hebert LF, Jr., Zhu JH, Wofford P, Garvey WT, McClain DA (1999) Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology* 140: 1151-1157
- [85] Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991) Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis.

- Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem* 266: 10155-10161
- [86] Hazel M, Cooksey RC, Jones D, et al. (2004) Activation of the hexosamine signaling pathway in adipose tissue results in decreased serum adiponectin and skeletal muscle insulin resistance. *Endocrinology* 145: 2118-2128
- [87] Tang J, Neidigh JL, Cooksey RC, McClain DA (2000) Transgenic mice with increased hexosamine flux specifically targeted to beta-cells exhibit hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance. *Diabetes* 49: 1492-1499
- [88] Lubas WA, Hanover JA (2000) Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem* 275: 10983-10988
- [89] Blatch GL, Lassel M (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939
- [90] Jinek M, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurralde E, Hanover JA, Conti E (2004) The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nat Struct Mol Biol* 11: 1001-1007
- [91] Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, et al. (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5735-5739
- [92] Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, et al. (2005) A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11266-11271
- [93] McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, et al. (2002) Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10695-10699
- [94] Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, et al. (2008) Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* 451: 964-969
- [95] Kreppel LK, Hart GW (1999) Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 274: 32015-32022
- [96] Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW (2004) O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *J Biol Chem* 279: 38466-38470
- [97] Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW (2001) Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem* 276: 9838-9845
- [98] Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE (2004) Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J Biol Chem* 279: 53665-53673
- [99] Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, et al. (2005) A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 54: 1214-1221
- [100] Bogardus C, Tataranni PA (2002) Reduced early insulin secretion in the etiology of type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Diabetes* 51 Suppl 1: S262-264
- [101] Farook VS, Bogardus C, Prochazka M (2002) Analysis of MGEA5 on 10q24.1-q24.3 encoding the beta-O-linked N-acetylglucosaminidase as a candidate gene for type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Mol Genet Metab* 77: 189-193

- [102] Forsythe ME, Love DC, Lazarus BD, et al. (2006) *Caenorhabditis elegans* ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11952-11957
- [103] Arias EB, Kim J, Cartee GD (2004) Prolonged incubation in PUGNAc results in increased protein O-Linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* 53: 921-930
- [104] Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW (2008) Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E17-28
- [105] Patti ME, Virkamaki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Jarvinen H (1999) Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* 48: 1562-1571
- [106] Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW (2002) Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5313-5318
- [107] Federici M, Menghini R, Mauriello A, et al. (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106: 466-472
- [108] Ball LE, Berkaw MN, Buse MG (2006) Identification of the major site of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Proteomics* 5: 313-323
- [109] Robinson KA, Ball LE, Buse MG (2007) Reduction of O-GlcNAc protein modification does not prevent insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E884-890
- [110] Buse MG (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1-E8
- [111] Chen G, Liu P, Thurmond DC, Elmendorf JS (2003) Glucosamine-induced insulin resistance is coupled to O-linked glycosylation of Munc18c. *FEBS Lett* 534: 54-60
- [112] Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, et al. (2000) Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *Embo J* 19: 5092-5104
- [113] Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE (2000) Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2820-2825
- [114] Akimoto Y, Kreppel LK, Hirano H, Hart GW (2000) Increased O-GlcNAc transferase in pancreas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 43: 1239-1247
- [115] Kaneto H, Xu G, Song KH, et al. (2001) Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 276: 31099-31104
- [116] Akimoto Y, Hart GW, Wells L, et al. (2007) Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology* 17: 127-140

- [117] D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, et al. (2004) Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *Faseb J* 18: 959-961
- [118] Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 268: 10416-10424
- [119] Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG (2006) Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology* 147: 222-231
- [120] Du XL, Edelstein D, Rossetti L, et al. (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12222-12226
- [121] Zhang W, Patil S, Chauhan B, et al. (2006) FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 281: 10105-10117
- [122] Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, et al. (2008) O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem* 283: 16283-16292
- [123] Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J, 3rd, Montminy M (2008) Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* 319: 1402-1405
- [124] Yang X, Zhang F, Kudlow JE (2002) Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell* 110: 69-80
- [125] Gao Y, Miyazaki J, Hart GW (2003) The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys* 415: 155-163
- [126] Andrali SS, Qian Q, Ozcan S (2007) Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J Biol Chem* 282: 15589-15596
- [127] Vanderford NL, Andrali SS, Ozcan S (2007) Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem* 282: 1577-1584
- [128] Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 49-62
- [129] James LR, Tang D, Ingram A, et al. (2002) Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation. *Diabetes* 51: 1146-1156
- [130] Zou L, Yang S, Champattanachai V, et al. (2009) Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF- $\kappa$ B signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H515-523
- [131] Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N (2009) Loss of p53 enhances catalytic activity of IKKbeta through O-linked beta-N-acetyl glucosamine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3431-3436

- [132] Zachara NE, Hart GW (2004) O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta* 1673: 13-28
- [133] Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, et al. (2001) Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J* 360: 179-188
- [134] Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004) Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 30133-30142
- [135] Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG (2003) High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E424-434
- [136] Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, et al. (2008) Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *Faseb J* 22: 2901-2911
- [137] Han I, Kudlow JE (1997) Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17: 2550-2558
- [138] Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE (2003) O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell* 115: 715-725
- [139] Werstuck GH, Khan MI, Femia G, et al. (2006) Glucosamine-induced endoplasmic reticulum dysfunction is associated with accelerated atherosclerosis in a hyperglycemic mouse model. *Diabetes* 55: 93-101
- [140] Liu K, Paterson AJ, Zhang F, et al. (2004) Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. *J Neurochem* 89: 1044-1055
- [141] Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX (2004) O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10804-10809
- [142] Klar AJ, Fogel S, Macleod K (1979) MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Genetics* 93: 37-50
- [143] Gottlieb S, Esposito RE (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* 56: 771-776
- [144] Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, Allis CD, Broach JR (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* 7: 592-604
- [145] Fritze CE, Verschueren K, Strich R, Easton Esposito R (1997) Direct evidence for SIR2 modulation of chromatin structure in yeast rDNA. *Embo J* 16: 6495-6509
- [146] Smith JS, Boeke JD (1997) An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* 11: 241-254
- [147] Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 388: 900-903
- [148] Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13: 2570-2580
- [149] Tissenbaum HA, Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410: 227-230



