



# Glucolipototoxicité dans les cellules bêta pancréatiques

Roméo Cassel

► **To cite this version:**

Roméo Cassel. Glucolipototoxicité dans les cellules bêta pancréatiques. Endocrinologie et métabolisme. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. <NNT : 2014LYO10257>. <tel-01199297>

**HAL Id: tel-01199297**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01199297>**

Submitted on 15 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THESE de Science

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Délivré par l'Université Claude Bernard Lyon 1

Discipline ou spécialité : Métabolisme, Nutrition, Diabète

## *Glucolipototoxicité dans les cellules bêta pancréatiques*

Roméo Cassel

Soutenue le 21 novembre 2014

Laboratoire Inserm U1060 CarMeN/INRA1235/Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole doctorale EDISS, Lyon

### JURY

---

Fabien VAN COPPENOLLE	Président
Miriam CNOP	Rapporteur
Stéphane DALLE	Rapporteur
Christophe DURANTON	Rapporteur
Charles THIVOLET	Directeur de thèse
Anne-Marie MADEC	Co-directrice de thèse

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement Anne-Marie Madec et Charles Thivolet de m'avoir encadré durant ces trois années de thèse, pour tout ce qu'ils m'ont apporté, humainement et scientifiquement. Je remercie Anne-Marie de m'avoir fait découvrir la recherche et le monde du travail avec une bienveillance et une présence constantes. De m'avoir fait véritablement participer à ses projets de recherche dès mon arrivée au laboratoire. Je la remercie de ne pas m'avoir sermonné toutes les fois où cela aurait été justifié et permis de comprendre mes erreurs et d'essayer de ne pas les refaire. Je la remercie aussi pour la grande chance qu'elle m'a donnée d'aller à de nombreux congrès, de rencontrer et de discuter avec des scientifiques et de visiter plusieurs villes d'Europe et San Francisco. Outre l'apprentissage d'une méthode scientifique, j'ai beaucoup apprécié au cours de ces quatre années le partage que nous avons eu, sur tout ce dont nous avons parlé, dans tous les moments. Pour moi, cette rencontre et cette expérience sont un véritable tremplin plein d'espoir et de confiance vers le monde professionnel.

Je remercie Charles Thivolet pour ses conseils, son regard scientifique et médecin, pour les moments d'écoute et pour son « stage » en laboratoire tous les mercredis pendant un an qui nous ont permis de réfléchir, de travailler et de discuter ensemble dans une belle et une bonne humeur. Je le remercie pour sa motivation et son entrain, qui se sont révélés des moteurs pour moi.

Je remercie Anne-Marie et Charles aussi pour leur patience et tous leurs conseils dans mon orientation professionnelle.

Je remercie Fabien Van Coppenolle et Sylvie Ducreux de m'avoir fait découvrir avec passion le calcium et les moyens de l'étudier. Merci à Fabien pour toutes nos discussions sur tous les sujets possibles, pour les journées enfermées dans une pièce noire à faire de la microscopie et à tous les « On s'appelle et on s'dit quoi ! ». Merci à Sylvie pour toutes les expériences réalisées ensemble, pour nos échanges et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier Marie-Agnès Chauvin pour tous les bons moments et pour toutes les expériences qu'elle a faites pour moi. Merci aussi à Guillaume pour l'expérimentation animale, la respiration mitochondriale et les expériences faites ensemble. Je remercie aussi Christine pour sa présence et nos échanges. Je remercie Anne et notre nouveau colocataire de bureau, Kassem, pour tous les moments de joie et de discussion ces derniers mois. Je tiens à remercier l'ensemble des personnes du laboratoire pour tous les moments d'échanges partagés et d'avoir répondu à mes questions et mes besoins aux moments où j'en ai eu besoin avec une attention toujours présente.

Je remercie toutes mes collègues et amies du laboratoire U855 à Lyon, Daisy, Julie, Aude, Flore et Jennifer, pour tous les bons moments passés ensemble et nos discussions scientifiques.

Je remercie Hubert Vidal et Jennifer Rieusset de m'avoir accueilli dans le laboratoire CarMeN et l'équipe 3 et permis d'accéder à toutes les techniques et savoirs-faire du laboratoire afin de participer à la connaissance sur le diabète et la découverte de nouvelles voies thérapeutiques.

Je souhaite remercier mes parents de m'avoir permis d'accéder avec envie au monde de la recherche et de pouvoir m'envoler vers de nouveaux horizons, avec une nouvelle connaissance, des outils et des projets. Je remercie toutes les personnes qui me sont proches et toutes celles que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et avec lesquelles j'ai apprécié les moments partagés.

Je remercie enfin Miriam Cnop, Stéphane Dalle et Christophe Duranton d'avoir accepté de relire et d'apporter leur regard à ce manuscrit et de composer mon jury de thèse.

88888888

« La force qui est en chacun de nous est notre plus grand médecin. » **Hippocrate**

« Apprendre, c'est se souvenir. » **Platon**

« Il n'y a d'homme plus complet que celui qui a beaucoup voyagé, qui a changé vingt fois la forme de sa pensée et de sa vie. » **Alphonse de Lamartine**

88888888

## Abbréviations

ABCA : ATP binding cassette A  
ABCG : ATP binding cassette G  
ACE 1 : Angiotensin Converting Enzyme 1  
ACE 2 : Angiotensin Converting Enzyme 2  
AMP : Adénosine monophosphate  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
ADP : Adénosine DiPhosphate  
AG : Acide gras  
AGL : Acide gras libre  
AGT: Angiotensinogen  
AMPK : AMP kinase  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ATF3: Activating transcription factor 3  
ATF4: Activating transcription factor 4  
ATF6: Activating transcription factor 6  
ATP : Adénosine TriPhosphate  
AT1R : Angiotensin Type 1 Receptor  
AT2R : Angiotensin Type 2 Receptor  
BIP: Binding immunoglobulin protein  
BSA: Bovine Serum Albumin  
CCK: Cholécystokinine  
CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein HOmologous Protein  
CGRP: calcitonin gene-related peptide  
DAG: Diacylglycérol  
DPP-IV: Dipeptidyl peptidase-4

DT2: Diabète de Type 2

eIF2a: eucarotic Initiation Factor 2a

ERAD: ER Associated Degradation

GIP: Gastric inhibitory polypeptide

GLUT: Glucose transporter

GMPc: Guanosine monophosphate cyclique

GLP-1: Glucagon like peptide-1

GPCR: G-protein coupled receptor

GPR40: G-protein coupled receptor 40

GRP: Gastrin releasing peptide

GRP78: Glucose Regulated Protein 78

GSIS: Glucose stimulated insulin secretion

GTP: Guanosine triphosphate

HDL: High density lipoprotein

HG: haut glucose

IAPP : Islet amyloid polypeptide

IP3: Inositol triphosphate

IP3R: IP3 Receptor

IRE-1a: Inositol-Requiring Protein 1

LDL: Low-density lipoprotein

MAM: Mitochondria-associated ER-membranes

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrn domain containing 3

NPY: Neuropeptide Y

PACAP: Putuitary adenylate cyclase activating polypeptide

PDI: Protéine Disulfide Isomerase

PERK : Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PKC: Protein Kinase C

PLC: Phospholipase C

RE: Réticulum endoplasmique

ROS: Reactive Oxygen Species

SERCA: Sarco/Endoréticulum Calcium ATPase

SRA: Système rénine-angiotensine

SRAA: Système rénine-angiotensine-aldostérone

S1P : Sphingosin-1-phosphate

Tg : Thapsigargine

TRP: Transient Receptor Potential Channel

UCP: Uncoupled Protein 2

VIP: vasoactive intestine peptide

XBP-1: X-box binding protein 1

4-PBA: 4-phénylbutyrate

## Table des figures

**Figure 1 :** Photos d'îlots humains isolés

**Figure 2 :** Immunofluorescence d'îlots de Langerhans d'espèces différentes

**Figure 3 :** Réponse biphasique de la sécrétion d'insuline des cellules bêta pancréatiques

**Figure 4 :** Sécrétion d'insuline en réponse au glucose dépendant des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP des cellules bêta

**Figure 5 :** Voies « indépendantes des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP », ou amplificatrices de la sécrétion d'insuline des cellules bêta.

**Figure 6 :** Principaux modulateurs humoraux et nerveux de la sécrétion d'insuline.

**Figure 7 :** Sécrétion d'insuline en réponse au glucose des cellules bêta *in vitro* et *in vivo*.

**Figure 8 :** Actions intracellulaires des lipides via le récepteur GPR40.

**Figure 9 :** Représentation schématique de la signalisation calcique intracellulaire.

**Figure 10 :** Photos de microscopie à fluorescence d'un îlot humain.

**Figure 11 :** Evolution des paramètres métaboliques et mécanismes mis en place au cours du développement du DT2.

**Figure 12 :** Schéma représentant les mécanismes de la dysfonction bêta cellulaire et de l'insulinorésistance dans le diabète de type 2.

**Figure 13 :** Schéma représentatif de l'état normal du RE.

**Figure 14 :** Schéma représentant les voies de signalisation activées lors du stress du RE.

**Figure 15 :** Le stress du RE et les voies de signalisation activées.

**Figure 16 :** Origines du stress oxydant dans les cellules.

**Figure 17 :** L'interaction entre la production de ROS et les réponses cellulaires aux stress.

**Figure 18 :** Représentation hypothétique de la progression de la compensation bêta-cellulaire à la dysfonction dans le cas d'une insulinorésistance induite par l'obésité, et le rôle de la glucolipotoxicité.

**Figure 19 :** Le système rénine-angiotensine-aldostérone systémique.

**Figure 20 :** Effets du SRA dans les cellules bêta pancréatiques.

**Figure 21 :** L'inhibition du système rénine-angiotensine protège de l'insulinorésistance dans les tissus métaboliques.

**Figure 22** : Effets de l'angiotensine 2 et de l'angiotensine (1-7) dans le pancréas, le tissu adipeux et le muscle squelettique.

**Figure 23** : Composants du SRA mis en évidence dans nos modèles d'îlots humains et de MIN6B1

**Figure 24** : Le losartan prévient les altérations morphologiques et fonctionnelles mitochondriales induites par la glucotoxicité dans les îlots de Langerhans humains.

**Figure 25** : Le translocon et son implication potentielle dans l'homéostasie calcique des cellules bêta pancréatiques.

**Figure 26** : Evaluation des paramètres métaboliques de souris nourries 16 semaines avec un régime riche en palmitate (+20%).

## Sommaire

1. Introduction bibliographique .....	11
1.1 Fonction bêta-cellulaire et homéostasie glucidique .....	11
1.1.1 Régulation de la glycémie.....	11
1.1.2 Le pancréas : glande endocrine et exocrine.....	12
1.1.3 Physiologie de la cellule bêta et sécrétion d'insuline.....	15
1.2 Diabète de type 2 et cellules bêta.....	27
1.2.1 Le diabète de type 2 .....	27
1.2.2 La glucotoxicité.....	28
1.2.3 La lipotoxicité .....	41
1.2.4 Glucolipotoxicité.....	44
1.3 Les traitements du diabète de type 2 .....	47
1.3.1 Les traitements actuels .....	47
1.3.2 L'inhibition du système rénine-angiotensine .....	49
2. Travaux réalisés au cours de la thèse.....	57
2.1 Travaux sur la glucotoxicité.....	57
2.1.1 Article 1 (publié) .....	60
2.1.2 Travaux préliminaires .....	70
2.2 Travaux sur la lipotoxicité.....	73
2.2.1 Etude <i>in vitro</i> : article 2 (soumis).....	73
2.2.2 Etude <i>in vivo</i> : travaux préliminaires .....	102
3. Conclusion générale .....	104
4. Références.....	109
5. Annexes .....	122
5.1 Article en collaboration (en révision) .....	122
5.2 Congrès et formations suivies au cours de la thèse.....	150
6. Résumés .....	153
6.1 Résumé en français .....	153
6.2 Résumé en anglais.....	154

# 1. Introduction bibliographique

## 1.1 Fonction bêta-cellulaire et homéostasie glucidique

### 1.1.1 Régulation de la glycémie

---

La glycémie est un paramètre métabolique crucial pour la survie et le bon fonctionnement de l'organisme, ce qui explique sa régulation fine. La glycémie est maintenue à une valeur relativement constante proche de 1 g/L (5,6 mmol/L) de sang à jeun et ne doit pas dépasser 1,1g/L (6,1 mmol/L) selon les recommandations de l'OMS. Le glucose est le substrat énergétique principal pour les cellules. L'origine de l'importance du glucose pour le corps remonte à nos origines bactériennes, les bactéries consommant presque exclusivement du glucose et, devenues des mitochondries dans les cellules eucaryotes, continuent à transformer le glucose en énergie utilisable pour la cellule (ref ?). Ainsi, afin de créer, de maintenir et de diversifier les fonctions cellulaires, l'interaction entre les cellules et le bon fonctionnement global du corps, celui-ci a mis en place des systèmes de régulation permettant l'approvisionnement de toutes les cellules, même les plus profondes, en glucose. Ceci est rendu possible grâce au liquide extracellulaire entre les cellules, au plasma sanguin, aux gradients de concentrations entre le plasma et le liquide interstitiel, à la porosité des capillaires sanguins, ainsi qu'à l'ensemble des organes régulant la prise alimentaire, l'absorption des nutriments et la pression des fluides circulants.

Des hormones, des facteurs neuroendocriniens et des substrats métaboliques circulants participent à la régulation de la glycémie (Drucker 2006) (van Baak 2014). C'est c'est par l'action simultanée de l'ensemble de ces paramètres que l'organisme est capable de mesurer en permanence la glycémie et de répondre à la moindre de ses variations.

Les nutriments et en particulier le glucose, entrent dans le corps au moment de la digestion. C'est le cerveau qui va déterminer si le taux de glucose sanguin est correct et s'il faut activer des systèmes activateurs ou inhibiteurs qui régulent ce taux (Verberne, Sabetghadam et al. 2014) (Kosse, Gonzalez et al. 2014). Cela se fait par la production de neurotransmetteurs capables d'activer les glandes endocrines responsables de la production d'hormones, telles que l'insuline et le glucagon dans les îlots de Langerhans pancréatiques, l'une étant hypoglycémiant, l'autre hyperglycémiant (Thorens 2011). Il module aussi la production de cortisol et d'adrénaline au niveau des glandes surrénales (Verberne, Sabetghadam et al. 2014). Les cellules endocrines ont aussi la capacité de détecter les taux de glucose circulant, d'y répondre directement et d'informer le cerveau (Begg and Woods 2013) (Jackson and Ahima 2006). Les tissus utilisant le glucose et sensibles à l'action de l'insuline et au glucagon, absorberont en conséquence plus ou moins de glucose et participeront ainsi à la régulation de la glycémie (Rizza, Mandarino et al. 1981).

Une variation trop importante de la concentration du glucose sanguin peut avoir des répercussions importantes sur l'organisme : une hypoglycémie ou une hyperglycémie peuvent avoir des effets délétères irréversibles comme la mort cellulaire si elles sont trop intenses ou trop longues dans le temps. Des

pathologies apparaissent lorsque la glycémie est dérégulée, comme c'est le cas pour le diabète, qu'il soit de type 1 ou de type 2, où les patients atteints de cette pathologie présentent une hyperglycémie chronique à jeun supérieure ou égale à 1,26g/L (6.9 mmol/L).

Nous verrons dans une première partie les mécanismes régulateurs de la sécrétion d'insuline à l'origine du contrôle glycémique et les organites mis en jeu dans ces régulations. Nous discuterons dans une deuxième partie des stress cellulaires qui peuvent apparaître dans les cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline, au cours du diabète de type 2, afin de mieux comprendre l'enjeu que représente cette maladie en terme de traitements préventifs et thérapeutiques comme il en sera discuté dans une troisième partie concernant le système rénine-angiotensine.

---

### **1.1.2 Le pancréas : glande endocrine et exocrine**

---

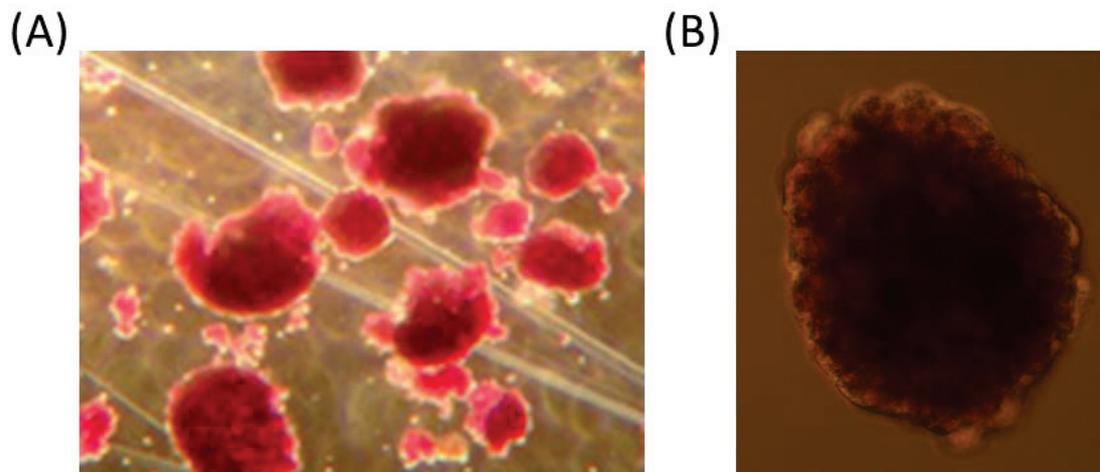
Le pancréas a une double fonction, endocrine régulatrice de la glycémie et sécrétrice exocrine de la digestion, ce qui lui confère le terme de glande amphicrine. La régulation de la digestion et le contrôle de la glycémie sont ainsi le résultat d'une réponse métabolique coordonnée.

#### **1.1.2.1 Glande exocrine**

Lors de la digestion, la stimulation du duodénum par l'arrivée du bol alimentaire active la sécrétion des sucs pancréatiques et des acides biliaires, qui rejoignent le duodénum au niveau de la papille de Vater, en empruntant respectivement le canal de Wirsung et le canal cholédoque. La synthèse et la sécrétion des sucs pancréatiques sont réalisées par les glandes acineuses exocrines du pancréas, qui représentent la majeure partie de l'organe, environ 98% de sa masse. Ils activent des enzymes clefs responsables de la dégradation des aliments en nutriments et favorisent ainsi l'absorption intestinale de ces nutriments (Borgstrom, Dahlqvist et al. 1957) (Brownlee, Forster et al. 2010).

#### **1.1.2.2 Glande endocrine**

Les îlots de Langerhans, partie endocrine du pancréas, représentent 2% de la masse de celui-ci et régulent finement la glycémie par la sécrétion de deux hormones : l'insuline et le glucagon. L'insuline est une hormone hypoglycémiante, libérée lors d'une élévation de la concentration du glucose dans le sang, comme à la suite d'un repas par exemple. Le glucagon est une hormone hyperglycémiante sécrétée lorsque la glycémie est inférieure à la normale, à jeun, lors d'un effort physique ou d'un stress notamment. La figure 1 montre des îlots de Langerhans humains isolés à partir de pancréas de donneurs en état de mort cérébrale et cultivés au laboratoire.



**Figure 1** : photos d'îlots humains isolés (A) marqués à la Dithizone (ECIT,Genève), (B) en culture au laboratoire Inserm U1060, Lyon.