- [150] Guarente L, Picard F (2005) Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* 120: 473-482
- [151] Frye RA (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 273-279
- [152] Frye RA (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 793-798
- [153] Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404: 1-13
- [154] Finnin MS, Donigian JR, Pavletich NP (2001) Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat Struct Biol* 8: 621-625
- [155] North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11: 437-444
- [156] Jing E, Gesta S, Kahn CR (2007) SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab* 6: 105-114
- [157] Wang F, Nguyen M, Qin FX, Tong Q (2007) SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 6: 505-514
- [158] Rose G, Dato S, Altomare K, et al. (2003) Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol* 38: 1065-1070
- [159] Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 280: 13560-13567
- [160] Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, et al. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 126: 941-954
- [161] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315-329
- [162] Michishita E, McCord RA, Berber E, et al. (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 452: 492-496
- [163] Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, et al. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 136: 62-74
- [164] Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L (2006) Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 20: 1075-1080
- [165] Tanny JC, Dowd GJ, Huang J, Hilz H, Moazed D (1999) An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* 99: 735-745
- [166] Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403: 795-800
- [167] Huhtiniemi T, Wittekindt C, Laitinen T, et al. (2006) Comparative and pharmacophore model for deacetylase SIRT1. *J Comput Aided Mol Des* 20: 589-599
- [168] Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, et al. (2002) Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418: 344-348

- [169] Rogina B, Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15998-16003
- [170] Berdichevsky A, Viswanathan M, Horvitz HR, Guarente L (2006) *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* 125: 1165-1177
- [171] Bordone L, Cohen D, Robinson A, et al. (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6: 759-767
- [172] Banks AS, Kon N, Knight C, et al. (2008) SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 8: 333-341
- [173] Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-342
- [174] Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, et al. (2007) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25: 543-557
- [175] Sasaki T, Maier B, Koclega KD, et al. (2008) Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One* 3: e4020
- [176] Yang Y, Fu W, Chen J, et al. (2007) SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 9: 1253-1262
- [177] Liang F, Kume S, Koya D (2009) SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*
- [178] Sun C, Zhang F, Ge X, et al. (2007) SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6: 307-319
- [179] Zhang J (2007) The direct involvement of SirT1 in insulin-induced insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 282: 34356-34364
- [180] Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, et al. (2009) SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol* 29: 1363-1374
- [181] Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, et al. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 12: 51-62
- [182] Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP (2005) Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25: 8456-8464
- [183] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127: 1109-1122
- [184] Feige JN, Lagouge M, Canto C, et al. (2008) Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab* 8: 347-358
- [185] Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-1060
- [186] Nisoli E, Tonello C, Cardile A, et al. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317
- [187] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature* 429: 771-776
- [188] Qiao L, Shao J (2006) SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein  $\alpha$  transcriptional complex. *J Biol Chem* 281: 39915-39924

- [189] Liu Y, Dentin R, Chen D, et al. (2008) A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 456: 269-273
- [190] Frescas D, Valenti L, Accili D (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280: 20589-20595
- [191] Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434: 113-118
- [192] Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L (2007) SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 28: 91-106
- [193] Bordone L, Motta MC, Picard F, et al. (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4: e31
- [194] Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, et al. (2005) Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2: 105-117
- [195] Kitamura YI, Kitamura T, Kruse JP, et al. (2005) FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2: 153-163
- [196] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J* 23: 2369-2380
- [197] Ghosh HS, Spencer JV, Ng B, McBurney MW, Robbins PD (2007) Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *Biochem J* 408: 105-111
- [198] Lee JH, Song MY, Song EK, et al. (2009) Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 58: 344-351
- [199] Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH (2008) Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9793-9798
- [200] Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I (2007) Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L567-576
- [201] Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305: 1010-1013
- [202] Qin W, Yang T, Ho L, et al. (2006) Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem* 281: 21745-21754
- [203] Qin W, Zhao W, Ho L, et al. (2008) Regulation of forkhead transcription factor FoxO3a contributes to calorie restriction-induced prevention of Alzheimer's disease-type amyloid neuropathology and spatial memory deterioration. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 335-347
- [204] Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al. (2005) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 280: 40364-40374

- [205] Julien C, Tremblay C, Emond V, et al. (2009) Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 48-58
- [206] McBurney MW, Yang X, Jardine K, et al. (2003) The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 38-54
- [207] Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, et al. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10794-10799
- [208] Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148
- [209] Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149-159
- [210] Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123: 437-448
- [211] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ (2008) miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13421-13426
- [212] Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE (2008) SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2: 241-251
- [213] Kim EJ, Kho JH, Kang MR, Um SJ (2007) Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell* 28: 277-290
- [214] Pillai JB, Isbatan A, Imai S, Gupta MP (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD+ depletion and reduced Sir2alpha deacetylase activity. *J Biol Chem* 280: 43121-43130
- [215] Alcendor RR, Kirshenbaum LA, Imai S, Vatner SF, Sadoshima J (2004) Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res* 95: 971-980
- [216] Chen IY, Lypowy J, Pain J, et al. (2006) Histone H2A.z is essential for cardiac myocyte hypertrophy but opposed by silent information regulator 2alpha. *J Biol Chem* 281: 19369-19377
- [217] Kume S, Haneda M, Kanasaki K, et al. (2006) Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation. *Free Radic Biol Med* 40: 2175-2182
- [218] Kume S, Haneda M, Kanasaki K, et al. (2007) SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem* 282: 151-158
- [219] Nakae J, Cao Y, Daitoku H, et al. (2006) The LXXLL motif of murine forkhead transcription factor FoxO1 mediates Sirt1-dependent transcriptional activity. *J Clin Invest* 116: 2473-2483
- [220] Motta MC, Divecha N, Lemieux M, et al. (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116: 551-563
- [221] Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, et al. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303: 2011-2015

- [222] Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, et al. (2005) SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 16: 237-243
- [223] van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM (2004) FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* 279: 28873-28879
- [224] Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, et al. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305: 390-392
- [225] Wang C, Chen L, Hou X, et al. (2006) Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 8: 1025-1031
- [226] Ohsawa S, Miura M (2006) Caspase-mediated changes in Sir2alpha during apoptosis. *FEBS Lett* 580: 5875-5879
- [227] Gao F, Cheng J, Shi T, Yeh ET (2006) Neddylation of a breast cancer-associated protein recruits a class III histone deacetylase that represses NFkappaB-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 8: 1171-1177
- [228] Kataoka H, Bonnefin P, Vieyra D, et al. (2003) ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* 63: 5785-5792
- [229] Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323: 1063-1066
- [230] Dioum EM, Chen R, Alexander MS, et al. (2009) Regulation of hypoxia-inducible factor 2alpha signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* 324: 1289-1293
- [231] Kim HS, Kim EM, Lee J, et al. (2006) Heat shock protein 60 modified with O-linked N-acetylglucosamine is involved in pancreatic beta-cell death under hyperglycemic conditions. *FEBS Lett* 580: 2311-2316
- [232] Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-2128
- [233] Kanfi Y, Peshti V, Gozlan YM, Rathaus M, Gil R, Cohen HY (2008) Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett* 582: 2417-2423
- [234] Kang ES, Han D, Park J, et al. (2008) O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Exp Cell Res* 314: 2238-2248
- [235] Anello M, Spampinato D, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AM (2004) Glucosamine-induced alterations of mitochondrial function in pancreatic beta-cells: possible role of protein glycosylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E602-608
- [236] Schumann DM, Maedler K, Franklin I, et al. (2007) The Fas pathway is involved in pancreatic beta cell secretory function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2861-2866
- [237] Tonnesen MF, Grunnet LG, Friberg J, et al. (2009) Inhibition of NF{kappa}B or Bax prevents Endoplasmic Reticulum Stress- but not Nitric Oxide-mediated Apoptosis in INS-1E cells. *Endocrinology*
- [238] Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, et al. (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol Cell* 9: 1017-1029

**ANNEXE**

## Résumé

Sirt1 est une déacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup> qui permet de relier le concept du vieillissement avec le métabolisme énergétique. Son implication dans la prévention des maladies neurodégénératives a été suggérée, mais les connaissances sont actuellement limitées en ce qui concerne le changement des niveaux de Sirt1 au cerveau lors du vieillissement. L'étude présentée ici a permis d'observer que l'expression de Sirt1 est modifiée dans des régions spécifiques du cerveau des souris âgées par hybridation *in situ*, et que ces changements sont influencés par le sexe des animaux. Les souris âgées de 12 et 24 mois, comparées à celle de 4 mois, ont montré une expression réduite de Sirt1 spécifiquement dans le noyau arqué (ARC) et le noyau thalamique antéro-ventral (AV), alors que l'expression de Sirt1 dans les autres régions n'a pas changé de façon significative. De plus, les niveaux d'ARNm de Sirt1 de l'organe subfornical (SFO) et de la substance noire (SN) ont présenté une dépendance au sexe de l'animal. Ces découvertes suggèrent que la réduction des niveaux de Sirt1 avec le vieillissement pourrait contribuer à la diminution de son activité et que cette baisse toucherait des noyaux spécifiques.

**Site-specific modulation of Sirt1 mRNA expression in the brain of the aging mouse**

Mathieu Lafontaine-Lacasse<sup>1,2</sup>, Denis Richard<sup>1</sup>, Frédéric Picard<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, 2725 Ch. Ste-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5

<sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Laval University, Québec, QC, Canada, G1K 7P4

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed

Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec

Y3106 Pavillon Marguerite-d'Youville

2725 Chemin Ste-Foy

Québec, QC G1V 4G5

Canada

phone: (418) 656-8711 ext 3737

fax: (418) 656-4942

email: Frederic.Picard@iucpq.ulaval.ca

10 pages

2 figures

The authors declare no actual or potential conflict of interest.



**Abstract**

Sirt1 is a NAD-dependent deacetylase that has been shown as a link between energy metabolism and aging. Its putative role as a target for neurodegenerative disorders has recently been suggested; yet, little is known about the changes that occur in Sirt1 levels in the aging brain. Here we show by *in situ* hybridization that Sirt1 expression is modified in specific areas of the brain in mice upon aging, and that gender also impacts on this regulation. Mice aged 12 and 24 months had a lower Sirt1 expression specifically in the antero ventral thalamic nucleus (AV) and in the arcuate nucleus (ARC) than their young (4 mo) counterparts, whereas changes were either not noticeable or not significantly modulated in other parts of the brain. Regulation of Sirt1 mRNA levels in the subfornical organ (SFO) and in the substantia nigra part compacta (SNC) depended on gender. These findings suggest that reduced Sirt1 levels upon aging could contribute to a lower Sirt1 activity, and that specific nuclei might be particularly affected.