Les îlots de Langerhans, responsables de la production hormonale du pancréas, ont une structure arrondie, sont constitués de cellules en amas et sont très vascularisés. Leur disposition semble homogène dans le pancréas (Cabrera, Berman et al. 2006). Les îlots sont constitués de quatre types cellulaires, produisant chacun une hormone spécifique :

Les cellules alpha, 15 à 20% environ, sécrétant le glucagon,

Les cellules bêta, 60 à 80% environ, sécrétant l'insuline,

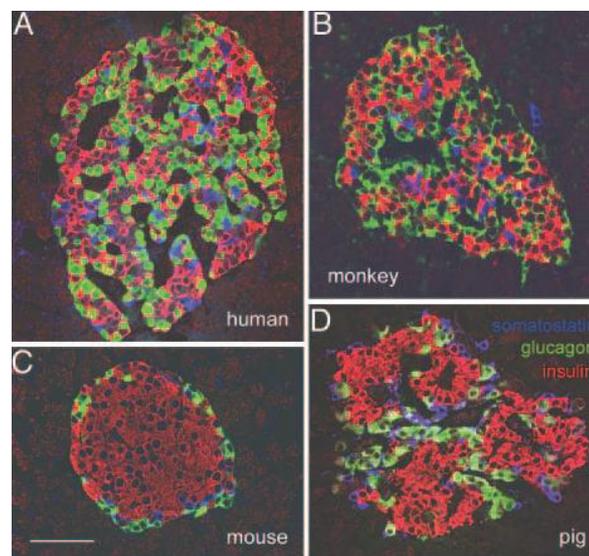
Les cellules delta, 3 à 10% environ, sécrétant la somatostatine,

Les cellules F, 1% environ, sécrétant le polypeptide pancréatique.

L'îlot de Langerhans est un véritable organe à lui seul : constitué de ses cellules à fonctions spécifiques, son importante vascularisation – cinq fois plus élevée que dans le tissu exocrine (Henderson and Moss 1985) que dans le reste du pancréas – lui permet de mesurer en permanence différents paramètres sanguins dont la glycémie et le taux d'acides gras libres circulants, de moduler et de synchroniser l'activité de ses cellules et de sécréter dans le sang les hormones nécessaires à la régulation des paramètres mesurés. La sécrétion d'insuline est inversement corrélée avec la sécrétion de glucagon, tout particulièrement lors d'une hausse ou d'une baisse importante de la glycémie. Quand l'une de ces hormones est fortement sollicitée, l'autre est inversement produite, mais reste toutefois sécrétée à un niveau basal (Menge, Gruber et al. 2011). De nombreuses études s'attachent aujourd'hui à comprendre les mécanismes qui régissent cette régulation. En effet, il s'agirait d'effets multiples, à la fois les nutriments seraient un signal activateur pour les cellules bêta et un signal inhibiteur pour les cellules alpha (Menge, Gruber et al. 2011) et les cellules alpha et bêta communiqueraient via la libération d'un certain nombre de

facteurs chimiques dans le milieu interstitiel. En effet, il a été par exemple montré que l'accroissement de la sécrétion d'insuline elle-même réduit la sécrétion de glucagon (Abdul-Ghani and DeFronzo 2007).

D'une espèce à l'autre, si les îlots de Langerhans possèdent une fonction similaire, il existe des différences morphologiques et fonctionnelles entre eux. Chez la souris par exemple, les cellules alpha forment une couronne autour des cellules bêta situées au centre de l'îlot, tandis que chez l'homme les cellules alpha et bêta sont mélangées, comme illustré dans la figure 2 (Cabrera, Berman et al. 2006). Dans cette même étude, les auteurs suggèrent que les différences de sensibilité entre îlots d'espèces différentes pourraient être liées à l'organisation cellulaire de ces îlots. En effet, de par l'organisation des îlots humains, les cellules bêta sont plus facilement en contact avec les autres types cellulaires de l'îlot et pas seulement avec les autres cellules bêta (Cabrera, Berman et al. 2006) (Wojtusciszyn, Armanet et al. 2008).



**Figure 2 :** Coupes d'îlots de Langerhans de quatre espèces différentes (humain, singe, souris, cochon). Les îlots contiennent des quantités relatives différentes de cellules alpha (en vert), bêta (en rouge) et delta (en bleu). La disposition des cellules au sein de l'îlot est aussi variable d'une espèce à l'autre (Cabrera, Berman et al. 2006).

Cabrera et al. ont aussi montré que la quantité de cellules alpha et bêta est différente entre les îlots, notamment entre les îlots humains où elles représentent 35 et 55% des îlots et les îlots de souris où elles représentent 20 et 75% respectivement (Cabrera, Berman et al. 2006).

L'étude de Bosco et al. confirme que, dans les îlots humains, la majeure partie des cellules touchent les vaisseaux, que ce soit par un contact direct ou grâce à des extensions cytoplasmiques cheminant entre les cellules les plus proches des vaisseaux (Bosco, Armanet et al. 2010). Des analyses tridimensionnelles plus fines encore semblent cependant nécessaires pour déterminer si les cellules les plus éloignées sont en contact ou non avec la circulation sanguine. Par ailleurs, les cellules bêta enveloppent les cellules alpha

lorsqu'elles se touchent et cela pourrait avoir des conséquences sur la sécrétion d'insuline mais aucune données claires n'existent pour le moment à ce sujet.

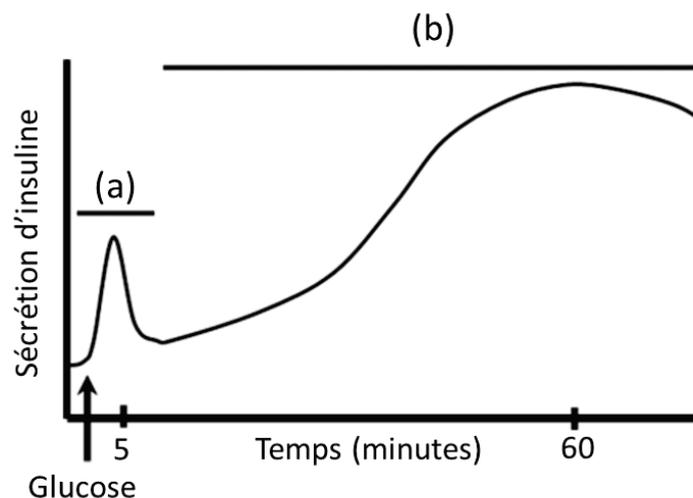
### 1.1.3 Physiologie de la cellule bêta et sécrétion d'insuline

---

L'insuline est la seule hormone de l'organisme capable de réduire la glycémie. Cette hormone est sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques. Ces cellules sont capables de détecter de faibles variations du glucose plasmatique et de produire en réponse une quantité adaptée d'insuline pour favoriser l'absorption du glucose sanguin au niveau des tissus cibles et ainsi réduire la glycémie.

#### 1.1.3.1 Mobilisation des cellules bêta dans la sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques est l'intégration d'actions de plusieurs facteurs que nous allons voir dans ce chapitre. En effet, la sécrétion d'insuline est le résultat de phénomènes électrophysiologiques, de phénomènes d'amplification par le glucose, elle est hormono- et neurotransmetteur-dépendante. Lors d'une stimulation par le glucose, la réponse est biphasique, comme présenté dans la figure 3.

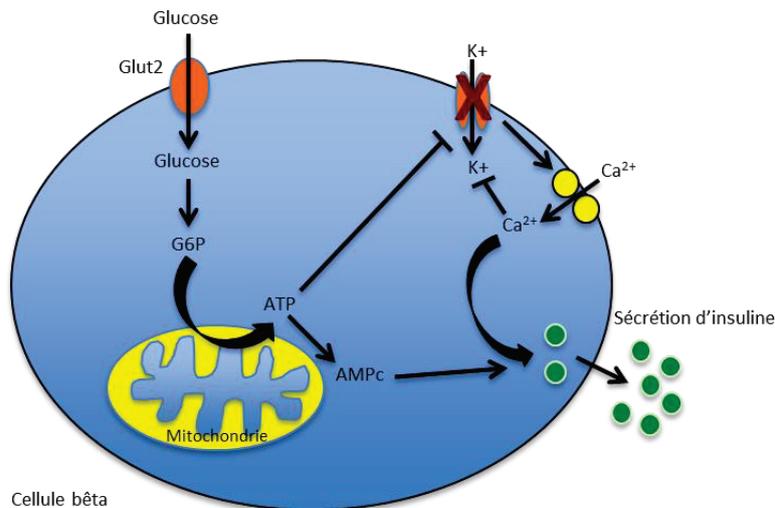


**Figure 3 :** La sécrétion biphasique d'insuline des cellules bêta pancréatiques. (a) Le taux d'insuline sécrétée par les îlots augmentent rapidement et immédiatement après une stimulation par du glucose. Cette augmentation est dépendante de la production de l'ATP produit par la mitochondrie et l'entrée de calcium au niveau de la membrane plasmique. (b) Une seconde phase apparaît après la fin de la première et maintient un taux constant d'insuline sécrétée aussi longtemps que la stimulation perdure. Cette phase est dépendante du métabolisme mitochondrial, de facteurs de couplage et d'une entrée de calcium dans la cellule Figure adaptée à partir de (Newsholme, Cruzat et al. 2014).

Afin de répondre de manière adaptée à différents stimuli, la cellule bêta intègre les informations transmises par ces stimuli et génère une réponse plus ou moins soutenue dans le temps. Le glucose, qui est le principal activateur de la fonction bêta pancréatique, entre dans les cellules bêta grâce aux transporteurs membranaires GLUT. Principalement GLUT 1 et GLUT3 dans les cellules bêta humaines et GLUT 2 dans les cellules bêta de rongeurs (De Vos, Heimberg et al. 1995).

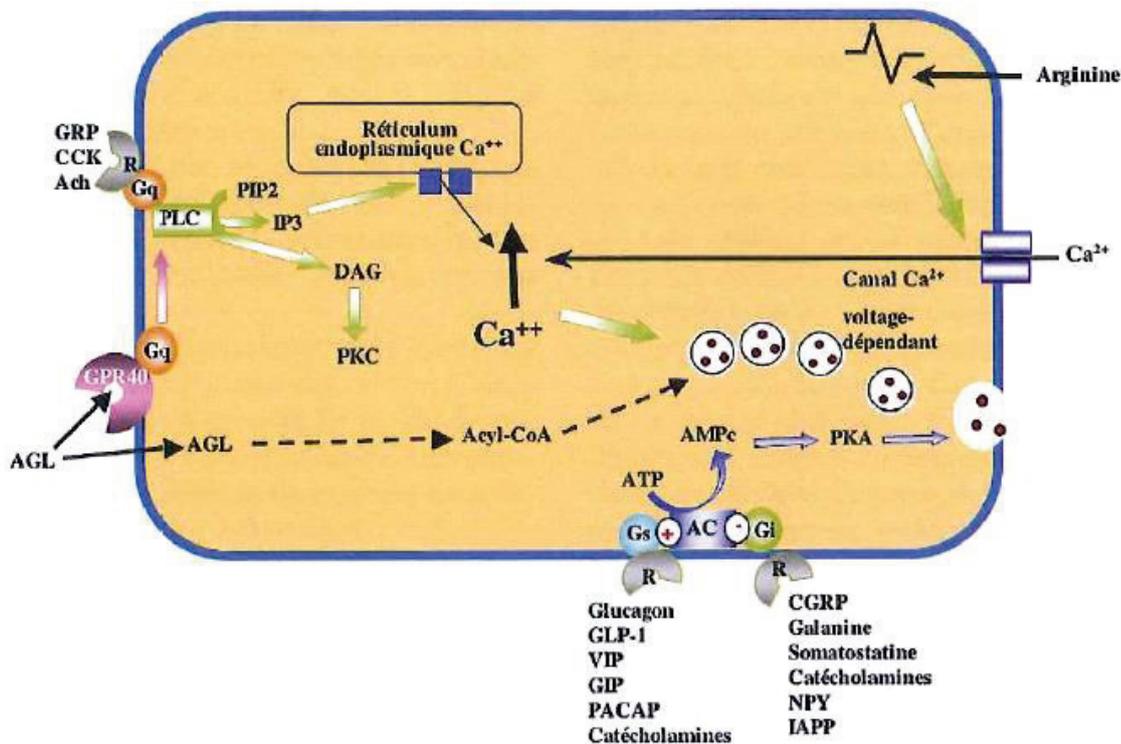
Comme discuté dans la revue de Rorsman et al. (Rorsman and Braun 2013), si l'entrée du glucose et son métabolisme sont essentiels pour la sécrétion d'insuline, il reste à comprendre dans quelle mesure son métabolisme est important. En effet, seulement 15% de l'oxydation du glucose permet la sécrétion, la participation des 85 % restants est encore à élucider. Dans les 15%, l'activité de la glucokinase et le métabolisme mitochondrial sont deux facteurs importants dans l'utilisation du glucose, dans la mesure où pour exemple la glucokinase est à la moitié de son activité maximale dès 4 mM de glucose. Il semble que le glucose a par ailleurs un rôle d'amplification de la sécrétion d'insuline. En effet, dans des cellules bêta humaines déjà dépolarisées au maximum par une quantité importante de potassium dans le milieu extérieur – c'est-à-dire la sécrétion maximale que peut induire la dépolarisation de la membrane plasmique – l'addition de glucose augmente cette sécrétion après quelques minutes d'exposition (Henquin 2009) (Henquin, Dufrane et al. 2006). Ceci semble être dû à une augmentation du calcium intracellulaire (Henquin 2000) et des facteurs comme le NADPH (Ivarsson, Quintens et al. 2005) ou le glutamate (Maechler and Wollheim 1999) sont peut-être impliqués.

La figure 4 montre les mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes électrophysiologiques et métaboliques : l'entrée de glucose dans la cellule active une cascade d'inhibition et d'activation de canaux ioniques qui conduisent à une dépolarisation de la membrane plasmique, qui résulte en final à une entrée de calcium, déclencheur de la sécrétion des granules d'insuline dans le milieu extérieur. Parce que le calcium cytosolique est faible par rapport au calcium extracellulaire ( $10^{-7}$  M vs.  $10^{-3}$  M), une faible augmentation du calcium cytosolique est capable d'induire une libération d'insuline. Cette cascade est initiée par l'inhibition de canaux potassiques qui hyperpolarisent la membrane via une production accrue d'ATP par les mitochondries, ATP produit par l'oxydation du glucose. Plus l'entrée de glucose est importante, plus la quantité d'ATP produit capable d'inhiber les canaux potassiques est importante et plus la sécrétion le sera aussi (Rorsman and Braun 2013).



**Figure 4 :** Sécrétion d'insuline en réponse au glucose dépendant des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP. Le glucose entre par le transporteur GLUT2 dans la cellule bêta, est transformé en Glucose -6-Phosphate (G6P) qui est converti en ATP par la mitochondrie grâce au cycle de Krebs et à la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'ATP ainsi produit accroît le rapport ATP/ADP et inhibe l'entrée de potassium par les canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP situés sur la membrane plasmique de la cellule. Cette inhibition entraîne une dépolarisation de la membrane qui active l'entrée massive de calcium dans la cellule. Ce calcium active à son tour les processus d'exocytose nécessaires à la sécrétion des granules contenant l'insuline. Le calcium est aussi capable d'amplifier son entrée en générant une dépolarisation membranaire plus importante grâce à la fermeture supplémentaire des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP. L'ATP peut être converti en AMPc qui stimulera aussi la sécrétion d'insuline. Texte adapté de l'article de Rorsman et al. (Rorsman and Braun 2013).

La réponse insulinaire se fait en deux phases : une première phase rapide, que nous venons de détailler et une seconde phase qui apparaît entre cinq et dix minutes après la première (Figure 3). Lors de cette phase, la cellule met en place ce qui est appelé les voies d'amplification du glucose, qui vont conduire d'une part à une synthèse accrue d'insuline et d'autre part à une sécrétion soutenue aussi longtemps que nécessaire de l'insuline. Dans les deux phases, l'augmentation de la concentration calcique cytosolique est essentielle. Au cours de la deuxième phase, le glucose induit toujours une entrée de calcium à travers la membrane plasmique et des messagers chimiques externes vont activer des voies métaboliques liées au calcium comme la voie de la phospholipase C (PLC). Cette phase est présentée dans la figure 5. La PLC, située au niveau de la membrane plasmique, transforme le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP3), qui vont activer chacun des voies spécifiques. L'IP3 déclenche la libération du calcium réticulaire dans le cytosol en activant les canaux IP3Rs sur la membrane du réticulum (RE). Ce calcium active la chaîne respiratoire mitochondriale, donc la production d'ATP qui inhibe les canaux potassiques, et participe aussi directement à la libération des granules de sécrétion. Le DAG active la protéine kinase C (PKC), qui, par l'intermédiaire d'autres acteurs, va aussi favoriser la sécrétion d'insuline (Aizawa, Komatsu et al. 1998) (Dunlop and Larkins 1988) (Prentki and Wollheim 1984). La mitochondrie joue aussi un rôle important dans la sécrétion d'insuline lors de la phase métabolique, grâce à l'utilisation et la production de métabolites de couplage métabolique tels que le guanosine triphosphate (GTP), le NADPH, le glutamate, la glutamine et l'alpha-kétoglutarate (Wiederkehr and Wollheim 2012).

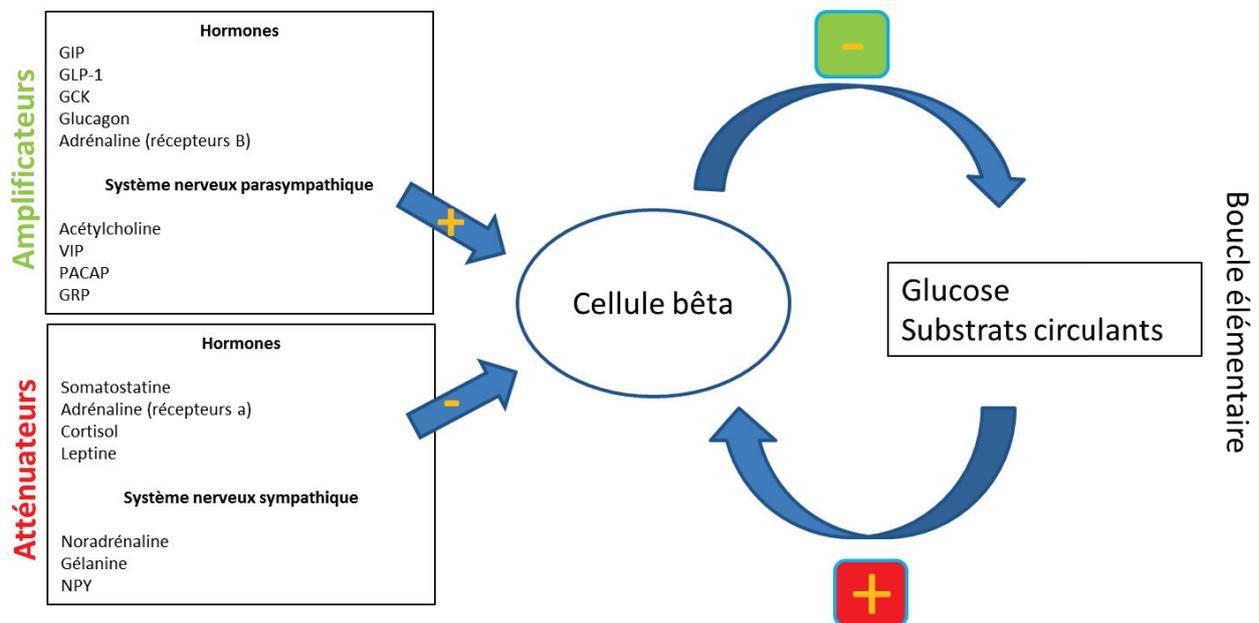


**Figure 5 :** Voies « indépendantes des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP » ou amplificatrices de la sécrétion d'insuline des cellules bêta. PACAP : putuinary adenylate cyclase activating polypeptide ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin releasing peptide ; GIP ; gastric inhibitory polypeptide ; GLP-1 : glucagon like peptide-1 ; CCK : cholecystokinine ; NPY : neuropeptide Y, AGL : acides gras libres ; CGRP : calcitonin gene-related peptide ; IAPP : islet amyloid polypeptide. Les catécholamines peuvent agir via des récepteurs adrénergiques β<sub>2</sub> (stimulation de la sécrétion d'insuline) ou des récepteurs adrénergiques β<sub>1</sub> (inhibition de la sécrétion d'insuline). Dans les conditions physiologiques, c'est l'effet inhibiteur qui l'emporte. schéma adapté de (Magnan and Ktorza 2005).