Keywords: mice, aging, sirt1, in situ hybridization; antero ventral thalamic nucleus; arcuate nucleus

## 1. Introduction

Sirt1 is a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase linked to the control of longevity and energy metabolism in several species [5]. Sirt1 promotes neuronal differentiation [12] and survival [2, 3, 15], although studies also showed that Sirt1 inhibition reduces oxidative damage in neurons [16]. Moreover, Sirt1 stimulates astrocyte differentiation from neural precursor cells at the expense of new neurons under oxidative stress [18].

Sirt1 is suggested to contribute to the beneficial impact of calorie restriction on the development of Alzheimer's disease (AD) in mice by being upregulated in the early stage of the disease as a mechanism against neurotoxic insults [19, 20]. In contrast, Sirt1 levels are reduced in the parietal cortex and inversely correlate with tau accumulation in advanced stages of AD in humans [14]. Although these findings suggest that Sirt1 could modulate neuronal fate in the aging brain, little is known about Sirt1 levels in this condition. Thus, we thoroughly analyzed Sirt1 mRNA levels in the brain of male and female mice aged of 4, 12 and 24 months by *in situ* hybridization. Our findings show that Sirt1 is modulated in specific nuclei upon aging, and that gender impacts on this regulation. These data add to current research on the links between aging, energy metabolism, Sirt1, and neurodegenerative disorders.

## 2. Methods

C57BL/6 mice of 4, 12 and 24 months old (4 mice per age group for each gender) were from the National Institute of Aging (USA). Protocols were approved by our institutional animal care committee in accordance with the Canadian Animal Care Committee. Adequate measures were taken to minimize pain. After an overnight fast, brains were harvested after euthanasia, processed for *in situ* hybridization, and analyzed exactly as previously described [13] (Suppl. material for details). A SIRT1 cRNA probe was generated by cloning the partial mouse SIRT1 cDNA (5'-GCTGACGACTTCGACGACGA-3', 5'-CAAGGCGAGCATAGATACCG-3') in pGEM-T [13]. The hybridization signals revealed on NTB2 dipped nuclear emulsion slides were analyzed under a light microscope

(Olympus, BX60) equipped with a black and white video camera (Diagnostic Instruments, RT slider model 2.3.0) coupled to a PC computer by using Image software (Image Pro Plus 6.0, MediaCybernetics). The optical density (OD) of the hybridization signal was measured under darkfield illumination at a magnification of 20X. Saturation of the hybridization signal was avoided by adjusting the exposure time for the image with the strongest hybridization signal sampled for each region in every series. The luminosity of the system was set to the maximum and the saturation warning option was used to visualize saturated regions in the image preview. OD determination was performed on six different fields on both sections for each 4 animals in each groups. The OD was corrected for the background signal. The OD values obtained were then averaged. For each given analyzed area, the densitometric analyses were performed in all the groups without changing the light source of the microscope and the exposure time of the camera. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical differences were analyzed by ANOVA and Fisher's t test (ad hoc) when appropriate. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

Irrespective of age, Sirt1 mRNA was expressed throughout the brain. However, the most intense Sirt1 mRNA expression was found in subfornical organ (SFO), arcuate nucleus (ARC) and paraventricular hypothalamic nucleus (PVN). Quantification of the hybridization signal was performed in nuclei with the most profound age-related modifications in Sirt1 expression. Sirt1 mRNA levels in the antero ventral thalamic nucleus (AV) were 29% lower in female mice aged 12 and 24 months than in their 4 mo old counterparts, whereas, in male mice, a 34% reduction in Sirt1 was observed in 24 mo old animals only (Fig. 1). In contrast, age did not significantly affect Sirt1 expression in the PVT (Fig 1). In the SFO, male mice had 31% lower Sirt1 mRNA levels compared to those in female mice ( $p=0.003$ ) and age was associated with a slight, non-significant reduction in Sirt1 expression in the latter group only ( $p<0.15$ ). A tendency ( $p<0.08$ ) for age-gender interactions was also observed in the substantia nigra compacta (SNC) (Fig. 1).

In the hypothalamus, Sirt1 was highly expressed in the ARC, where in both male and female mice, Sirt1 mRNA levels were strongly decreased upon aging (-16% in males, -28% in females) ( $p < 0.005$ ) (Fig. 2). No statistically significant impact of aging or gender was observed in the PVN and dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH). In contrast, in the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), aging was associated with a 17% increase in Sirt1 expression in male mice only ( $p < 0.08$ ) (Fig. 2). Taken together, these findings suggest that modulation of Sirt1 in aging is gender-dependent and specific to particular areas in the brain.

#### 4. Discussion

Sirt1 could play an important role in defining neuronal fate against oxidative stress, a condition associated with the aging brain. Here, albeit the limitations and cautions imposed by the sole use of in situ hybridization, we show that Sirt1 expression is modulated in the brain during aging in specific nuclei. No change in Sirt1 during aging in key areas involved in AD (e.g. SNC) was observed in the present study, although a tendency for dimorphism was noticed (Fig. 1). These findings support the report of a weak association, in old women only, between AD and three SNPs in the Sirt1 gene [11].

Control of Sirt1 mRNA levels is regulated by CtBP [24] and HuR [1]. Our present findings show that, in addition, Sirt1 expression is affected by gender differences, likely those in sex hormones, which change robustly in aging. Especially, some specific areas showing changes in Sirt1 expression (SFO and hypothalamic nuclei) are highly sensitive to endocrine signaling (for review see [23]). For instance, estrogen provides neuroprotective effects against oxidative stress through mitochondrial regulation [22], which are lost upon menopause. Interestingly, a recent study observed that estrogen treatment stimulates Sirt1 expression in bone cells [10], raising the hypothesis that this effect could be operative in young, but not old neurons. Moreover, interactions of sex hormones on leptin signaling during aging [8] could have contributed, at least in part, to these results, since leptin-deficient *ob/ob* mice have altered Sirt1 regulation in the hypothalamus [21].

Consistent with a recent analysis of Sirt1 distribution [21], Sirt1 was strongly expressed in the hypothalamus, especially in ARC and PVN, key nuclei involved in the control of energy balance. Along with the SFO, these nuclei have a close communication with circulating metabolites, and are involved in the detection of satiety signals. Given its role as a node linking metabolism and transcriptional response through its NAD-dependent activity, modulation of Sirt1 in these nuclei could represent a mechanism by which the brain adapts energy intake to fasting. Young Sirt1 knockout mice show increased food intake [6, 9], whereas reports in mice overexpressing Sirt1 are still controversial [4, 7, 17]. Reduced Sirt1 expression in the ARC in old mice (Fig. 2) could contribute to the fact that the impact of Sirt1 knockout on food intake is lost upon aging [6]. Identification of Sirt1-positive neurons in the ARC and modulation of Sirt1 activity by direct injection of specific pharmacological tools in targeted nuclei should provide a clearer understanding of this issue.

## **5. Acknowledgements**

We thank Julie Plamondon for the cloning of the mSirt1 probe. M. L.-L. is a recipient of FER, FRSQ, and CIHR studentships. F.P. holds a CIHR New Investigator Award. This work was supported by operating grants from the CIHR and FRSQ. The authors declare no actual or potential conflict of interest.

## 5. References

- [1] K. Abdelmohsen, R. Pullmann, Jr., A. Lal, H.H. Kim, S. Galban, X. Yang, J.D. Blethrow, M. Walker, J. Shubert, D.A. Gillespie, H. Furneaux, M. Gorospe, Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression, *Mol Cell* 25 (2007) 543-557.
- [2] D. Alvira, M. Yeste-Velasco, J. Folch, E. Verdaguer, A.M. Canudas, M. Pallas, A. Camins, Comparative analysis of the effects of resveratrol in two apoptotic models: inhibition of complex I and potassium deprivation in cerebellar neurons, *Neuroscience* 147 (2007) 746-756.
- [3] T. Araki, Y. Sasaki, J. Milbrandt, Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration, *Science* 305 (2004) 1010-1013.
- [4] A.S. Banks, N. Kon, C. Knight, M. Matsumoto, R. Gutierrez-Juarez, L. Rossetti, W. Gu, D. Accili, SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice, *Cell Metab* 8 (2008) 333-341.
- [5] N.A. Bishop, L. Guarente, Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans, *Nat Rev Genet* 8 (2007) 835-844.
- [6] G. Boily, E.L. Seifert, L. Bevilacqua, X.H. He, G. Sabourin, C. Estey, C. Moffat, S. Crawford, S. Saliba, K. Jardine, J. Xuan, M. Evans, M.E. Harper, M.W. McBurney, SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice, *PLoS ONE* 3 (2008) e1759.
- [7] L. Bordone, D. Cohen, A. Robinson, M.C. Motta, E. van Veen, A. Czopik, A.D. Steele, H. Crowe, S. Marmor, J. Luo, W. Gu, L. Guarente, SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction, *Aging Cell* 6 (2007) 759-767.

- [8] J.M. Carrascosa, M. Ros, A. Andres, T. Fernandez-Agullo, C. Arribas, Changes in the neuroendocrine control of energy homeostasis by adiposity signals during aging, *Exp Gerontol* 44 (2009) 20-25.
- [9] D. Chen, A.D. Steele, S. Lindquist, L. Guarente, Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1, *Science* 310 (2005) 1641.
- [10] A. Elbaz, D. Rivas, G. Duque, Effect of estrogens on bone marrow adipogenesis and Sirt1 in aging C57BL/6J mice, *Biogerontology* (2009).
- [11] S. Helisalmi, S. Vepsalainen, M. Hiltunen, A.M. Koivisto, A. Salminen, M. Laakso, H. Soininen, Genetic study between SIRT1, PPARD, PGC-1alpha genes and Alzheimer's disease, *J Neurol* 255 (2008) 668-673.
- [12] S. Hisahara, S. Chiba, H. Matsumoto, M. Tanno, H. Yagi, S. Shimohama, M. Sato, Y. Horio, Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 15599-15604.
- [13] Q. Huang, A. Viale, F. Picard, J. Nahon, D. Richard, Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese Lep(ob)/Lep(ob) mice, *Neuroendocrinology* 69 (1999) 145-153.
- [14] C. Julien, C. Tremblay, V. Emond, M. Lebbadi, N. Salem, Jr., D.A. Bennett, F. Calon, Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 68 (2009) 48-58.
- [15] D. Kim, M.D. Nguyen, M.M. Dobbin, A. Fischer, F. Sananbenesi, J.T. Rodgers, I. Delalle, J.A. Baur, G. Sui, S.M. Armour, P. Puigserver, D.A. Sinclair, L.H. Tsai, SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis, *Embo J* 26 (2007) 3169-3179.