Les recherches actuelles s'intéressent à la libération des granules de sécrétion et plus particulièrement aux types de pools de granules libérés. En effet, il semblerait que les premiers granules mobilisés soient ceux nouvellement formés, ce qui conférerait des propriétés particulières à la sécrétion (Rorsman and Braun 2013). Dans ces mêmes études, une quantification des granules de sécrétion lors des deux phases de réponse des cellules bêta a été réalisée et montre que l'intensité de sécrétion est plus forte pendant la première phase, environ 15 granules par minutes, tandis que la seconde phase a une sécrétion moyenne de 5 granules par minute mais dure plus longtemps que la première, et plus précisément aussi longtemps que la stimulation existe. En conditions basales, la cellule bêta sécrète en moyenne 1 granule par minute (Rorsman and Braun 2013).

### 1.1.3.2 Modulateurs endocriniens et métaboliques de la sécrétion d'insuline

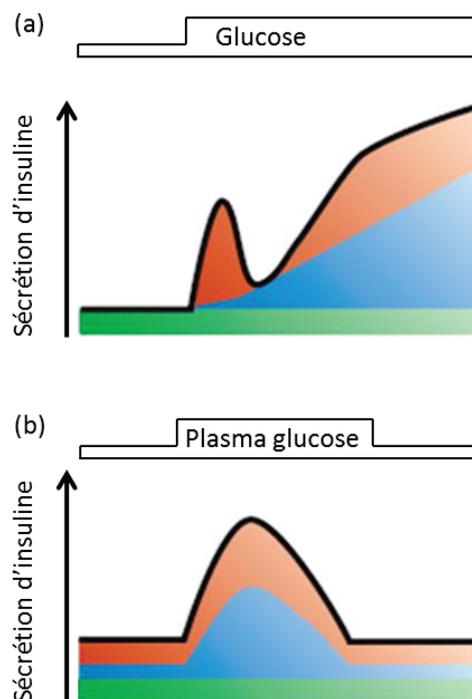
La cellule bêta est sensible aux substrats circulants, dont le glucose est un des principaux activateurs de leur fonction comme nous l'avons dit. Mais il n'est pas le seul. En effet, il existe des substrats hormonaux et nerveux (neurotransmetteurs) qui sont soit amplificateurs, soit atténuateurs de la réponse insulinaire (figure 6). Les principales hormones amplificatrices sont le GIP, le GLP-1, la cholécystokinine (CCK), le glucagon et l'adrénaline (récepteurs bêta-adrénergiques) et les neurotransmetteurs du système nerveux parasympathique : l'acétylcholine, le VIP, le PACAP et le GRP. Les hormones et neurotransmetteurs atténuateurs du système nerveux sympathique sont la somatostatine, la pancréastatine, l'adrénaline (récepteurs alpha 2 adrénergiques), le cortisol, la leptine, les hormones thyroïdiennes, la prolactine et la noradrénaline, la galanine et le NPY.



**Figure 6** : Principaux modulateurs humoraux et nerveux de la sécrétion d'insuline. PACAP : pituitary adenylate cyclase activating polypeptide ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin releasing peptide ; GIP ; gastric inhibitory polypeptide ; GLP-1 : glucagon like peptide-1 ; CCK : cholecystokinine ; NPY : neuropeptide Y. Figure adaptée de (Magnan and Ktorza, 2005).

Ces molécules, activatrices et inhibitrices, sont d'origine multiples : elles peuvent être d'origine insulaire (glucagon, somatostatine), adipocytaire (leptine, adiponectine), thyroïdienne ou intestinales (incrétines comme le GLP-1, le GIP). Elles font donc partie d'une boucle de rétrocontrôle à l'échelle de l'organisme qui permet un maintien stable de la glycémie et des substrats circulants, où le glucose et les substrats activent les cellules bêta, tandis que ces dernières, par la production d'insuline, régulent ceux-ci à la baisse (figure 6). De manière intéressante, l'insuline libérée par les cellules bêta peut réguler la sécrétion d'insuline de ces cellules par une action autocrine ou paracrine, faisant intervenir principalement la voie IRS-PI3K et les voies calciques (Shaw, Park et al. 2009). L'action autocrine et paracrine de l'insuline peut aussi activer l'AMP kinase (AMPK) et les voies de signalisation associées (Park, Kim et al. 2009).

En comparant les données actuelles *in vitro* et *in vivo* concernant la sécrétion d'insuline, Komatsu et al. ont montré l'importance des facteurs neuro-hormonaux synthétisée dans la figure 7 (Komatsu, Takei et al. 2013). En effet, concernant la régulation de la glycémie, la sécrétion d'insuline est essentiellement dépendante de voies de signalisation ne faisant pas intervenir de canaux  $K_{ATP}$ -dépendants, c'est-à-dire de voies métaboliques d'amplification. *In vitro*, cette activation est retrouvée mais tardive comparativement à la stimulation  $K_{ATP}$ -sensibles dépendante.

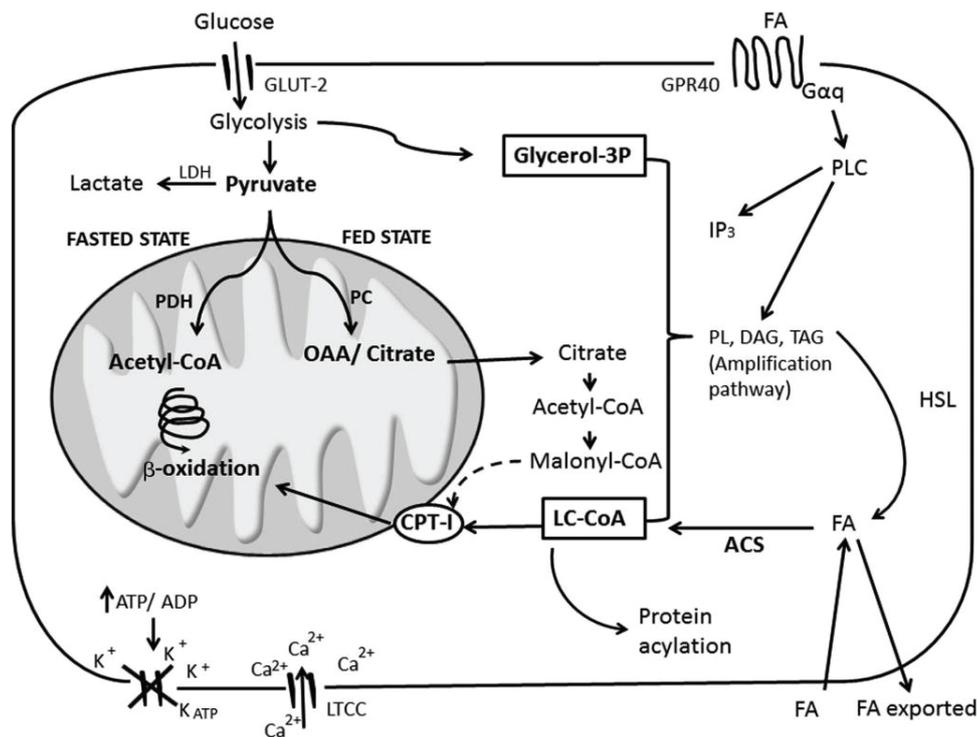


**Figure 7 :** Sécrétion d'insuline en réponse au glucose des cellules bêta (a) *in vitro* et (b) *in vivo*. (a) Le glucose entraîne une sécrétion d'insuline en deux phases grâce à la fermeture des canaux  $K_{ATP}$ -sensibles. Le glucose active aussi progressivement la sécrétion d'insuline calcium-dépendante grâce à la fermeture de canaux  $K_{ATP}$ -indépendants. (b) *In vivo*, les cellules bêta sont constamment stimulées. Lors d'un repas, c'est essentiellement l'exocytose indépendante des canaux  $K_{ATP}$ -sensibles qui est activée. En vert, la sécrétion constitutive, en rouge, la sécrétion  $K_{ATP}$ -dépendants, en bleu, la sécrétion  $K_{ATP}$ -sensibles indépendante. Figure modifiée de l'article de (Komatsu, Takei et al. 2013).

D'un point de vue moléculaire, l'ensemble des molécules citées plus haut va être capable d'activer des voies de signalisation en modulant l'activité de récepteurs situés à la surface de la membrane plasmique, qui sont pour la plupart des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) (Amisten, Salehi et al. 2013).

Ces protéines activent ou inhibent des messagers secondaires différents en fonction du signal hormonal, nerveux, ou métabolique. Les GPCR sont les récepteurs à sept domaines transmembranaires les plus présents à la surface de la membrane plasmique et forment la famille de récepteurs la plus importante dans le génome. Ils régulent ainsi de nombreuses fonctions dans toutes les cellules de l'organisme et participent à la régulation de la sécrétion d'hormones dans les îlots de Langerhans, tout particulièrement d'insuline dans les cellules bêta. Les GPCR peuvent activer des seconds messagers comme l'AMPc et le GMPc (Muhlbauer, Albrecht et al. 2011), les phospholipases (Verma, Sadasivuni et al. 2014) et des canaux ioniques comme les canaux calciques et qui auront un impact sur la sécrétion d'insuline. Néanmoins, pour une majorité de GPCR, leur rôle dans la régulation de la sécrétion hormonale des îlots n'est pas connu (Amisten, Salehi et al. 2013). Des exemples de ces GPCR et seconds messagers associés sont donnés dans la figure 5.

Parmi les familles de molécules activant des GPCR dans les cellules bêta, les acides gras (AGs) activent le récepteur GPR40. Celui-ci est un médiateur des effets de la plupart des AGs circulants (Itoh, Kawamata et al. 2003) et permet à ces derniers d'avoir un rôle dans la stimulation de la sécrétion d'insuline. En effet, une exposition courte à des AGs accroît la sécrétion d'insuline (Crespin, Greenough et al. 1969) tandis qu'une stimulation plus longue la réduit (Zhou and Grill 1995). La voie de la PLC est une des voies connues d'effets des lipides via ce récepteur comme le présente la figure 8 (Graciano, Valle et al. 2011). Sur cette figure, il est possible de constater l'étroite interaction entre les voies déclenchées par les lipides et les voies activées par le glucose et leurs effets communs sur le métabolisme de cellules bêta, plus particulièrement au niveau de la bêta-oxydation. Les lipides peuvent par ailleurs entrer dans la cellule grâce à la diffusion à travers la membrane plasmique, due à leur propriété hydrophobe commune. Ils peuvent utiliser aussi des transporteurs spécifiques, comme les ATP binding cassettes G (ABCGs) et les ATP binding cassettes A (ABCAs) (Kruit, Wijesekara et al. 2012) et entrer dans le métabolisme cellulaire. Les métabolites qui seront issus de ces lipides pourront être utilisés dans les phénomènes de couplage métabolique, comme c'est le cas du DAG, ou dans la production d'énergie au niveau de la mitochondrie.



**Figure 8** : Actions intracellulaires des lipides via le récepteur GPR40. Celui-ci active la voie PLC qui produit de l'IP3, des métabolites (PL : phospholipides, DAG : diacylglycérol, TAG : triacylglycérol) qui interviendront dans l'amplification métabolique des effets du glucose et des acides gras (AGs). Cela en activant notamment l'expression de la CPT-1 (carnitine-palmitoyl-transférase 1) et la voie de la bêta-oxydation. Figure traduite de (Graciano et al. 2011).

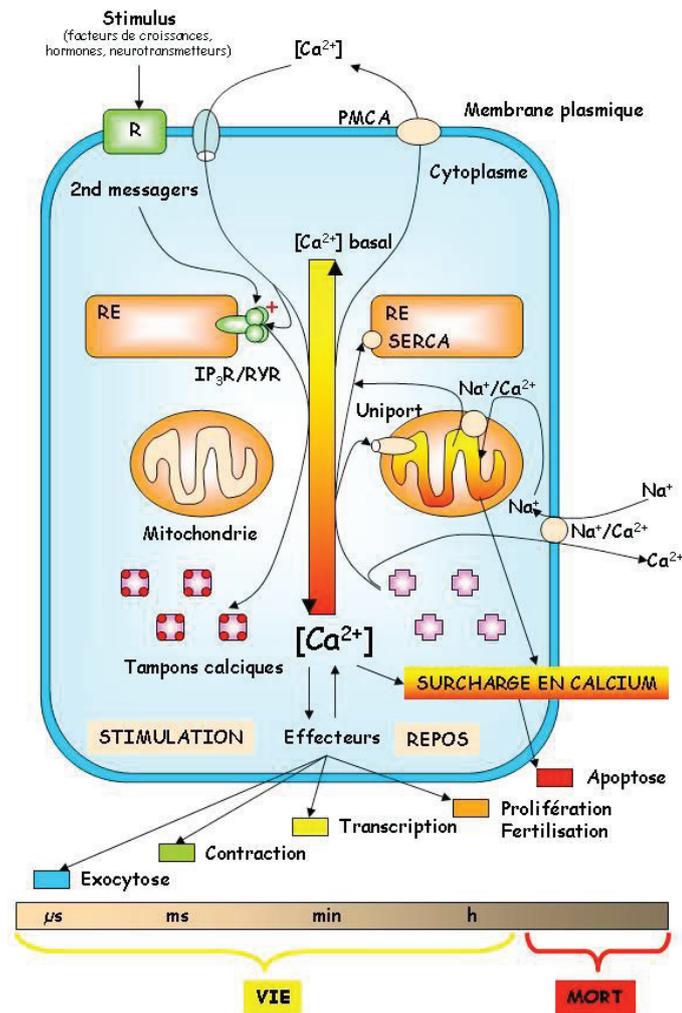
### 1.1.3.3 Le couplage cellulaire et le rôle du calcium dans la sécrétion d'insuline

Les îlots de Langerhans présentent la caractéristique de pouvoir sécréter une faible quantité d'insuline en condition basale de glucose (2 à 5mM) et de pouvoir accroître considérablement cette sécrétion lors d'une élévation de la glycémie. Le fait que les cellules soient agencées en îlot leur confère une haute capacité d'interaction et de synchronisation de leurs réponses.

Parmi les acteurs responsables de cette synchronisation, les jonctions gap sont très impliquées dans ce phénomène et plus particulièrement les connexines 36 qui les composent (Perez-Armendariz 2013). Situées à cheval entre les membranes plasmiques de deux cellules bêta, elles permettent de mettre en commun les cytoplasmes et de maintenir un potentiel membranaire similaire. A l'état de repos des cellules, les connexines 36 semblent réguler directement la sécrétion d'insuline, la maintenant basse, grâce aux courants potassiques : lorsqu'une cellule se dépolarise, les courants potassiques d'une autre cellule inhibent la dépolarisation de la première en faisant passer du potassium à travers la jonction gap et ainsi prévenir la sécrétion d'insuline (Farnsworth, Hemmati et al. 2014). Les connexines semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la sécrétion d'insuline car l'augmentation ou la réduction fortes de leur

quantité dans les cellules INS-1E et des îlots de rats entraînent une réduction importante de la sécrétion d'insuline et du contenu en insuline des cellules (Le Gurun, Martin et al. 2003). Une étude récente dans des MIN6 a montré que, grâce à ces jonctions, lors d'une stimulation par une dose élevée de glucose, le calcium intracellulaire augmente pour favoriser la sécrétion d'insuline et ce de manière homogène à travers toutes les cellules (Hraha, Bernard et al. 2014). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que la structure tridimensionnelle des îlots est nécessaire à une fonction insulinique élevée, comparativement à des cellules organisées en 2D.

Le calcium participe aussi au couplage cellulaire et sa régulation dans les cellules bêta se fait grâce aux différentes activités des pompes et canaux situés sur les membranes des cellules ainsi que présenté dans la figure 9. Cette régulation tient compte des besoins à un instant donné de différentes fonctions cellulaires. En permanence, il existe des oscillations calciques, dans le cytosol, le RE et la mitochondrie (Hraha, Bernard et al. 2014) (Rutter, Tsuboi et al. 2006). Ces oscillations peuvent être de l'ordre de la seconde ou de la minute (Henquin 2009). Les mouvements du calcium externe entrant dans la cellule est crucial pour le fonctionnement de la cellule (Jaques, Jousset et al. 2008). La structure en îlot joue un rôle important dans la régulation du calcium cytosolique. En effet, les cellules dispersées présentent plus d'augmentations spontanées du calcium cytosolique que les cellules en îlots et une sécrétion d'insuline en réponse au glucose moindre (Jaques, Jousset et al. 2008). Les gap junctions participent donc à la cohérence calcique des cellules et de leur activité (Hraha, Bernard et al. 2014).



**Figure 9 :** Représentation schématique de la signalisation calcique intracellulaire. Les flux calciques intracellulaires sont régulés par des pompes et des canaux calciques situés sur la membrane plasmique (PMCA et échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), réticulaire (IP3R et RyR qui font sortir le calcium du RE et les SERCA qui le font entrer dans le RE), mitochondriale (Uniport et échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ). Le calcium dans le cytosol peut avoir une grande variété d'actions en stimulant des processus cellulaires divers tels que l'exocytose, la contraction, la transcription, la prolifération, la fertilisation qui favorisent la vie de la cellule, et l'apoptose lorsqu'il y a une surcharge cytosolique ou mitochondriale en calcium (Berridge, Bootman et al. 2003).

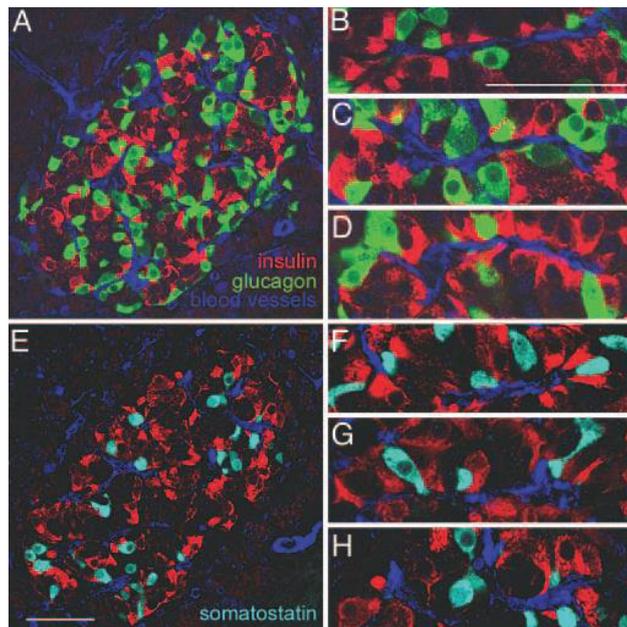
Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ne peut se faire que lorsqu'il y a eu auparavant ou de manière concomitante une augmentation de la concentration calcique cytosolique (Jonkers and Henquin 2001). Les cellules en clusters comme dans les îlots sont plus rapidement recrutées et en plus grand nombre pour la sécrétion que les cellules isolées. Si cette concentration calcique est accrue dès 6 mmol/L de glucose, la sécrétion d'insuline est largement augmentée à partir de 15 mmol/L. Les pics de calcium et d'insuline sécrétée sont synchronisés, suggérant

que les mouvements calciques sont essentiels à sécrétion d'insuline, même s'ils ne sont certainement pas le seul facteur majeur influent. D'autre part, dans des îlots de souris, l'augmentation de glucose a permis de mettre en évidence que les cellules bêta ont des temps de réponses en terme d'augmentation de concentration calcique différents (Larsson-Nyren, Pakhtusova et al. 2002). Cette étude suggère que les cellules à réponse rapide pourraient être des cellules pacemakers entraînant les autres dans la sécrétion accrue d'insuline en réponse au glucose.