- [16] Y. Li, W. Xu, M.W. McBurney, V.D. Longo, SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons, *Cell Metab* 8 (2008) 38-48.
- [17] P.T. Pfluger, D. Herranz, S. Velasco-Miguel, M. Serrano, M.H. Tschop, Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 9793-9798.
- [18] T. Prozorovski, U. Schulze-Topphoff, R. Glumm, J. Baumgart, F. Schroter, O. Ninnemann, E. Siegert, I. Bendix, O. Brustle, R. Nitsch, F. Zipp, O. Aktas, Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors, *Nat Cell Biol* 10 (2008) 385-394.
- [19] W. Qin, T. Yang, L. Ho, Z. Zhao, J. Wang, L. Chen, W. Zhao, M. Thiyagarajan, D. MacGrogan, J.T. Rodgers, P. Puigserver, J. Sadoshima, H. Deng, S. Pedrini, S. Gandy, A.A. Sauve, G.M. Pasinetti, Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction, *J Biol Chem* 281 (2006) 21745-21754.
- [20] W. Qin, W. Zhao, L. Ho, J. Wang, K. Walsh, S. Gandy, G.M. Pasinetti, Regulation of forkhead transcription factor FoxO3a contributes to calorie restriction-induced prevention of Alzheimer's disease-type amyloid neuropathology and spatial memory deterioration, *Ann N Y Acad Sci* 1147 (2008) 335-347.
- [21] G. Ramadori, C.E. Lee, A.L. Bookout, S. Lee, K.W. Williams, J. Anderson, J.K. Elmquist, R. Coppari, Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability, *J Neurosci* 28 (2008) 9989-9996.
- [22] A. Razmara, S.P. Duckles, D.N. Krause, V. Procaccio, Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats, *Brain Res* 1176 (2007) 71-81.



[23] T.A. Roepke, Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms, *J Neuroendocrinol* 21 (2009) 141-150.

[24] Q. Zhang, S.Y. Wang, C. Fleuriel, D. Leprince, J.V. Rocheleau, D.W. Piston, R.H. Goodman, Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 829-833.

## Figure legends

Figure 1 Dark-field photomicrographs of coronal brain sections representing Sirt1 mRNA hybridization signal in the mouse brain, where sections (25  $\mu$ m thick) were obtained from C57BL/6J mice aged of 4 (white), 12 (gray) and 24 months (black).  $n = 3-4$  per group for each gender. AV: Antero Ventral Thalamic Nucleus; PVT: Paraventricular Thalamic Nucleus; SFO: Subfornical Organ; SNC: Substantia Nigra Part Compacta. Data (mean  $\pm$  S.E.M.) were analyzed by ANOVA and Fisher's t test (ad hoc). \* and † indicate a significant affect of age and gender, respectively ( $p < 0.05$ ). See Suppl. material for raw data on statistical analysis.

Figure 2 Dark-field photomicrographs of coronal brain sections representing Sirt1 mRNA hybridization signal in the brain of mice aged of 4 (white), 12 (gray) and 24 months (black).  $n = 3-4$  per group for each gender. Arc: Arcuate Nucleus; PVN: Paraventricular Hypothalamic Nucleus; DMH: Dorsomedial Hypothalamic Nucleus; VMH: Ventromedial Hypothalamic Nucleus. Data (mean  $\pm$  S.E.M.) were analyzed by ANOVA and Fisher's t test (ad hoc). \* and † indicate a significant affect of age and gender, respectively ( $p < 0.05$ ). See Suppl. material for raw data on statistical analysis.