De manière intéressante, CJ Barker et al. ont montré que l'entrée du calcium au niveau de la membrane plasmique active la production d'IP3 (Barker and Berggren 2013). L'augmentation subséquente de calcium dans les stocks modifie la conformation des IP3Rs et favorise une nouvelle oscillation. Les auteurs en concluent que l'IP3 serait une conséquence de l'entrée de calcium et la favoriserait et non l'inverse. La production d'IP3 se ferait par l'activation de la PLC via le calcium entré grâce aux canaux calciques voltage-dépendants (Barker, Leibiger et al. 2002) ou de manière calcium indépendante via les métabolites glycolytiques (Rana, Kowluru et al. 1986; Rana, Sekar et al. 1987) ou grâce à la dépolarisation de la membrane plasmique (Henquin, Jonas et al. 1998) (Tengholm and Gylfe 2009).

#### ***1.1.3.4 Le système vasculaire des îlots et la sécrétion d'insuline***

La structure et la fonction des îlots de Langerhans sont intimement liées à leur vascularisation (Richards, Raines et al. 2010). Les vaisseaux sanguins sont 5 fois plus présents dans les îlots que dans le tissu exocrine (Henderson and Moss 1985), représentent 7 à 10% du flux sanguin du pancréas total (Jansson and Carlsson 2002), les capillaires sont 10 fois plus fenestrés que dans le pancréas exocrine (Henderson and Moss 1985) ; (Bearer and Orci 1985). Toutes les cellules de l'îlot sont en contact avec un vaisseau (Olsson and Carlsson 2006) comme représenté dans la figure 10 et la forte fenestration des vaisseaux des îlots permet aux cellules d'être en contact permanent et quantitativement élevé avec les nutriments circulants, (Richards, Raines et al. 2010). Le flux sanguin est plus important dans le sens de l'efflux que dans le sens de l'influx, suggérant le rôle crucial de la circulation sanguine dans la distribution rapide de l'insuline (Nyman, Ford et al. 2010).



**Figure 10 :** Sur ces photos de microscopie à fluorescence, toutes les cellules de l'îlot humain sont en contact avec le système vasculaire. (A) Ilot entier avec marquage de l'insuline (rouge), du glucagon (vert) et des vaisseaux (bleu), (B-D) Trois grossissements de l'îlot présenté en (A), (E) Ilot entier avec marquage de l'insuline (rouge), de la somatostatine (bleu ciel) et des vaisseaux (bleu foncé), (F-H) Trois grossissement de l'îlot présenté en (E). Figure tirée de l'article de (Cabrera, Berman et al. 2006).

D'autre part, la taille des îlots est aussi en corrélation avec la vascularisation et la fonction des cellules bêta. En effet, Li et al. ont démontré récemment que les petits îlots présentent une meilleure microcirculation et une meilleure revascularisation que les grands îlots. Ces îlots montrent aussi une plus grande densité de cellules bêta, une plus grande quantité d'insuline intracellulaire et sécrétée, et ainsi participent plus à la régulation de la glycémie (Li, Zhao et al. 2014).

## 1.2 Diabète de type 2 et cellules bêta

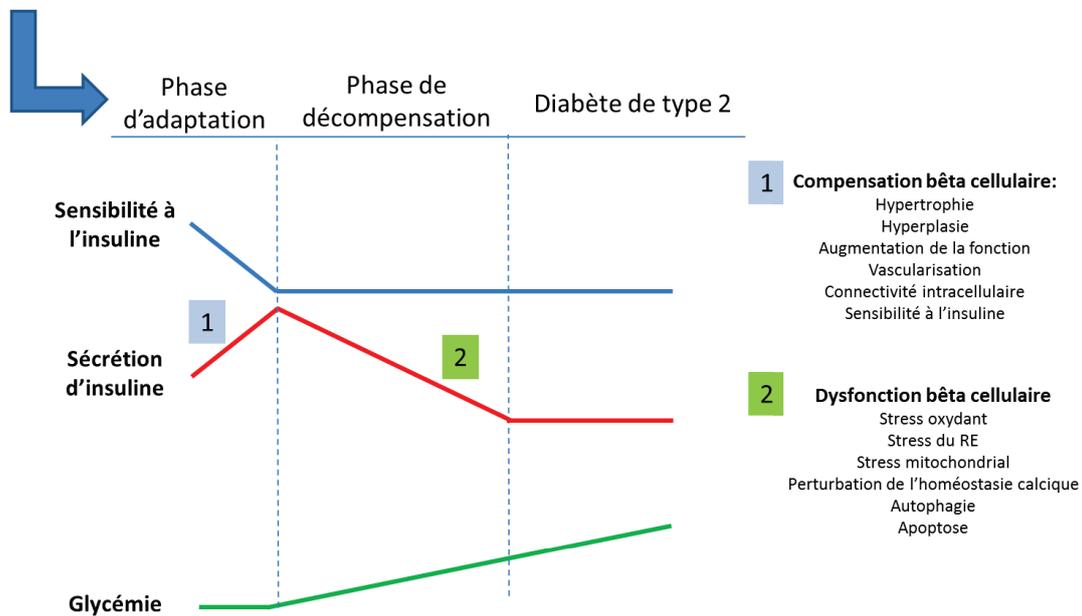
### 1.2.1 Le diabète de type 2

---

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique évolutive caractérisée par une hyperglycémie chronique à jeun. Cette pathologie touche près de 300 millions de personnes dans le monde et les estimations actuelles parlent de 450 millions de personnes d'ici à 2030. En France, ce sont 400 nouvelles personnes qui sont diagnostiquées diabétiques (chiffres de la Société Francophone du Diabète). L'origine de son apparition est multifactorielle, avec des facteurs génétiques et environnementaux. L'élévation chronique du glucose plasmatique a des effets délétères sur la sécrétion d'insuline des cellules bêta et l'action de l'insuline sur les tissus périphériques, ainsi que sur les vaisseaux sanguins, les cellules nerveuses et d'autres types cellulaires, phénomène appelé glucotoxicité (Poitout, Amyot et al. 2010). A long terme, la sécrétion d'insuline produite et sécrétée n'est plus suffisante pour compenser la résistance à l'insuline des tissus périphériques, appelée insulino-résistance, et déclenche l'apparition d'une hyperglycémie chronique caractérisant le DT2 (Weyer, Bogardus et al. 1999). La variabilité glycémique observée chez les patients atteints de cette pathologie est un des paramètres influant de manière importante sur l'altération de la fonction bêta-cellulaire (Kohnert, Freyse et al. 2012).

Comme présenté dans la figure 11, au cours du développement et de l'apparition du DT2, différents stress cellulaires apparaissent, dans un premier temps adaptatifs pour compenser l'excès de glucose et de lipides dans le sang et rétablir des taux circulants adéquats, et dans un second temps participant à la décompensation globale de l'organisme. Ces stress sont notamment présents dans les cellules bêta-pancréatiques, le foie, le tissu adipeux et le muscle (Kahn 2003). Il s'agit du stress du RE, du stress mitochondrial, du stress oxydant, de la perturbation de l'homéostasie calcique, de l'autophagie, de l'apoptose et de l'inflammation. Seuls les stress du RE, mitochondrial, oxydant et calcique, qui ont fait l'objet de cette thèse, seront détaillés, ainsi que leur rôle dans le phénomène de glucotoxicité et/ou de lipotoxicité dans les cellules bêta.

- Facteurs génétiques
- Facteurs environnementaux, dont:  
Glucotoxicité, lipotoxicité,  
glucolipotoxicité



**Figure 11 :** Evolution des paramètres métaboliques et mécanismes mis en place au cours du développement du DT2. Lors du développement du DT2, la sensibilité des tissus périphériques diminue, la sécrétion d'insuline augmente pour pallier à la baisse de son action. Lorsque la sécrétion d'insuline n'est plus suffisante, la glycémie à jeun augmente jusqu'à dépasser 1,26g/L de sang, critère qui définit l'apparition du diabète. Au cours de la première phase d'adaptation bêta cellulaire, différents mécanismes de compensation apparaissent pour favoriser l'accroissement de la sécrétion d'insuline. Dans la phase suivante, les cellules bêta dysfonctionnent suite à la mise en place de différents processus. Les facteurs génétiques et environnementaux peuvent avoir des effets tout au long des trois phases d'adaptation, de décompensation et de dysfonction.

### 1.2.2 La glucotoxicité

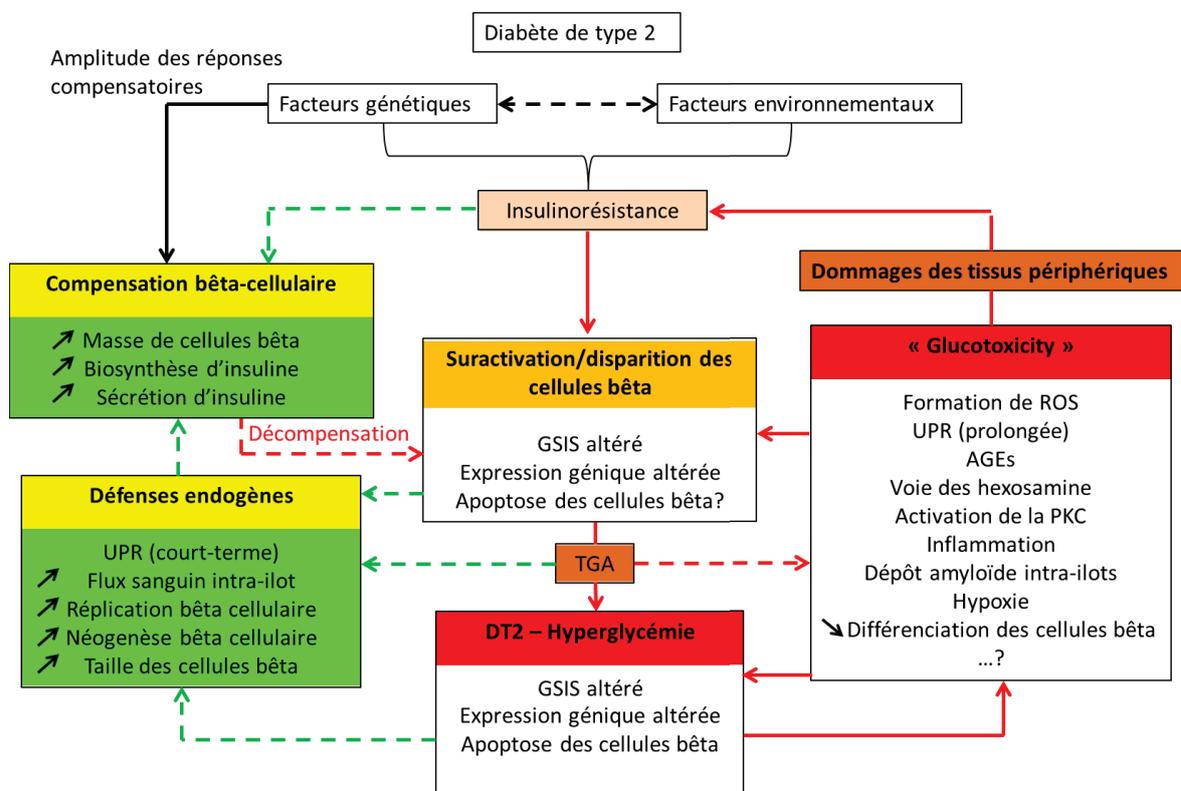
Le concept de glucotoxicité a été introduit par Unger et al. en 1985 qui a montré que l'élévation de la glycémie est délétère pour la sécrétion d'insuline chez l'homme (Unger and Grundy 1985). Solomon et al. en 2012 ont montré qu'un clamp hyperglycémique à 11,1mM durant 24h chez des sujets sains entraînait une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse à différents substrats tels que l'arginine et le GLP-1 (Solomon TPJ et al. 2012). Ils ont aussi montré que la sécrétion d'insuline n'était pas suffisante pour compenser la réduction d'insuline induite par l'augmentation de la glycémie. Ces résultats prouvent qu'à court terme l'hyperglycémie peut avoir des effets délétères sur la fonction bêta pancréatique et les tissus périphériques et peut de fait participer à leur dysfonction à long-terme. Cependant, une concentration de glucose de 11,1mM est une dose élevée comparée à la glycémie normale chez l'homme (proche de 5,5mM) et l'hyperglycémie chronique retrouvée chez les diabétiques de type 2 (supérieure à 6,9mM). Par ailleurs, la variabilité glycémique observée chez les patients atteints d'un DT2 est un des paramètres influant de manière importante sur l'altération de la fonction bêta-cellulaire (Kohnert, Freyse et al. 2012). Il apparaît

donc que l'élévation chronique modérée chez les diabétiques de type 2, associée à une forte variabilité, participe à l'altération des paramètres métaboliques et à la dysfonction bêta pancréatique.

Des études *in vitro* ont confirmé ce concept dans des îlots humains (Eizirik, Korbitt et al. 1992) et de rongeurs (Harmon, Gleason et al. 2001) (Broca, Varin et al. 2014) et des lignées bêta-cellulaires (Harmon, Stein et al. 2005) (Dubois, Vacher et al. 2007).

De nombreuses études *in vitro* observent qu'une dose élevée de glucose entraîne des perturbations de la sécrétion d'insuline dans les cellules bêta via divers mécanismes : l'apoptose (Del Guerra, Lupi et al. 2005), le stress oxydant et la dysfonction mitochondriale (Johnson 2012), le stress du RE (Ozcan, Cao et al. 2004), l'inflammation (Hotamisligil 2010) et l'autophagie (Han, Yang et al. 2010).

Comme présentés dans la figure 12 (Bensellam, Laybutt et al. 2012), de nombreux processus sont à l'œuvre dans la cellule bêta et participent à l'adaptation des cellules bêta dans un premier temps, puis dans un deuxième temps à la perte de leur capacité sécrétrice et au développement du DT2.



**Figure 12:** Schéma représentatif des mécanismes de la dysfonction bêta-cellulaire et de l'insulinorésistance dans le diabète de type 2. Le développement du diabète de type 2 est le résultat de facteurs génétiques et environnementaux qui peuvent interagir. Ces facteurs entraînent le développement d'une insulinorésistance et déclenchent par cette voie des mécanismes compensatoires dans les cellules bêta afin de produire plus d'insuline et ainsi réduire l'hyperglycémie induite par une insulinorésistance. Les mécanismes d'adaptation bêta-cellulaire sont prédéterminés génétiquement. L'insulinorésistance active une sécrétion d'insuline et une adaptation plus forte des cellules bêta. L'intolérance au glucose (TGA : tolérance au glucose altérée) apparaît lorsque les cellules bêta ne parviennent plus à compenser suffisamment l'insulinorésistance et que s'installe une hyperglycémie chronique. L'excès de glucose circulant a des effets délétères au niveau circulant et cellulaire. Les altérations conséquentes amplifient la boucle insulinorésistance-dysfonction bêta pancréatique et conduisent progressivement au diabète de type 2 dont la détermination se fait lorsque la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1,26g/L. Traduit de l'article de (Bensellam, Laybutt et al. 2012).

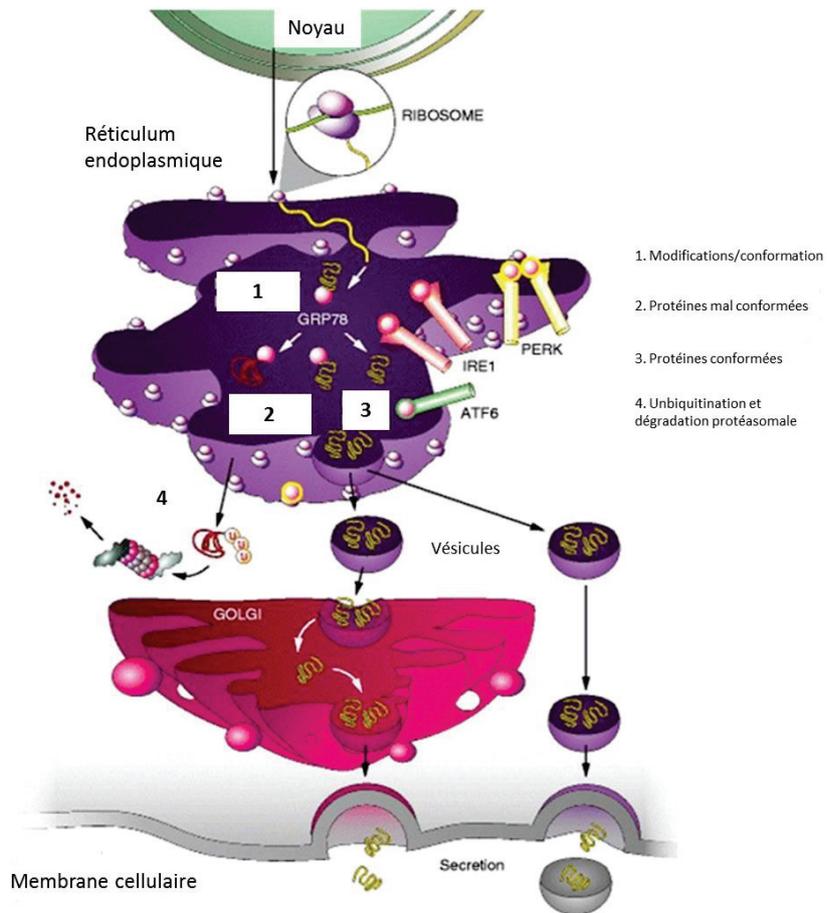
Nous allons discuter de trois stress importants qui peuvent apparaître au cours de la glucotoxicité dans les cellules bêta pancréatiques et qui ont fait l'objet de cette thèse : le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydant et mitochondrial, et la perturbation de l'homéostasie calcique.