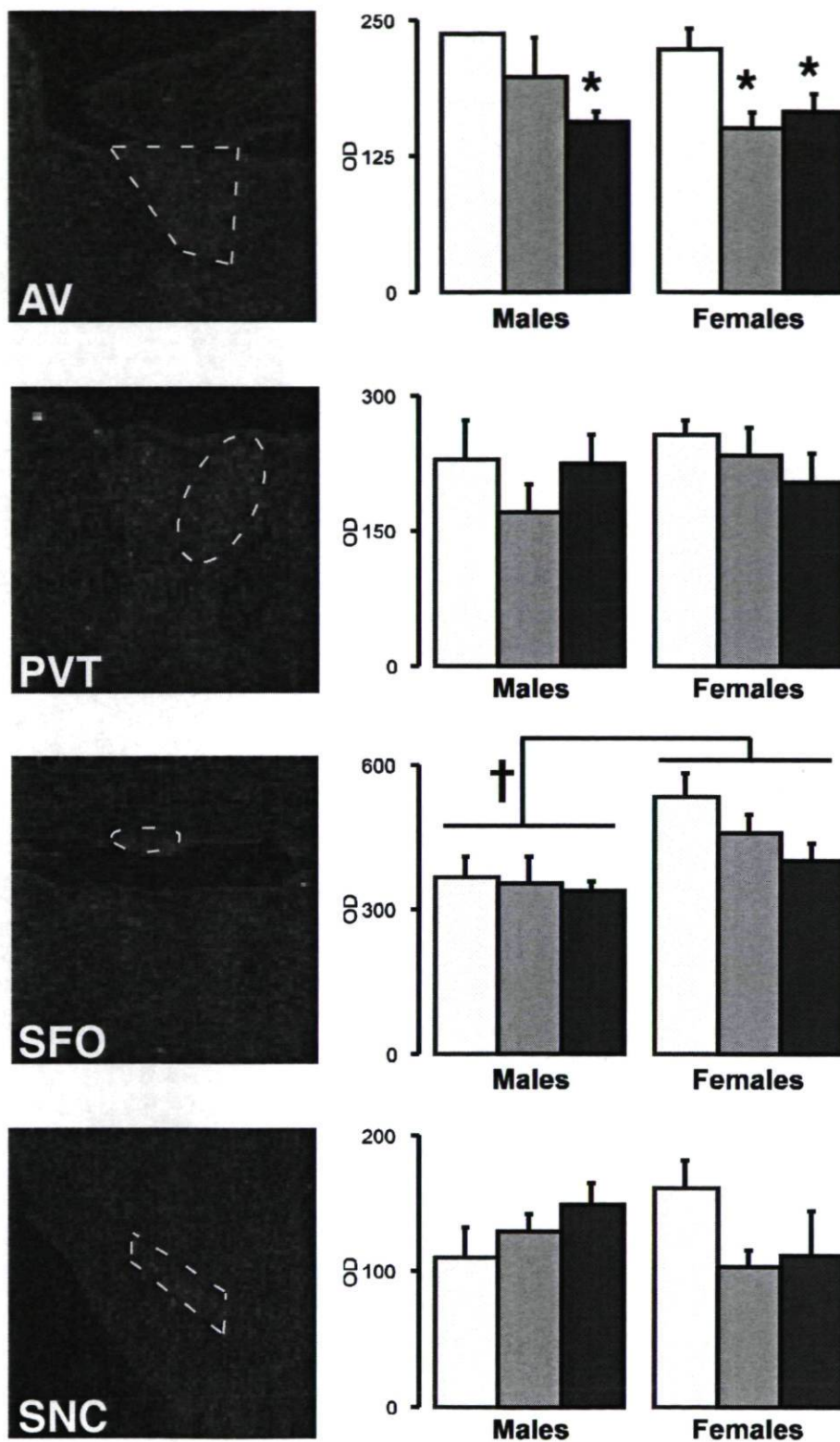


Figure 1

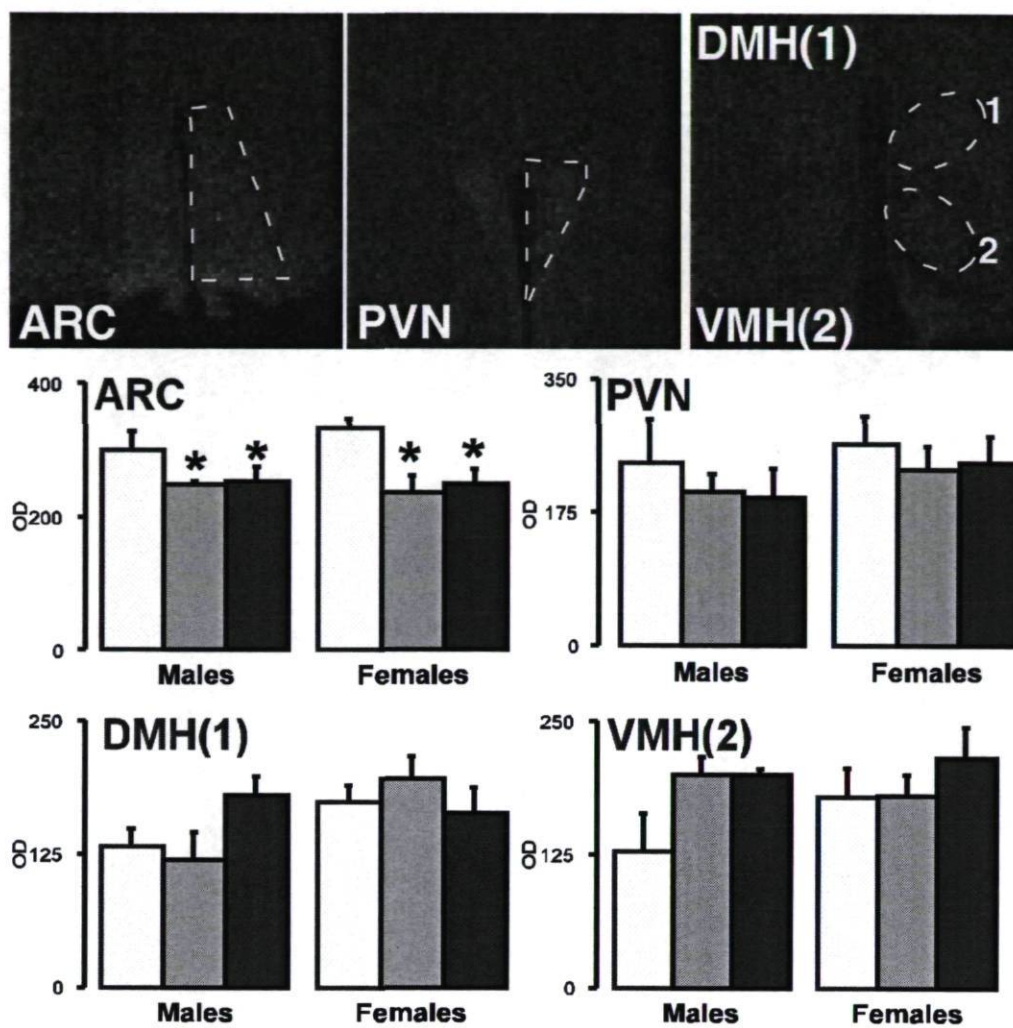


Figure 2

## Supplementary Material

### 2. Methods

#### 2.1 Animals

C57BL/6 mice (National Institute of Aging, USA) of 4, 12 and 24 months old were cared for and handled in conformance with the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and protocols were approved by our institutional animal care committee. One week after their arrival, overnight fasted mice were anaesthetized and perfused intracardially with 30 mL of icecold isotonic saline followed by paraformaldehyde (4%). The brains were removed at the end of perfusion and kept in paraformaldehyde for an additional period of 7 days. They were then transferred to a solution containing paraformaldehyde (4%) and sucrose (10%) before being cut 12 h later using a sliding microtome (Histoslide 2000, Reichert-Jung). 25 mm-thick brain sections were taken from the olfactory bulb to the brainstem and put into a cold sterile cryoprotecting solution containing sodium phosphate buffer (50 mM), ethylene glycol (30%), and glycerol (20%) and stored at -30 °C.