### 1.2.2.1 Le stress du RE

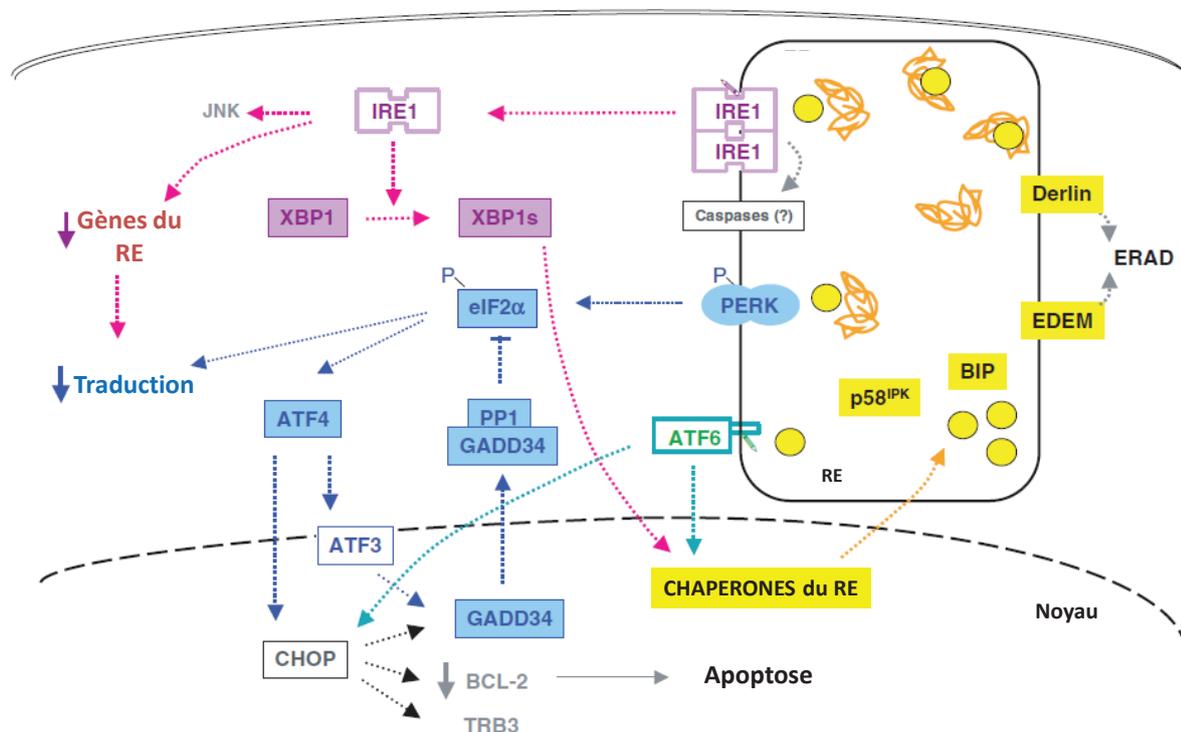
Le RE est un organite intracellulaire dynamique qui régule de nombreuses fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie de la cellule, à son développement et sa capacité de réponse adaptée à des modifications de l'environnement. Le RE contrôle la conformation des protéines et leur adressage à d'autres organites, il modifie et transfère les lipides, il régule l'homéostasie calcique. C'est par un ensemble de protéines et de mécanismes coordonnés qu'il est capable d'occuper cette place importante dans la cellule.

Lors d'une sollicitation excessive, peut apparaître un stress du RE. Il est notamment décrit comme processus activé par la glucotoxicité dans de nombreuses pathologies dont le diabète (Ladiges, Knoblaugh et al. 2005; Thameem, Farook et al. 2006; Laybutt, Preston et al. 2007). L'augmentation des marqueurs du stress du RE a ainsi été mise en évidence dans des îlots de diabétiques de type 2, comparaison faite avec des îlots de sujets sains (Marchetti, Bugliani et al. 2007). De tels résultats ont aussi été obtenus dans différents modèles : des îlots de souris db/db présentant une résistance à l'action de la leptine (Laybutt, Preston et al. 2007), dans des îlots de rats exposés *in vitro* à une dose élevée de glucose (Elouil, Bensellam et al. 2007) et dans des lignées cellulaires beta comme les INS-1 (Seo, Kim et al. 2008) (Bensellam, Laybutt et al. 2012).

Lors d'un besoin de traduction plus important, le RE conforme plus de protéines dans sa lumière. Lorsque la quantité de protéines à conformer dépasse ses capacités, il y a accumulation de protéines mal conformées. Cette accumulation est un signal pour le RE de mettre en place une réponse adaptée pour à la fois augmenter ses capacités de conformation et réduire la traduction, c'est l'Unfolded Protein Response (UPR). La Glucose Regulated Protein 78 (GRP78 ou BIP : Binding immunoglobulin protein) se détache de ses différents récepteurs : la protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), l'activating transcription factor 6 (ATF6) et l'inositol-requiring element 1a (IRE-1a) à la surface interne de la membrane du RE, afin de conformer les protéines mal conformées. Le détachement de GRP78 active ainsi ces récepteurs qui se dimérisent et induisent chacun une cascade d'activation spécifique. Cette cascade conduit à la modification de l'expression de gènes cibles. Une fois que le RE a une capacité conformationnelle suffisante, GRP78 se fixe à nouveau à ses récepteurs et arrête ainsi l'UPR. La figure 13 montre l'état normal du RE, lorsque la quantité de protéines à conformer n'excède pas ses capacités et que GRP78 est fixé à PERK, IRE1a et ATF6. La figure 14 montre l'activation de l'UPR en réponse à une élévation de la quantité de protéines mal conformées dans la lumière du RE.



**Figure 13 :** Schéma représentatif de l'état normal du RE. Les protéines qui sont entrées dans le RE sont conformées et transportées vers l'appareil de Golgi et d'autres destinations. GRP78 est fixé au domaine intra-luminal de PERK, IRE1 et ATF6. Figure traduite de l'article de (Park and Ozcan 2013).



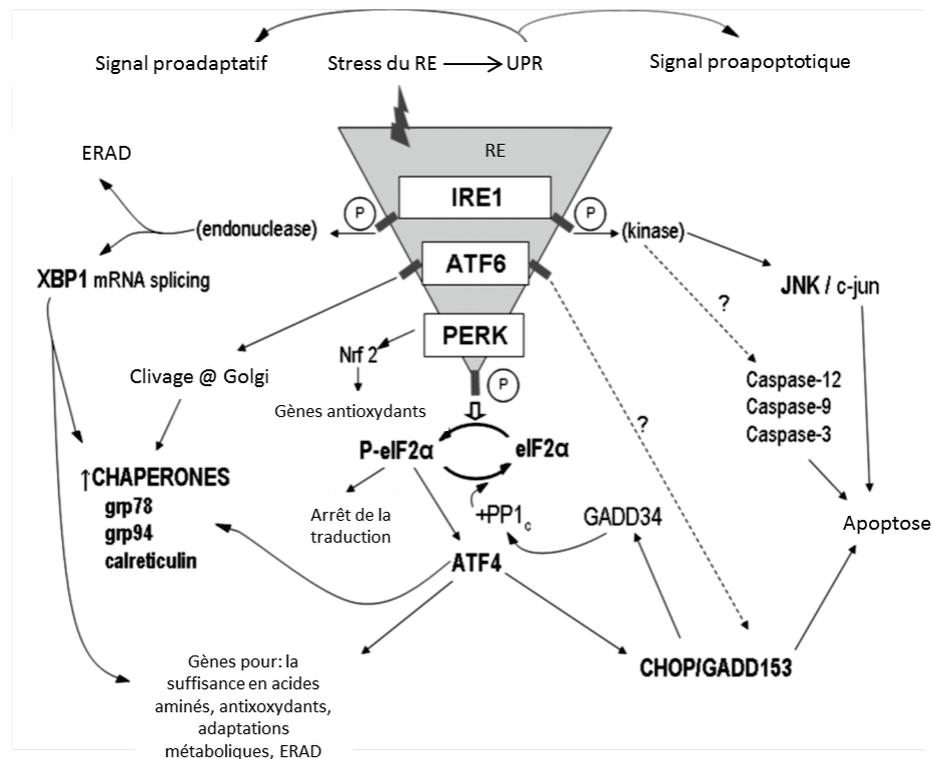
**Figure 14** : Schéma représentant les voies de signalisation activées lors du stress du RE. Le détachement de BIP (GRP78) de ses trois récepteurs active ces derniers et leurs voies de signalisation associées. IRE1 active le splicing d'un ARNm XBP en XBP1s, peut aussi activer JNK et inhiber la traduction globale. XBP1s est transloqué dans le noyau pour activer la transcription des gènes codant pour les protéines chaperones nécessaires à la conformation des protéines dans le RE. PERK activé phosphoryle le facteur de transcription eIF2α et l'inhibe, ce qui aura pour conséquence d'inhiber la traduction globale et d'activer la voie ATF4. Celle-ci peut conduire à l'activation d'ATF3, qui régule négativement la phosphorylation de PERK. La protéine p58IPK pourrait aussi participer à cette inhibition. ATF4 peut aussi activer la voie proapoptotique CHOP. ATF6, une fois activé, va au niveau de l'appareil de Golgi où il est clivé pour ensuite aller dans le noyau activer la transcription des gènes codant pour les protéines chaperones. Les protéines mal conformées peuvent être aussi acheminées hors du RE grâce aux protéines Derlin et EDEM (ER degradation enhancing -mannosidase-like protein) vers le protéasome et être dégradées par l'ERAD (ER-Associated-Degradation). Figure adaptée de l'article de (Eizirik, Cardozo et al. 2008).

Selon le type cellulaire et le stress induit, une, deux ou trois des voies régulées par GRP78 va ou vont être activées. L'activation de ces voies fait l'objet de nombreuses études, qui tentent de comprendre l'implication de chacune d'elles dans la réponse cellulaire à un stress. Par exemple, IRE-1a régule la synthèse protéique réticulaire comme l'insuline (Lipson, Fonseca et al. 2006), la conformation, la glycosylation, l'ERAD, le métabolisme redox, l'autophagie, la biogenèse lipidique et le trafic vésiculaire (Walter and Ron 2011). En association avec la voie PERK, les voies de l'UPR sensibilisent les cellules bêta à l'action des cytokines et facilitent un état inflammatoire par l'activation du facteur NF-κB (Eizirik, Miani et al. 2013). L'activation de PERK conduit à la phosphorylation du facteur de transcription eIF2α qui va inhiber

globalement la traduction. La phosphorylation d'eIF2a permet aussi de prévenir le stress oxydant et d'adapter au mieux les capacités de conformation du RE afin de favoriser la production d'insuline (Back, Scheuner et al. 2009). Toutefois, une activation trop importante de ce facteur a des conséquences délétères sur les cellules bêta (Cnop, Ladriere et al. 2007). ATF6 est responsable de la traduction accrue de chaperones, de XBP1 et de la synthèse lipidique après sa libération de la membrane du RE et son clivage par une enzyme spécifique, S1P, au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (Park and Ozcan 2013).

Cet exemple illustre l'interrelation entre les voies du stress du RE, mais elles ne fonctionnent cependant pas toujours de cette façon. Par exemple, ATF6 et XBP1s qui régulent tous deux la synthèse lipidique et l'expansion du RE – qui accroît ainsi sa surface d'activité pour compenser l'excès de protéines mal conformées -, peuvent fonctionner de manière indépendante (Bommiasamy, Back et al. 2009). GRP78 est une protéine dont l'expression est variable dans le temps lors d'un stress du RE : elle va d'abord être accrue, afin de favoriser la conformation des protéines, puis diminuer lorsque celles-ci seront moins accumulées dans le RE et réaugmentera si le stress perdure et stimule la traduction (Park and Ozcan 2013).

La figure 15 montre que les voies de l'UPR peuvent conduire à l'activation différentielle de voies de signalisation pro-adaptatives ou pro-apoptotiques. Cette figure résume bien ce qui est retrouvé dans la littérature: d'un agent inducteur de stress du RE à un autre, les voies activées sont différentes et entraînent des effets plus ou moins intenses dans les cellules, pouvant aller jusqu'à l'apoptose. Comme nous pouvons le voir sur cette figure, l'apoptose peut être due à l'activation de CHOP ou des caspases ou des deux voies. Cela est aussi vrai pour les îlots humains, les MIN6 et les INS-1 (Lai, Bikopoulos et al. 2008).



**Figure 15 :** Le stress du RE et les voies de signalisation activées. Le stress du RE déclenche une UPR qui peut activer des voies proadaptatives ou proapoptotiques. Parmi les voies proadaptatives, les voies de XBP1s, des chaperones , de Nrf2 et de p-eIF2a sont activées. Les voies JNK, caspases, CHOP et ATF4-CHOP font partie des voies proapoptotiques. Chaque récepteur réticulaire du stress du RE peut participer à l'adaptation ou à l'apoptose. (Saiki, Ohira et al. 2009).

L'ensemble des données actuelles montre l'étonnante diversité de réactions possibles du RE face à un stress et si ses réponses sont regroupées sous un seul terme, UPR, c'est en réalité un grand nombre de mécanismes qui peuvent être mis en place, en association ou individuellement, rapidement ou plus tardivement et agir tant au niveau de la morphologie du RE que de sa fonction afin de l'adapter aux nouvelles situations environnementales.

Le stress du RE est rencontré dans de nombreuses pathologies. Il semble être à la fois cause et conséquence de maladies métaboliques et de maladies non métaboliques. Dans les maladies métaboliques, le stress du RE est associé au diabète de type 1 (Cnop, Welsh et al. 2005) et au diabète de type 2 (Back and Kaufman 2012), à l'obésité (Cnop, Fougelle et al. 2012), (Maris, Overbergh et al. 2012), à l'hypertension artérielle (Spitler, Matsumoto et al. 2013), (Hasty and Harrison 2012), au syndrome d'apnée du sommeil (Naidoo 2012), ainsi qu'à l'inflammation rénale chez le diabétique (De Miguel and Pollock 2013). Puisque le stress du RE est d'abord une réponse à une demande de conformation plus importante, son apparition et sa durée sont une conséquence. Lorsque celui perdure, il est capable d'induire un dysfonctionnement voire la mort cellulaire et être ainsi une cause dans le développement des pathologies.

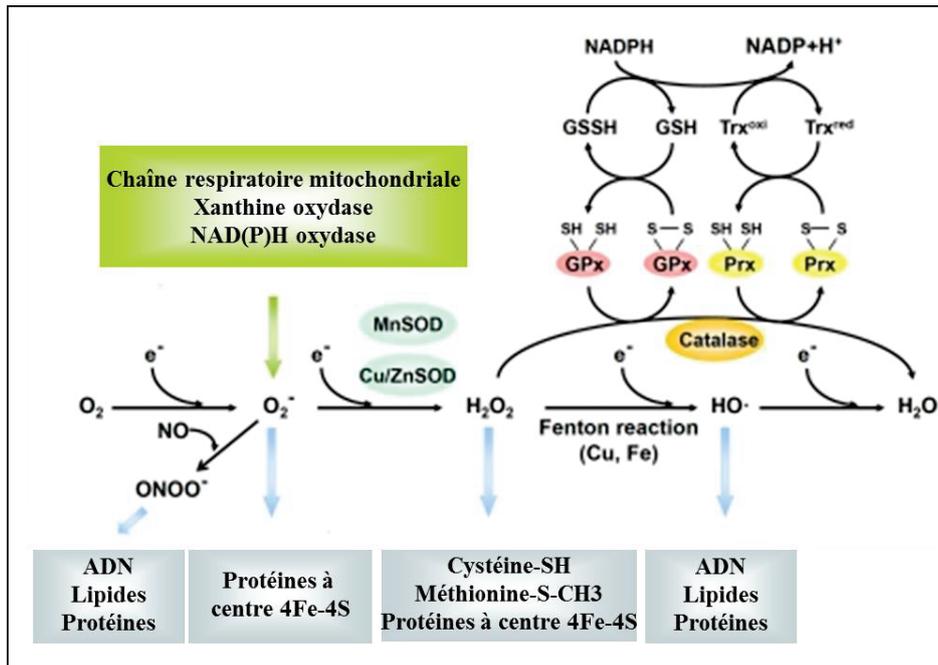
Le stress du RE est aussi rencontré dans des maladies non métaboliques telles que par exemple la maladie de Crohn (Deuring, Fuhler et al. 2014), les affections pulmonaires chroniques (Wei, Rahman et al. 2013) et les maladies neurologiques (Roussel, Kruppa et al. 2013).

### 1.2.2.2 Le stress oxydant et mitochondrial

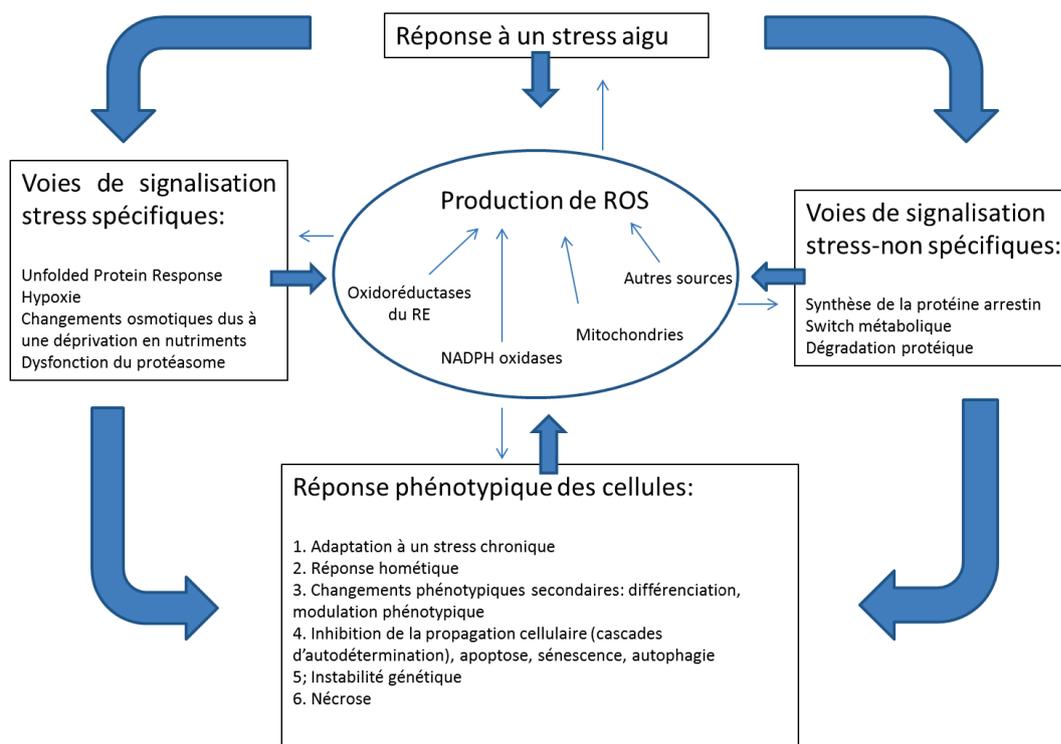
La glucotoxicité accroît aussi le stress oxydant en favorisant une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) (Newsholme, Haber et al. 2007). Des îlots de rats exposés durant trois jours à une dose élevée de glucose montrent une augmentation de l'apoptose. Dans ces conditions, l'addition de glutathion, un composé antioxydant, ou d'un capteur de ROS, réduit significativement le taux de nitrotyrosine, marqueur du stress oxydant, et améliore la sécrétion d'insuline des cellules bêta (Piro, Anello et al. 2002). Le glucose accroît la production de ROS dans des îlots de souris, de rats et la lignée cellulaire BRIN-BD11 (Morgan, Oliveira-Emilio et al. 2007), (Sakai, Matsumoto et al. 2003), (Zraika, Aston-Mourney et al. 2006).

Par ailleurs, dû à leur faibles défenses antioxydantes (Lenzen, Drinkgern et al. 1996), (Tonooka, Oseid et al. 2007), les cellules bêta sont plus sensibles à une exposition prolongée à une dose élevée de glucose. Même si à court terme il est probable que cette faible défense permette une action rapide et importante des ROS pour accroître la sécrétion d'insuline, il est tout aussi probable qu'elle soit favorable à une altération des cellules lors d'une exposition prolongée en ne compensant pas suffisamment l'élévation de ces ROS (Lenzen 2008).

Les ROS cytoplasmiques sont produites par les NADPH oxydases membranaires et les ROS mitochondriale au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Newsholme, Haber et al. 2007) (Mohammed and Kowluru 2013) (Murphy 2009). Plusieurs voies sont modulées par les ROS et conduisent à l'altération de la fonction bêta-pancréatique comme par exemple l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale (Li, Brun et al. 2009), l'altération du potentiel membranaire mitochondrial et l'apoptose (Li, Zhou et al. 2013). Depuis une dizaine d'années, la protéine Txnip (Thioredoxin-interacting protein) fait aussi l'objet d'étude dans ce domaine car il a été montré son rôle dans l'accroissement des ROS et de leurs effets négatifs sur la sécrétion d'insuline (Rani, Mehta et al. 2010). Pour résumer au niveau cellulaire, la figure 16 montre les origines du stress oxydant et la figure 17 présente les interactions entre les ROS et les réponses cellulaires au stress.



**Figure 16 : Origines du stress oxydant dans les cellules.** NADP(H), nicotinamide adenine dinucléotide phosphate; MnSOD, manganèse superoxyde dismutase; Cu/ZnSOD, cuivre/zinc superoxyde dismutase; GPx, glutathion peroxydase; Prx, peroxyredoxine; Trx, thiorédoxine; 4Fe-4S, centre fer-soufretétranucléaire; NO, oxyde nitrique;  $ONOO^-$ , peroxy-nitrique;  $O_2^{\cdot -}$ , anion superoxyde;  $H_2O_2$ , peroxyde d'hydrogène;  $HO^{\cdot}$ , ion hydroxyle; GSSH, glutathion oxydé, GSH, glutathion réduit. Adapté de Chang et Chuang 2010. Figure extraite de la thèse d'Amélie Bravard 2011 (Inserm U1060 CarMeN).



**Figure 17 :** L'interaction entre la production de ROS et les réponses cellulaires aux stress. La production de ROS peut être déclenchée par un stress aigu, par des voies de signalisations de stress spécifiques telles que l'UPR, l'hypoxie, etc. Mais aussi par des voies de signalisation de stress non spécifiques comme l'arrêt de la synthèse protéique, les changements métaboliques et la dégradation protéiques. La production de ROS peut aussi être liée à des réponses cellulaires phénotypiques telles que l'adaptation à un stress chronique, l'apoptose, l'autophagie. L'ensemble de ces mécanismes peut être influencé par les ROS eux-mêmes. Traduit de l'article de (Santos, Tanaka et al. 2009).

L'exposition intermittente d'îlots à des doses élevées de glucose provoque des altérations morphologiques des mitochondries (Del Guerra, Grupillo et al. 2007). Ces résultats montrent que les fluctuations de la concentration en glucose, comme celle retrouvée chez des patients pré-diabétiques, peut induire des perturbations cellulaires, en plus des effets du glucose seul. L'altération de la morphologie des mitochondries a aussi été montrée par (Masini, Anello et al. 2014), où elles étaient plus volumineuses et leurs crêtes moins visibles en microscopie électronique en présence d'une dose élevée de glucose. Celui-ci altère aussi le réseau mitochondrial par la modification de l'expression de protéines de fusion et de fission mitochondriale telle que DRP1 et qui entraîne une perte de fonction (Men, Wang et al. 2009) (Supale, Li et al. 2012). La polarité des membranes est perturbée (Lim, Rashid et al. 2011), tout comme l'activité ATPasique (Masini, Anello et al. 2014) et l'activité métabolique (Wallace, Whelan et al. 2013). D'autre part, lorsque les mitochondries sont chargées en calcium, dû à une vidange calcique réticulaire accrue, ou lorsqu'elles accumulent des lipides, elles déclenchent l'ouverture du pore de transition mitochondrial, libérant ainsi notamment du cytochrome c dans le cytoplasme, activateur de l'apoptose (Bernardi and Rasola 2007).

Nous avons détaillé ici les mécanismes qui interviennent au cours du diabète de type 2 et qui ont fait l'objet de cette thèse. D'autres mécanismes non présentés ici sont tout aussi essentiels, comme l'hypoxie (Girgis, Cheng et al. 2012), l'inflammation tissulaire (Donath and Shoelson 2011) et cellulaire (Lacraz et al. 2009 ; Maedler et al. 2001, 2002), l'autophagie (Mazza and Maffucci 2014) et les dépôts amyloïdes (Clark and Nilsson 2004). Il est intéressant de noter que ces processus fonctionnent en association : en effet, l'augmentation de l'expression du facteur HIF-1b en réponse à une hypoxie modifie l'activité mitochondriale et active l'autophagie de la mitochondrie pour prévenir du stress oxydant (Semenza et al. 2010 ; Taylor et al. 2008). Elle peut entraîner la mort des cellules bêta en faisant intervenir le stress du RE et l'apoptose qui y est liée (Zheng, Wang et al. 2012). L'hypoxie active aussi la mort des cellules endothéliales des îlots et perturbe la vascularisation intra-îlots, participant à la dysfonction de l'îlot et des cellules bêta le composant (Li et al. 2006). Notre équipe a souligné l'importance de l'interrelation fonctionnelle des types cellulaires de l'îlot en montrant qu'une dose élevée de glucose inhibe l'angiogenèse dans les îlots humains et pourrait être un des mécanismes régulateurs impliqués aussi dans la perte de fonction des cellules bêta (Dubois S et al. 2010). Enfin, les dépôts amyloïdes peuvent déclencher un stress du RE dans des îlots de souris (Cadavez, Montane et al. 2014) mais pas nécessairement (Hull, Zraika et al. 2009) et une apoptose dans des îlots humains (Janson, Ashley et al. 1999).

Le RE produit 25% des ROS intracellulaires lors de son activité de conformation des protéines (Tu and Weissman 2004), il est donc envisageable de penser que, lors d'un stress du RE où l'activité de conformation des protéines est accrue, la quantité de ROS produits par le RE est plus importante et participe aux effets globaux des ROS dans les cellules bêta. La cellule bêta est un bon modèle dans la mesure où l'insuline représente 50% de ses protéines et que son activité est susceptible d'augmenter fortement lors d'une stimulation externe. Cette hypothèse n'a cependant, à notre connaissance, jamais encore été vérifiée.

Malhotra et al. ont décrit l'interaction entre stress du RE et stress oxydant comme pouvant être soit bénéfique soit délétère pour les cellules en fonction des conditions environnementales (Malhotra and Kaufman 2007). D'autre part, l'inhibition du stress oxydant prévient la dysfonction mitochondriale (Victor, Rocha et al. 2011), mais en revanche, les traitements antioxydants ne sont pas efficaces pour soigner le DT2 et cela pourrait être expliqué par la dissociation possible entre le stress du RE et le stress oxydant. L'action sur l'un n'améliorerait pas nécessairement l'autre (Mooradian and Haas 2011). Cela montre encore un peu plus la complexité des processus mis en œuvre lors d'une hyperglycémie chronique.

### **1.2.2. 3 La perturbation de l'homéostasie calcique**

Par ailleurs, en conditions de glucotoxicité, le calcium réticulaire est plus faible et promeut le développement d'un stress du RE dans les cellules bêta (Hara, Mahadevan et al. 2014). Cette vidange calcique est liée à la fois à la réduction de la quantité de la pompe calcique Serca2b (Kono, Ahn et al. 2012), isoforme majoritaire des cellules bêta (Brini and Carafoli 2009), et à l'augmentation de l'expression des canaux de fuite calcique réticulaire (Lee, Jonas et al. 1999). Ensemble, ces phénomènes favorisent à la fois une plus faible capacité de conformation du RE mais aussi l'apoptose calcium-dépendante comme la voie

de la calpain-2 (Hara, Mahadevan et al. 2014). Ils favorisent aussi l'apoptose par l'activation de CHOP, activé lors d'un stress du RE intense ou prolongé. Dans ces conditions, le calcium cytosolique n'est pas plus élevé. Cela suggère donc que le calcium peut être dirigé vers certains organites tels que la mitochondrie. Cette entrée pourrait altérer la fonction mitochondriale et à terme la sécrétion d'insuline. D'autre part, le calcium est aussi libéré à l'extérieur des cellules bêta pour stimuler la sécrétion d'insuline grâce au calcium-sensing receptor (Gerbino, Maiellaro et al. 2012). Il a été montré que ce récepteur active l'inflammasome NLRP3 dans les cellules bêta lors d'une élévation de calcium dans le cytosol, telle qu'il existe lors d'une vidange calcique réticulaire. L'activation de NLRP3 pourrait contribuer à l'activation de l'inflammation et du stress oxydant dans les cellules bêta dans ces conditions (Schroder, Zhou et al. 2010).

Le glucose est donc capable d'induire un stress du RE, un stress oxydant, une perturbation de l'homéostasie calcique dans les cellules bêta. Il semble que ces stress s'auto-alimentent et réduisent la fonction des cellules bêta. En effet, le glucose accroît l'activité mitochondriale afin de stimuler la sécrétion d'insuline mais à long terme altère la fonction mitochondriale et la sécrétion d'insuline (Chen, Cui et al. 2013). Il active aussi la production de ROS mitochondriaux (Tang et al. 2007), qui activent à leur tour des cascades de signalisation cytosoliques et altèrent la structure et la fonction mitochondriale comme nous l'avons vu précédemment (Rolo and Palmeira 2006). Les ROS modifient l'homéostasie calcique dans les cellules, et participent ainsi au déclenchement d'un stress du RE (Kiviluoto, Vervliet et al. 2013). Les ROS entraînent aussi des altérations du métabolisme cellulaires des lipides qui peuvent participer à la dysfonction globale de la cellule (Vamecq, Dessein et al. 2012).

La glucotoxicité entraîne le développement progressif d'une insulino-résistance des tissus périphériques, notamment en altérant la voie de signalisation du récepteur à l'insuline-IRS-PI3Kinase-Akt. La sécrétion excessive d'insuline dans le sang entraîne la réduction du nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules des tissus périphériques, favorisant ainsi la réduction de l'action de l'insuline et l'élévation consécutive de la glycémie. Il s'agit donc ici d'un phénomène aggravant, accélérateur de l'apparition du diabète de type 2 (LeRoith 2002).

Cependant, en raison du contrôle très fin de la glycémie, les effets délétères de l'hyperglycémie pourraient agir relativement tard dans le développement de la pathologie. Le mode de vie, particulièrement l'alimentation et la sédentarité, augmente significativement la quantité d'acides gras circulants, capables de causer des effets délétères, pouvant conduire à l'aggravation de l'altération de la sécrétion et l'action de l'insuline induite par l'hyperglycémie (Grill and Bjorklund 2009). Ce phénomène, appelé lipotoxicité et suggère l'importance de la glucotoxicité et de la lipotoxicité *in vivo*.

### 1.2.3 La lipotoxicité

---

La définition de la lipotoxicité est multiple. En effet, elle fait référence à des effets délétères de lipides dans les cellules, mais est soit considérée comme présente lorsque ces effets déclenchent la mort cellulaire, soit comme présente lorsque les lipides entraînent des perturbations du métabolisme cellulaire qui peuvent éventuellement conduire à la mort cellulaire. Pour la suite de cet exposé, nous choisirons la seconde définition, qui nous permettra d'aborder de nombreux mécanismes impliqués dans les effets des lipides dans les cellules bêta.

La dyslipidémie est un des critères cliniques du syndrome métabolique. Si l'insulinorésistance et la dysfonction bêta-cellulaire ne sont pas nécessairement associées au syndrome métabolique (Karnchanasorn, Ou et al. 2013), la dyslipidémie est un facteur important dans leur développement et peut ainsi conduire au DT2. Ainsi, il est souvent observé chez le sujet DT2 une dyslipidémie représentée notamment par une augmentation des LDLs et une diminution des HDLs circulants (Sanyal, Ghosh et al. 2012). L'augmentation des LDLs les conduit à s'accumuler au niveau des vaisseaux et des tissus et à être oxydés, favorisant des pathologies comme l'athérosclérose. Les HDLs favorisent la fonction des cellules bêta (Fryirs, Barter et al. 2010). Lors d'une dyslipidémie, leur taux est souvent plus faible que la normale, ils ne peuvent alors plus compenser les effets délétères d'un excès de LDLs circulants et de l'hypercholestérolémie sur les cellules bêta (Fryirs, Barter et al. 2010) (Bardini, Rotella et al. 2012). Le métabolisme global et le métabolisme cellulaire spécifique sont donc étroitement liés.

Plusieurs études *in vivo* se sont attachées à établir les effets des AGs sur la fonction bêta-cellulaire. Chez l'homme, en réponse à une augmentation aiguë d'AGs dans le sang, la sécrétion était soit plus élevée, soit identique (Boden 2005). D'autre part, lors d'une stimulation de 24h à 48h, Kashyap et al. ont observé que la sécrétion d'insuline diminuait ou augmentait ou était similaire. Ces effets différentiels suggèrent l'implication de plusieurs facteurs tels que le temps d'exposition, la variabilité individuelle par exemple. Afin de savoir si la prédisposition génétique pouvait avoir un rôle dans ces effets, les auteurs de cette étude ont réalisé une augmentation de lipides sanguins pendant 48h chez des sujets sains et des sujets prédisposés à développer un DT2. Ils ont ainsi montré que l'augmentation des lipides circulants accroissait la sécrétion d'insuline chez les sujets sains, en réponse à une insulinorésistance, tandis que chez des sujets à risque, la sécrétion d'insuline était réduite (Kashyap, Belfort et al. 2003). Les auteurs ont alors fait l'hypothèse que l'exposition chronique à des doses élevées d'AGs augmentait l'incidence du DT2 chez des personnes ayant une prédisposition génétique pour cette pathologie.

Des résultats similaires ont été montrés *in vivo* chez l'animal et *in vitro*. Une étude menée chez le rat a montré que les lipides sont nécessaires à la sécrétion d'insuline et que leur absence réduit de manière importante cette sécrétion (Stein, Stevenson et al. 1997). Dans des îlots de souris isolés, le palmitate accroît la sécrétion d'insuline à court-terme grâce à la mise en jeu de phénomènes calciques (Warnotte, Gilon et al. 1994).

Cependant, une exposition chronique à des doses élevées d'AGs comme la plupart des populations à travers le monde y sont exposées, favorisent le développement de maladies métaboliques comme le DT2. En effet, le DT2 est positivement corrélé à des taux plus élevés de différents lipides circulants, dont des acides gras saturés comme le palmitate et des acides gras insaturés comme l'acide linoléique (Forouhi,

Koulman et al. 2014). Les lipides ont été montrés *in vivo* comme un des facteurs majeurs du développement de la dysfonction bêta-cellulaire associée au DT2 (Giacca, Xiao et al. 2011). Les études *in vitro* confirment les effets délétères des AGs à long-terme sur la sécrétion d'insuline dans des îlots humains, de rats et de souris (Elks 1993), (Zhou and Grill 1995) (Hoppa, Collins et al. 2009) (Olofsson, Collins et al. 2007).

Les effets délétères des AGs semblent être principalement dus à leur action sur le métabolisme des lipides dans les cellules (Prentki, Joly et al. 2002) et l'accumulation d'AGs à longue chaîne entraîne une inhibition directe de la sécrétion d'insuline (Poitout and Robertson 2002), ce qui expliquerait l'action à long terme. Les AGs peuvent modifier le métabolisme des cellules bêta par leur transformation intracellulaire et la génération de nouveaux métabolites qui vont participer à la fonction, à la dysfonction de la cellule, voire à la mort cellulaire (Maedler, Spinas et al. 2001) (Maedler, Oberholzer et al. 2003) (El-Assaad, Buteau et al. 2003). C'est par exemple le cas lors de la production de céramides et de sphingolipides à partir d'AGs saturés et d'AGs à longue chaîne et qui ont un pouvoir cytotoxique important, capables de déclencher l'apoptose (Shimabukuro, Higa et al. 1998; Boslem, Meikle et al. 2012). Plusieurs mécanismes sont mis en jeu lors des phénomènes lipotoxiques : la formation de céramides (Lupi, Dotta et al. 2002) (Shimabukuro, Higa et al. 1998), le stress oxydant (Wang, Li et al. 2004) (Li, Frigerio et al. 2008) (Gehrmann, Elsner et al. 2010), l'inflammation (Eguchi, Manabe et al. 2012), le stress du RE (Kharroubi, Ladriere et al. 2004) (Karaskov, Scott et al. 2006) (Cunha, Hekerman et al. 2008), la vidange calcique réticulaire (Cunha, Hekerman et al. 2008) (Gwiazda, Yang et al. 2009), la dysfonction mitochondriale et la perméabilité mitochondriale accrue, l'apoptose (Kharroubi, Ladriere et al. 2004), ainsi que le trafic protéique entre le RE et l'appareil de Golgi (Preston, Gurisik et al. 2009) et la modification des microARNs (Lovis, Roggli et al. 2008) (Fernandez-Hernando, Ramirez et al. 2013).

Toutefois, l'accumulation de toutes les formes de lipides n'est pas délétère dans les cellules bêta : les TGs sont protecteurs, quoiqu'ils ne soient pas une forme de stockage privilégiée dans les cellules bêta (Listenberger, Han et al. 2003). Par ailleurs, la structure de l'AG va conditionner ses effets à long terme sur la cellule bêta. Par exemple, les AGs monoinsaturés sont moins toxiques que les AGs saturés et cela car ils sont plus rapidement estérifiés en TGs (Maedler, Oberholzer et al. 2003) (Listenberger, Han et al. 2003) (Kusminski, Shetty et al. 2009). D'autre part, les AGs insaturés quant à eux ont été plutôt montrés comme protecteurs de la fonction bêta pancréatique, notamment lors d'une exposition à une dose élevée d'AGs saturés (El-Assaad, Buteau et al. 2003; Maedler, Oberholzer et al. 2003) (Cnop, Hannaert et al. 2001).

Cependant, la littérature semble s'accorder sur le fait que les AGs saturés et insaturés sont essentiels pour la santé lorsque ceux-ci sont en quantité respective et en association adéquates. Un pool d'AGs mal proportionné peut en effet entraîner une dysfonction bêta-pancréatique, en plus des effets de la seule augmentation d'un des AGs (Stein, Stevenson et al. 1997). Un excès de l'un ou de l'autre type est délétère à long-terme. En effet, chez l'homme, les AGs polyinsaturés inhibent directement la sécrétion d'insuline tandis que les AGs saturés entraînent une insulino-résistance qui n'est pas compensée de manière adéquate par une augmentation de la fonction bêta-cellulaire (Xiao, Giacca et al. 2006). L'excès d'oléate, un acide gras insaturé utilisé comme protecteur des effets des acides gras saturés, est délétère pour le métabolisme global et les cellules bêta lorsque son taux est en excès. Cela notamment en induisant une production excessive de ROS circulants et intra-îlots (Koulajian, Ivovic et al. 2013) (Koulajian, Desai et al. 2013) ainsi qu'une dysfonction mitochondriale (Tuo, Wang et al. 2011).

Par ailleurs, dans leur revue publiée en 2010, Poitout et al. ont proposé à partir de leurs travaux une cascade de voies de signalisation expliquant l'inhibition du gène codant pour l'insuline en réponse au palmitate. En effet, la baisse de l'expression du gène codant pour l'insuline précède la baisse de la sécrétion d'insuline et pourrait constituer une adaptation des cellules bêta au stress lipotoxique. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans ce phénomène, notamment le clivage d'ATF6 (Poitout, Amyot et al. 2010) et IRE1 (Seo, Kim et al. 2008). Ces résultats suggèrent l'importance du stress du RE dont ces deux protéines sont actrices, dans la lipotoxicité.