#### 2.2 In situ hybridization

In situ hybridization was performed exactly as previously described {Huang, 1999 #4941} (Suppl. materials). Brain sections were rinsed in sterile 0.05 M potassium phosphate-buffered saline (KPBS) treated with DEPC water, and then mounted onto Superfrost Plus micro slides (VWR, Mississauga, ON, Canada) and kept overnight in 100% ethanol. The sections were successively fixed for 20 min in paraformaldehyde (4%), digested for 30 min at 37 °C with proteinase K (10 mg/mL in 100 mM Tris-HCl containing 50 mM EDTA, pH 8.0), acetylated with acetic anhydride (0.25% in 0.1 M triethanolamine, pH 8.0) and dehydrated through graded concentrations (50, 70, 95, and 100%) of alcohol. After vacuum drying for at least 2 h, 90 mL of the hybridization mixture, which contains an antisense 35S-labelled cRNA probe ( $10^7$  cpm/mL), were spotted on each slide. The slides were sealed

under a coverslip and incubated overnight at 60 °C in a slide warmer. The next day, the coverslips were removed and the slides rinsed four times with 43 SSC (0.6 M NaCl, 60 mM trisodium citrate buffer, pH 7.0), digested for 30 min at 37 °C with RNase-A (20 mg/mL in 10 mM Tris-500 mM NaCl containing 1 mM EDTA), washed in descending concentrations of SSC (2x, 10 min; 1x, 5 min; 0.5x, 5 min; 0.1x, 30 min at 60 °C) and dehydrated through graded concentrations of alcohol. After a 2 h-period of vacuum drying, the slides were exposed on a X-ray film (Eastman Kodak, Rochester, NY) for 12 h. Once removed from the autoradiography cassettes, the slides were defatted in xylene and dipped in NTB2 nuclear emulsion (Kodak). The slides were exposed 7 days, before being developed in D19 developer (Kodak) for 3.5 min at 14 °C and fixed in rapid fixer (Kodak) for 5 min. Finally, tissues were rinsed in running distilled water for 1-2 h, counterstained with thionin (0.25%), dehydrated through graded concentrations of alcohol, cleared in xylene, and coverslipped with DPX.

### 2.3 Antisense <sup>35</sup>S-labelled riboprobes

The SIRT1 cRNA probe was generated by cloning the partial mouse SIRT1 cDNA, obtained after PCR (upper primer: 5'-GCTGACGACTTCGACGACGA- 3', lower primer: 5'-CAAGGCGAGCATAGATACCG- 3') in pGEM-T Easy vector (PROMEGA, Madison, WI), and linearized with *NcoI* and *Sall* (New England Biolabs, Canada) for antisense and sense probes, respectively. Radioactive riboprobes were synthesized by incubation of 250 ng linearized plasmid in 10 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris (pH 7.9), 0,2 mM ATP/GTP/CTP, a-35S-UTP, 40 U RNasin (Promega, Madison, WI), and 20 U of SP6 and T7 RNA polymerase for, respectively, antisense and sense probes of SIRT1 cRNA for 60 minutes at 37°C. The DNA templates were treated with 100 µl of DNase solution (1 µl DNase, 5 µl of 5 mg/ml tRNA, 94 µl of 10 mM Tris/10 mM MgCl<sub>2</sub>). The preparation of the riboprobes was accomplished by using a QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). The specificity of the probe was confirmed by the absence of positive signal in sections hybridized with sense probe.

## **2.4 Quantitative analysis of the hybridization signals**

The hybridization signals revealed on NTB2 dipped nuclear emulsion slides were analyzed under a light microscope (Olympus, BX60) equipped with a black and white video camera (Diagnostic Instruments, RT slider model 2.3.0) coupled to a PC computer by using Image software (Image Pro Plus 6.0, MediaCybernetics). The optical density (OD) of the hybridization signal was measured under darkfield illumination at a magnification of 20X. Saturation of the hybridization signal was avoided by adjusting the exposure time for the image with the strongest hybridization signal sampled for each region in every series. The luminosity of the system was set to the maximum and the saturation warning option was used to visualize saturated regions in the image preview. OD determination was performed on six different fields on both sections for each 4 animals in each groups. The OD was corrected for the background signal. The OD values obtained were then averaged. For each given analyzed area, the densitometric analyses were performed in all the groups without changing the light source of the microscope and the exposure time of the camera.

## **2.5 Statistical analysis.**

Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical differences were analyzed by ANOVA and Fisher's t test (ad hoc) when appropriate. A *p* value < 0.05 was considered significant.

### 3.0 Results

**Table 1 : 2x2 ANOVA analysis between groups and brain areas.**

Regions	Age (A)	Gender (G)	A x G
AV	0.024	0.343	0.378
PVT	0.423	0.358	0.393
SFO	0.148	0.003	0.444
SNC	0.592	0.871	0.084
ARC	0.005	0.712	0.469
PVN	0.550	0.280	0.954
DMH	0.616	0.071	0.087
VMH	0.153	0.451	0.438