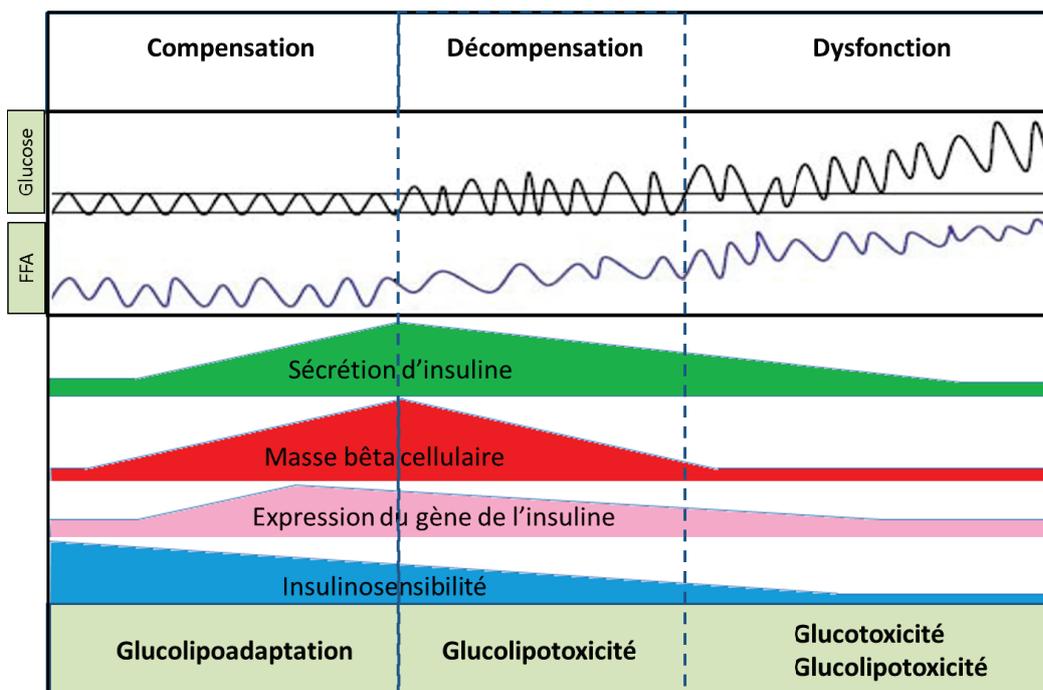
Il est ainsi intéressant de relever la complexité des interactions qui existent entre les différentes voies de signalisation impliquées dans la lipotoxicité dans les cellules bêta. Un exemple de cette complexité est la relation fonctionnelle entre le RE, le calcium, la mitochondrie et la sécrétion d'insuline. En effet, le RE et la mitochondrie échangent du calcium dans différentes conditions, dont l'hyperglycémie et la présence d'AGs. Cet échange conduit à une activation de la fonction mitochondriale afin d'accroître la sécrétion d'insuline via la production de métabolites intermédiaires comme l'ATP. Une question régulièrement soulevée est de savoir quel est le phénomène qui apparaît en premier et qui induit les suivants. Il semble aujourd'hui que ce sont des boucles qui s'autoalimentent avec un rôle essentiel du calcium. C'est le cas de la déplétion calcique réticulaire, qui initialement permet d'accroître la sécrétion d'insuline, mais qui à long-terme conduit à un stress du RE (Pedersen, Mosekilde et al. 2013) (Cunha, Hekerman et al. 2008). L'étude de Luciani et al. en 2013 a par ailleurs montré que la déplétion calcique est un facteur déclenchant le stress du RE et la dysfonction mitochondriale. Ils ont aussi montré que la dysfonction mitochondriale apparaîtrait suite à la capture du calcium par la mitochondrie et la vidange calcique réticulaire dans les cellules bêta pancréatiques (Luciani, Gwiazda et al. 2009).

Enfin, la fonction des cellules bêta peut aussi être perturbée dans leur réponse à des facteurs externes comme les hormones. Hodson et al. ont ainsi montré que l'altération par la lipotoxicité des connexions entre les cellules bêta, essentielles à la sécrétion d'insuline, est à l'origine de la perturbation de cette sécrétion en réponse aux incrétines (Hodson, Mitchell et al. 2013).

*In vivo*, chez l'homme et chez l'animal, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie sont souvent associées et concourent toutes deux aux dysfonctions cellulaires observées lors de pathologies métaboliques comme le DT2. C'est la raison pour laquelle il n'est pas évident de déterminer l'importance de l'une et de l'autre dans le développement et l'apparition du DT2, mais leur association explique aussi la grande variété de mécanismes impliqués dans cette pathologie.

## 1.2.4 Glucolipotxicité

Glucotoxicité et lipotoxicité apparaissent-elles dans un ordre défini lors du développement du DT2 ou sont-elles deux phénomènes concomitants. Poitout et al. ont proposé un schéma en trois phases tel que rapporté dans la figure 18 (Poitout, Amyot et al. 2010) comme hypothèse d'implication de la glucotoxicité et de la lipotoxicité dans le DT2 : compensation, décompensation et dysfonction glycémique. Ils proposent de parler de glucolipo-adaptation dans la phase de compensation. En effet, à ce moment-là, les cellules bêta détectent l'excès de nutriments et s'y adaptent pour y répondre de manière adéquate en terme de sécrétion d'insuline. Celle-ci est ainsi accrue, de même que l'expression du gène codant pour l'insuline et la masse des cellules bêta. Ceci est soutenu par le fait que l'augmentation subtile de la glycémie accroît la quantité de glucokinase dans les cellules bêta, ce qui les rend donc plus sensibles à une petite élévation de la glycémie lorsque celle-ci devient plus basse. La sensibilité à l'insuline quant à elle diminue progressivement tout au long du processus.



**Figure 18** : Représentation hypothétique de la progression de la compensation bêta-cellulaire à la dysfonction dans le cas d'une insulino-résistance induite par l'obésité et le rôle de la glucolipotxicité. Trois phases se succèderaient lors du développement du diabète de type 2 : une phase de compensation associée à une glucolipo-adaptation, une phase de décompensation associée à une glucolipotxicité et une phase de dysfonction associée à une glucotoxicité et une glucolipotxicité. Lors de la première phase, pour compenser la baisse de la sensibilité à l'insuline, le gène de l'insuline et la sécrétion d'insuline sont activées et la masse des cellules bêta accrue. Dans la deuxième phase ces trois paramètres vont progressivement diminuer. Cela se poursuivra dans la troisième phase, jusqu'à atteindre un niveau très faible. La dyslipidémie apparaîtra dans la deuxième phase et sera amplifiée dans la troisième tandis que l'hyperglycémie apparaîtra au cours de la troisième phase, la précédente montrant des perturbations dans des taux relativement physiologiques. Figure traduite de l'article de (Poitout et al. 2010).

La phase de décompensation débute lorsque les cellules bêta ne sont plus capables de produire suffisamment d'insuline pour compenser l'élévation glycémique liée à l'insulinorésistance et que l'expression du gène de l'insuline et la masse des cellules bêta diminuent. La glycémie peut revenir à la normale mais sa régulation est beaucoup plus aléatoire. Pour Poitout et al., c'est la glucolipotoxicité et non plus la glucolipo-adaptation qui intervient alors. Les cellules s'adaptent mais souffrent aussi de ces excès nutritionnels. Le glucose a un rôle important dans ce processus, cela a été montré chez des sujets sains dont la glycémie à jeun était normale ou légèrement supérieure à la normale. Chez les sujets avec une légère hyperglycémie, la première phase de sécrétion d'insuline était plus basse que celle des sujets sains après une perfusion de glucose par intraveineuse. Cela montre qu'une faible élévation du glucose sanguin de manière chronique altère la fonction bêta pancréatique en réponse au glucose (Brunzell, Robertson et al. 1976).

Enfin, lors de la phase de dysfonction, la glycémie n'est plus correctement régulée, la lipémie est élevée et les cellules bêta ne produisent presque plus d'insuline comme présenté dans la figure 18.

Des études montrent que la régulation de la glycémie *in vivo* chez des sujets présentant une dérégulation de la glycémie, améliore la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et suppriment les niveaux élevés d'AGs circulants (Leahy, Cooper et al. 1986). Cela a aussi été montré dans des modèles d'îlots de rats isolés *in vitro* (Laychock 1995), (Anello, Rabuazzo et al. 1996). Le glucose aurait ainsi un rôle majeur dans le développement des pathologies métaboliques où son taux plasmatique est accru. En 2010, Poitout et al. ont aussi recensé et discuté les questions concernant la véracité du concept de glucolipotoxicité *in vivo* (Poitout, Amyot et al. 2010). Selon eux, si le concept est clairement établi *in vitro*, il est plus difficile de l'établir clairement *in vivo* du fait notamment des différences entre les conditions *in vivo* et *in vitro*. Gordon Weir et Susan Bonner-Weir affirment que les lipides n'ont pas de rôles dans le DT2 en raison d'une corrélation encore à démontrer entre AGs circulants et perte de la fonction sécrétrice des cellules bêta (Weir and Bonner-Weir 2013). Cette affirmation est appuyée par le fait que chez des souris db/db diabétiques, la dysfonction bêta-cellulaire est indépendante de la concentration en lipides circulants. Pour eux, les effets du palmitate observé *in vitro* serait plutôt liés à un produit de conversion du palmitate, la tripalmitine, qui ne se formerait pas *in vivo*. Mittra S et al. en 2008 parlent de la lipotoxicité comme activateur permanent de l'insulinorésistance (Mittra, Bansal et al. 2008), qui serait donc un acteur important mais pas nécessaire à la dysfonction sécrétrice des cellules bêta. Cependant, l'étude récente *in vivo* EPIC-InterAct montre chez plus de 15000 sujets atteints d'un diabète de type 2 qu'il existe une corrélation positive entre le taux de palmitate plasmatique circulant et l'incidence du DT2, suggérant que cet acide gras pourrait avoir un rôle causal dans le développement du DT2 (Forouhi, Koulman et al. 2014).

Le glucose et les lipides induisent des signatures métaboliques spécifiques des cellules bêta notamment au niveau des métabolites mitochondriaux dans les INS-1E (Brun, Scarcia et al. 2013), ce qui suggère une implication différente mais non moins active. Barlow J et al. ont montré que la glucolipotoxicité modifie le métabolisme mitochondrial et conduit à la baisse de la viabilité et du GSIS dans ces cellules (Barlow and Affourtit 2013). Pour compléter ce panorama complexe, une étude récente a montré que les AGs libres ont un rôle mineur sur la fonction mitochondriale, mais amplifient les effets du glucose dans des îlots de souris isolés (Schulz, Kluth et al. 2013).

Il semble difficile d'établir un ordre d'action et une hiérarchie d'importance entre les phénomènes liés à la glucotoxicité et la lipotoxicité. Les études *in vivo* chez l'homme se confrontent à des symptômes et des

mécanismes qui coexistent et qu'il n'est pas possible de séparer. Certains modèles animaux le permettent (Kluth, Mirhashemi et al. 2011) mais sont peu nombreux et pas nécessairement représentatifs de tous les processus existants chez l'homme. Les modèles *in vitro* présentent l'avantage de pouvoir étudier séparément les actions des lipides et du glucose, dans l'idéal sur des cellules humaines, mais aussi sur des lignées cellulaires créées ou dérivées de tumeurs. Ces derniers modèles sont néanmoins loin de représenter la complexité de réponse et d'influence auxquelles sont soumises les cellules *in vivo*. Il semble, au regard de la littérature, que glucose et lipides sont des acteurs importants dans leurs rôles respectifs sur l'homéostasie glucidique et la fonction des cellules qui permettent de maintenir cette homéostasie.

## 1.3 Les traitements du diabète de type 2

### 1.3.1 Les traitements actuels

---

Le DT2 est une maladie multifactorielle et spécifique de chaque patient. C'est la raison pour laquelle un certain nombre de traitements existent, ciblant soit l'insulinosécrétion des cellules bêta, soit l'insulinorésistance. Selon les cas, les traitements sont associés pour potentialiser les effets à la fois par l'action sur les cellules bêta et les tissus métaboliques. A l'heure actuelle, quatre principales familles de molécules sont utilisées pour accroître la sécrétion d'insuline: les sulfamides hypoglycémifiants, les glinides, les analogues du GLP-1 et les gliptines inhibitrices des DPP-IV, ces derniers inhibant l'action du GLP-1. Les biguanides, dont la molécule la plus utilisée est la Metformine, accroît l'insulinosensibilité des tissus métaboliques. Enfin, il existe des inhibiteurs des alpha-glucosidases, qui ralentissent la transformation des glucides complexes en glucides simples et leur absorption.

Différentes stratégies approchent le DT2 sous l'angle de la nutrition raisonnée et individualisée (Munsters and Saris 2014) de la pratique d'exercice physique (O'Hagan, De Vito et al. 2013), d'une intervention psychosociale (Ismail, Winkley et al. 2004), des traitements à base d'omega-3 (Ogawa, Abe et al. 2013), afin d'améliorer le métabolisme global. D'autres études s'intéressent aussi aux rythmes circadiens et montrent que la vie de la société moderne est propice au développement de maladies métaboliques. En effet, les changements d'heures des repas, l'alimentation à toute heure, le travail nocturne sont des éléments importants dans la dérégulation de la rythmicité du corps (Karthikeyan, Marimuthu et al. 2014).

Dans une revue récente, un consortium d'experts du diabète de type 2, à la fois chercheurs et cliniciens, ont établi, à partir des découvertes de ces dernières années, les objectifs de recherches qui sont importantes d'atteindre afin de mieux comprendre et traiter le DT2 (Halban, Polonsky et al. 2014) :

1. Agir sur la cause naturelle de la dysfonction des cellules bêta et ralentir la progression de la détérioration fonction/masse.
2. Identifier et caractériser de nouveaux loci géniques du DT2 et définir leur impact sur la fonction beta pancréatique.
3. Agir sur la signalisation des cellules bêta, leur métabolisme et les mécanismes génétiques pour améliorer la fonction et la masse des cellules bêta.
4. Développer des sources alternatives de cellules bêta pour la thérapie cellulaire.
5. Agir sur l'environnement métabolique, l'insulinorésistance et l'obésité pour avoir un effet bénéfique indirect sur les cellules bêta.
6. Améliorer la compréhension des importantes et inattendues réponses physiologiques dues à un bypass gastrique comme base d'une nouvelle thérapie et identifier des patients qui pourraient en bénéficier.

7. Identifier les facteurs circulants et les circuits neuronaux agissant dans la communication entre le cerveau et les cellules bêta.

Dans leur point 3, les auteurs soulignent l'importance d'agir sur le métabolisme, la génétique et les voies de signalisation des cellules bêta. En effet, les causes de la réduction de la sécrétion d'insuline sont multiples, tout comme les réponses internes des cellules bêta pour s'adapter à ces changements environnementaux. Les cellules bêta doivent faire preuve d'une grande adaptation dans la mesure où, aussi, les effets glucotoxiques et lipotoxiques peuvent se succéder dans le temps ou être associés (Poitout, Amyot et al. 2010). Les recherches sur le DT2 abordent la fonction et la survie beta cellulaire en essayant d'agir sur les différents stress développés au cours du développement de la maladie. Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'inhibition du stress du RE, du stress oxydant ou de l'inflammation par exemple, améliore la fonction des cellules bêta et l'homéostasie glucidique. Le récepteur GPR40 et GLUT sont des cibles étudiées à l'heure actuelle dans la protection du diabète de type 2 (Del Prato 2009). Une partie des effets des acides gras sont médiés au niveau intracellulaire par le récepteur GPR40. Il semble qu'à court-terme, les acides gras stimulent la sécrétion d'insuline par ce récepteur (Wu, Yang et al. 2010). Il existe plus de controverses quant à ces effets à long-terme : des études montrent que son activation peut être protectrice dans des modèles de rats diabétiques (Meidute Abaraviciene, Muhammed et al. 2013), tandis que d'autres montrent qu'il n'a pas d'effets dans des modèles in vitro tels que la lignée cellulaire betaTC6 (Wu, Yang et al. 2010) ou qu'au contraire il réduit la sécrétion d'insuline (Steneberg, Rubins et al. 2005). Par ailleurs, certaines études ont aussi observé que l'inhibition de GPR40 pouvait être protectrice de la fonction bêta cellulaire (Sun, Wang et al. 2013). Les actions des acides gras saturés et insaturés sont notamment médiés par ce même récepteur, il est dès lors étonnant de constater les effets bénéfiques des acides insaturés à long-terme contrairement aux acides gras saturés ; Tuo et al. ont montré dans ce sens que plus l'insaturation des acides gras était élevée, plus l'effet bénéfique était important et que GPR40 avait un rôle dans ces actions (Tuo, Feng et al. 2012). Santos et al. ont cependant montré que les effets protecteurs de l'acide oléique proviendrait de l'anaplérose – son oxydation et son métabolisme – mais ne passeraient pas par GPR40 (Santos, Rebelato et al. 2011). Ainsi, il existe une large variété de résultats quant à l'implication de GPR40 dans les effets des acides gras sur les cellules bêta pancréatiques. Toutefois, il semble jouer un ou des rôles importants qui restent encore à étudier.

D'après la revue d'Halban et al., "Il n'y a pas de voie pathogénique dominante qui pourrait servir de cible majeure unique. De plus, différents processus physiopathologiques peuvent être actifs à différentes étapes de la progression et les cibles peuvent changer en conséquence [...] Les interventions ciblées en fonction de l'étape de la pathogenèse ou des approches combinées pourraient être requises pour préserver ou restaurer la fonction beta pancréatique." (Halban, Polonsky et al. 2014). Trouver des traitements capables d'agir à différents niveaux dans la cellule beta ou l'association de traitements semblent donc être essentiels.

De manière intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs du système rénine-angiotensine chez des patients atteints d'hypertension et à risque de développer un diabète de type 2 réduit l'incidence de cette maladie de 15 à 25% (McMurray, Holman et al. 2010). Ces inhibiteurs n'étaient pas utilisés pour traiter le diabète de type 2, mais se révélaient donc toutefois protecteurs. Chez ces patients, l'homéostasie glucidique est maintenue, potentiellement avec une action sur les cellules bêta. Des études *in vitro* ont montré quelques années auparavant que l'activation du système rénine-angiotensine par l'angiotensine 2, comme il est retrouvé chez des patients hypertendus, réduisait à long terme la sécrétion d'insuline des cellules beta en culture. L'hypothèse a donc été formulée que le système rénine-angiotensine pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la cellule bêta dans le diabète de type 2 et que son inhibition pourrait constituer un nouveau traitement.

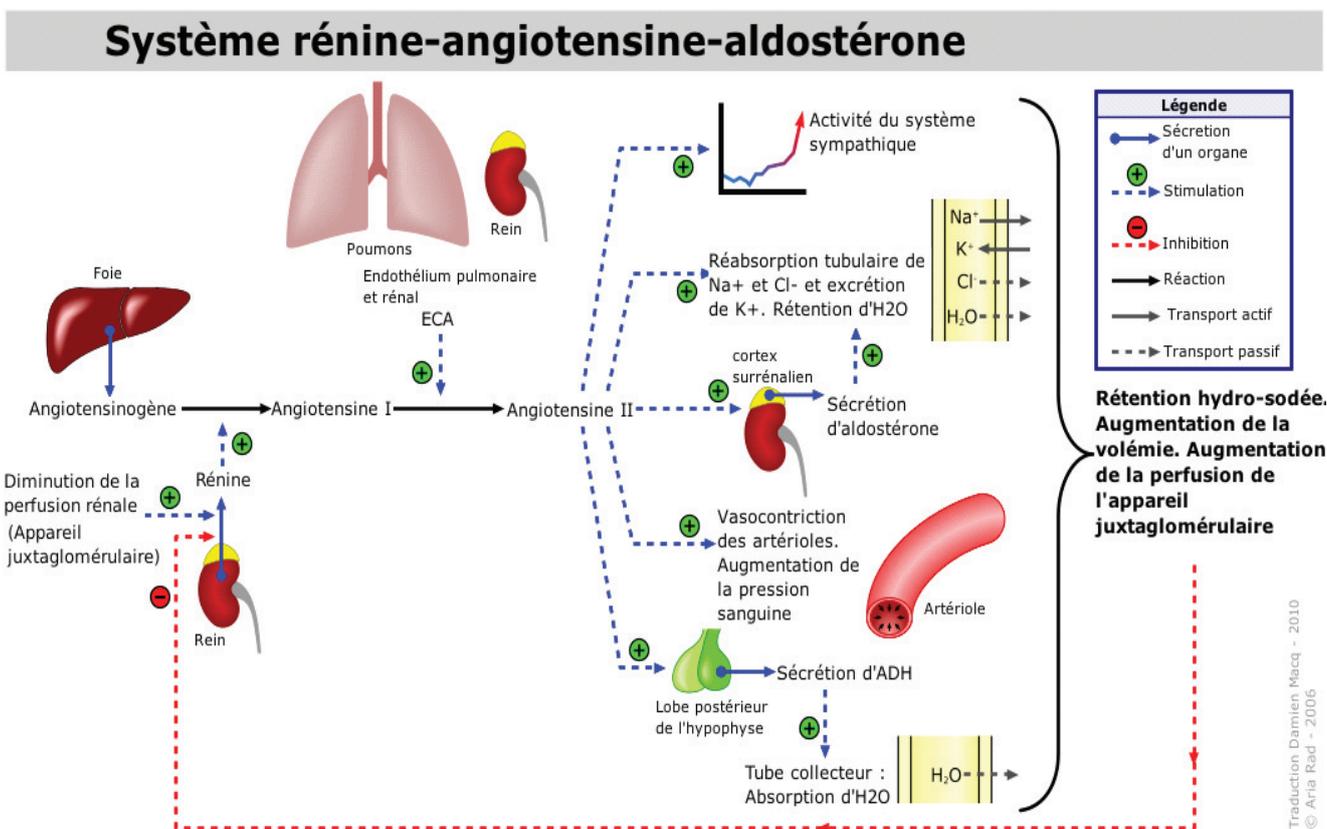
### 1.3.2 L'inhibition du système rénine-angiotensine

---

#### **1.3.2.1 SRA systémique et son rôle**

Le système rénine-angiotensine (SRA), aussi appelé le système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA), est un ensemble de processus successifs qui permet l'adaptation du système cardiovasculaire à une modification de son homéostasie en réponse à des facteurs internes ou externes. Il contrôle la pression sanguine au travers de la volémie et de la contraction des vaisseaux sanguins. Le maintien stable des constantes minérales comme le sodium, le potassium et le chlore, repose sur la gestion de l'activité rénale de filtration. Le SRA est un système sensible à de faibles variations de pression, de concentrations ioniques. Il est composé de plusieurs acteurs, qui interviennent en cascade, et dont la quantité est régulée par des enzymes. Ces facteurs sont soit tissu-spécifiques, comme l'angiotensinogène dans le foie, la rénine dans le glomérule rénal et l'enzyme de conversion 1 (ACE1) dans l'endothélium pulmonaire ou circulants comme l'angiotensine I ou II. Jusqu'à ces dernières années, l'angiotensine 2 était considérée comme le principe actif principal du système, pouvant agir à la fois sur les récepteurs à l'angiotensine de type 1 et 2 (AT1R et AT2R). Leurs effets peuvent être au niveau de la contraction des vaisseaux sanguins, de la filtration et de la réabsorption rénale, et de la sécrétion glandulaire pour la sécrétion de l'aldostérone dans les glandes surrénales (Harrison-Bernard 2009) ou la vasopressine dans le cœur par exemple. Tout cela est représenté dans la figure 19. Le récepteur AT1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à des protéines G qui a fait l'objet de nombreuses études durant les dernières décennies de par son action vasoconstrictrice et stimulatrice des systèmes cardiovasculaire et rénal et à l'origine d'un nombre important de pathologies dans ces systèmes. Le récepteur AT1R est situé à la surface des membranes plasmiques, est fortement sensible à l'angiotensine 2. Il peut produire ses effets en restant fixé à la membrane plasmique ou en étant internalisé (Miura, Saku et al. 2003). Il a par ailleurs une activité constitutive qui lui permet d'agir directement dans les cellules sans l'intervention d'un agoniste tel que l'angiotensine 2 (Akazawa, Yasuda et al. 2009) (Hasan, Ohmori et al. 2014).

Il a été plus récemment démontré que le SRA est composé de plus d'éléments actifs, qui participent à la régulation et à l'action fine du système. En effet, il existe notamment l'angiotensine (1-7) et l'ACE2 qui inhibent les effets de l'AT1R et sont plutôt vasodilatateurs et antiinflammatoires (Moon 2013). Des études ont aussi montré que de l'angiotensine 2 est produite de manière locale dans les artères, afin de répondre à une demande spécifique, comme dans des processus d'athérosclérose ou d'inflammation (Miyazaki and Takai 2006).



**Figure 19 :** Le système rénine-angiotensine-aldostérone systémique. L'angiotensinogène, produit par le foie, est converti en angiotensine I grâce à la rénine circulante produite par le rein. L'angiotensine I est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion située au niveau de l'endothélium pulmonaire et rénal. L'angiotensine II est le principal principe actif du système rénine-angiotensine-aldostérone. Afin de maintenir une pression artérielle stable, l'angiotensine II va se fixer à ses récepteurs, l'AT1R et l'AT2R, situés au niveau du système nerveux sympathique, au niveau des tubules rénaux, du cortex surrénalien, des vaisseaux sanguins et du lobe postérieur de l'hypophyse. Ce sont principalement la volémie, le débit et la concentration ionique du sang qui vont déterminer l'activation plus ou moins importante du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'activation de l'AT1R aura des effets qui augmenteront la pression artérielle tandis que l'activation de l'AT2R réduira cette pression. Figure obtenue sur [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com).

Ainsi, dans les maladies impliquant le SRA, de nombreux traitements sont prescrits avec des molécules inhibitrices du SRA. Parmi ces molécules, deux familles sont principalement utilisées : les sartans permettent d'inhiber l'AT1R, tels que le losartan, le telmisartan, le valsartan, et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, tels que le périmopril, le captopril (Zain and Awan 2014).

### **1.3.2.2 Articles rétrospectifs et prospectifs DT2 et inhibition SRA**

Des études rétrospectives réalisées il y a quelques années ont lancé l'hypothèse que le SRA pourrait être d'importance dans le développement de maladies métaboliques comme le diabète de type 2 (Abuissa, Jones et al. 2005) et des maladies rénales chez des patients atteints d'un DT2 (Vejakama, Thakkinstian et al. 2012). Ces études ont montré que l'inhibition du SRA en vue de traiter des maladies cardiovasculaires chez des patients à risque réduisait de près de 25% de l'incidence du DT2 (Abuissa, Jones et al. 2005). Des études prospectives ont montré d'une part que l'angiotensine 2 circulante est associée à l'accumulation de lipides dans le corps et à l'insulinorésistance chez des patients obèses et diabétiques de type 2 (Saiki, Ohira et al. 2009). Elles ont aussi montré que les expressions de l'angiotensinogène et de l'AT1R locaux étaient plus élevées chez des patients atteints de DT2 et participaient à l'hyperinsulinémie observée et que l'inhibition du SRA chez des patients à risque prévenait du DT2 de 14% (McMurray, Holman et al. 2010). Tous ces résultats suggèrent donc que le SRA est un élément clef du développement de certaines pathologies métaboliques.

### **1.3.2.3 SRA systémique et SRA local**

Le DT2 peut apparaître dans le cadre d'un syndrome métabolique. Ce dernier est diagnostiqué à partir du moment où au moins trois pathologies métaboliques sont déclarées chez une personne (Hayden, Stump et al. 2006). Parmi ces pathologies est souvent retrouvée l'hypertension et il n'est donc pas étonnant que les mesures montrent une élévation du taux des composants circulants du SRA, tels que l'angiotensine 2, la rénine et l'aldostérone.

De manière surprenante, des composants du SRA ont été observés spécifiquement dans les tissus, métaboliques et non métaboliques et ils pourraient jouer un rôle important dans les fonctions de ces tissus, en dehors de la régulation systémique connue du SRA. Ceci constitue une nouveauté dans la mesure où il était considéré jusqu'à présent que le SRA était seulement systémique et régulait le système cardiovasculaire et rénal. Ces SRA locaux semblent être spécifiques et composés de plusieurs éléments du SRA systémiques, mais pas nécessairement de tous ces éléments, avec parfois des particularités enzymatiques. Ils ont été montrés dans des tissus métaboliques comme le muscle (Burks, Andres-Mateos et al. 2011) (Casselbrant, Kostic et al. 2014), le tissu adipeux (Kalupahana and Moustaid-Moussa 2012), le foie (Nabeshima, Tazuma et al. 2009) et le pancréas exocrine et endocrine (Leung, Chan et al. 1999), (Leung 2007). La découverte de ces SRA locaux semble expliquer pour partie les améliorations observées lors de traitements visant à inhiber le SRA systémique et ce, par une action directe sur l'activité des cellules de ces tissus. Cela a aussi été corrélé avec une augmentation significative de l'expression des composants présents

dans ces cellules, qui entraîne une dysfonction cellulaire comme par exemple l'hyperproduction d'angiotensinogène dans le tissu adipeux de souris, induisant une intolérance au glucose et une insulino-résistance (Kalupahana and Moustaid-Moussa 2012). La restauration du phénotype physiologique semble être corrélée avec la réduction des composants du SRA (Brun, Scarcia et al. 2013).

#### **1.3.2.4 SRA local et îlot de Langerhans**

Le SRA est présent dans les cellules des îlots de Langerhans : dans les cellules alpha, bêta et delta (Tahmasebi, Puddefoot et al. 1999) (Lam and Leung 2002; Lupi, Del Guerra et al. 2006) (Amisten, Salehi et al. 2013). La plupart des composants du SRA sont présents dans les cellules de l'îlot, avec quelques particularités propres à chaque type cellulaire (Cheng and Leung 2011) (Tahmasebi, Puddefoot et al. 1999). Leung et al. ont montré que la baisse de sécrétion d'insuline dans une lignée cellulaire d'insulinome de rat, les INS-1E, était due à l'augmentation de l'expression du récepteur AT1 (Leung and Leung 2008), en conditions de glucotoxicité, suggérant ainsi l'implication du SRA dans la régulation des sécrétions endocrines du pancréas.

L'adaptation des sécrétions des îlots de Langerhans est liée à une régulation fine de l'ensemble des cellules qui les composent. Cette régulation est due notamment à des facteurs internes à l'îlot, c'est-à-dire à une autorégulation cellulaire. Une revue récente a fait une synthèse des facteurs qui peuvent intervenir dans la communication entre cellules bêta et cellules endothéliales (Peiris, Bonder et al. 2014) et montre la complexité des interactions. Les actions des agonistes du SRA sont médiées principalement par le récepteur AT1, mais pourraient aussi impliquer le récepteur AT2 (Amisten, Salehi et al. 2013). Peu de données existent encore quant à une possible internalisation dans les cellules bêta pancréatiques de ces récepteurs et de leurs actions intracellulaires. L'angiotensine 2 a été mise en évidence en 2007 par Ramracheya et al. comme régulateur direct de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta lors d'une infusion d'angiotensine 2 sur des îlots humains et de souris (Ramracheya, Muller et al. 2006). Gletsu et al. ont montré que l'application de pompes osmotiques délivrant de l'angiotensine 2 à des souris pendant 2 à 4 semaines entraînait une hyperinsulinémie (Gletsu, Doan et al. 2005). Cependant, Ihoriya et al. ont montré que l'infusion d'angiotensine 2 réduit significativement le diamètre des vaisseaux sanguins et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose des îlots de souris contrôles – pour la première et la deuxième phase de sécrétion –, tandis que le valsartan inhibait la vasoconstriction et la baisse de sécrétion (Ihoriya, Satoh et al. 2014). A notre connaissance, il n'a pas encore été déterminé si la modification de l'activité des cellules endothéliales par la modulation du SRA a un effet direct sur le SRA des cellules bêta. Tous ces résultats suggèrent donc une étroite interrelation entre cellules bêta et cellules endothéliales, interrelation complexe dans la mesure où l'action de l'angiotensine 2 peut provenir de la circulation, des cellules endothéliales et des cellules bêta, dont les effets sont très différents.

La sécrétion d'insuline est altérée dans de nombreux modèles expérimentaux de DT2 et plusieurs études relèvent une augmentation de l'expression des composants du SRA dans les cellules bêta soumises à ces conditions de stress, suggérant une implication physiologique dans la perte de fonction de ces cellules. Ainsi, Tikellis et al. ont montré que les rats ZDF présentent une élévation de l'expression génique de l'ACE, de l'ACE2 et de l'AT1R (Tikellis, Wookey et al. 2004). L'expression de l'AT1R est aussi accrue dans les INS-1E

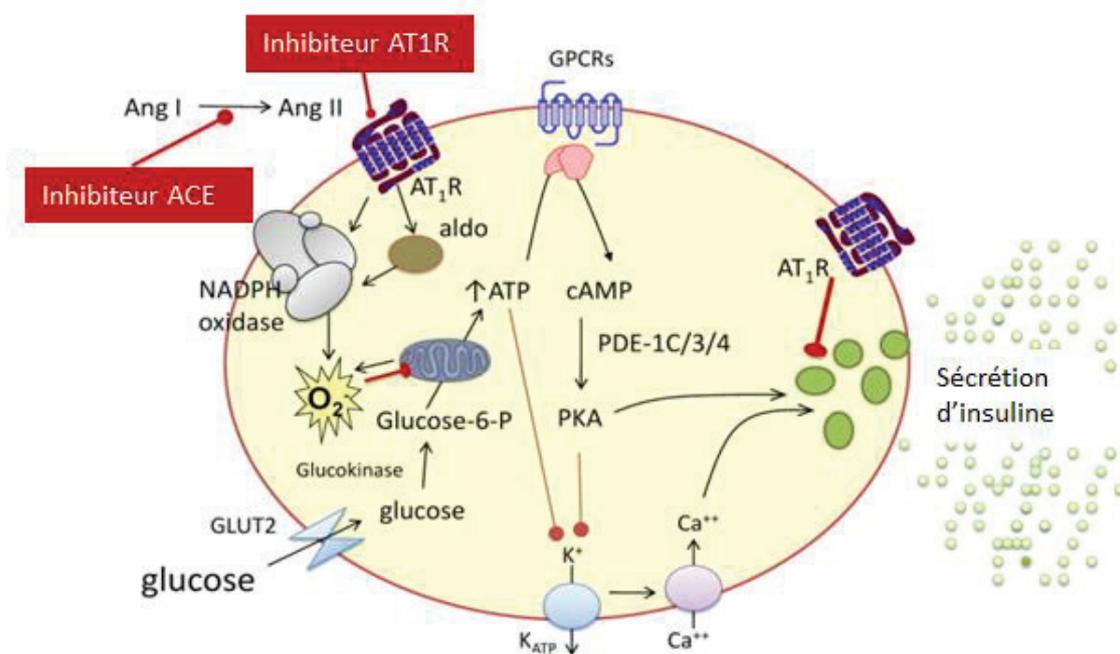
traitées avec une dose élevée de glucose (Leung and Leung 2008), ainsi que dans les îlots humains (Lupi, Del Guerra et al. 2006). Une étude montre cependant que dans la lignée bêta-cellulaire murine BRIN-BD11, les expressions de l'ACE, de l'AT1R et de l'AT2R ne sont pas modifiées par un traitement au glucose mais que l'ACE2 et l'angiotensine (1-7) sont quant à elles augmentées (Hardtner, Morke et al. 2013). Ces études associent à l'accroissement des composants du SRA une diminution de la sécrétion d'insuline et une altération morphologique des îlots (Tikellis, Wookey et al. 2004). Le traitement de cellules bêta ou d'îlots avec de l'angiotensine 2, activateur du SRA à travers l'activation de l'AT1R, montre une implication directe du SRA dans les processus délétères conduisant à la baisse de la sécrétion d'insuline. En effet, l'angiotensine 2 appliquée sur des îlots de souris saines réduit la sécrétion d'insuline (Chu, Lau et al. 2006), avec une réponse diminuée dose-dépendante (Lau, Carlsson et al. 2004). Cette baisse est compensée par l'inhibition du SRA avec du losartan, inhibiteur de l'AT1R, et du périndopril, inhibiteur de l'ACE, dans des îlots humains (Chu, Lau et al. 2006; Lupi, Del Guerra et al. 2006). La modulation de l'enzyme ACE2 nouvellement découverte, semble être importante puisqu'une augmentation de son expression améliore le contrôle glycémique chez des souris traitées avec de l'angiotensine 2 (Chhabra, Xia et al. 2013). JR Schweizer et al. ont montré que lorsqu'on soumet des rats mâles Holtzman à un stress continu durant 30 minutes en stimulant les noyaux hypothalamiques, qui a pour effet de faire sécréter de l'adrénaline et de la noradrénaline en continu, une augmentation importante de la sécrétion d'insuline est observée. Ceci certainement pour compenser l'élévation de la glycémie en réponse aux catécholamines. L'inhibition de l'ACE prévient l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans les hypothèses avancées par cette équipe, outre des effets sur l'angiotensine 2 et la bradykinine circulantes, ils font l'hypothèse d'une inhibition du SRA local des îlots, les protégeant à la fois de la stimulation hormonale, mais aussi nerveuse, les îlots étant innervés par le système nerveux périphérique (Schweizer, Miranda et al. 2012).

L'activation du SRA entraîne une production accrue de ROS qui conduit à un stress oxydant dans les cellules bêta et participe donc par cette voie-là aussi à la dysfonction bêta-cellulaire. Habidi et al. ont montré que les rats transgéniques Ren2, surexprimant la rénine, développent un DT2 avec une insulino-résistance et un hyperinsulinisme. De plus, leurs cellules bêta présentent des modifications morphologiques et fonctionnelles importantes : altérations structurales des mitochondries, RE dilaté, augmentation des ROS. L'inhibition de la rénine par l'alisikiren restaure un métabolisme normal par une action sur les cellules bêta et les tissus périphériques. Hasfgawa et al. ont reproduit les études prospectives réalisées chez l'homme sur des rats Torii spontanément diabétiques et montrent d'une part la prévention du diabète de type 2 par le telmisartan, et d'autre part que cette prévention est au moins partiellement liée à la protection des cellules bêta pancréatiques, par l'inhibition du SRA local de ces cellules, et du stress oxydant NADPH oxydase dépendant (Hasegawa, Fukui et al. 2009). La voie de la NADPH oxydase semble être une des voies privilégiées de l'action de l'AT1R activé. En effet, il a été démontré tout d'abord de manière indirecte chez des souris diabétiques de type 2 que l'inhibition du SRA réduisait la surexpression de la NADPH oxydase et améliorait le phénotype métabolique des animaux (Nakayama, Inoguchi et al. 2005). Il a aussi été montré de manière directe que le SRA active la NADPH oxydase : l'application d'angiotensine 2 sur des îlots pancréatiques de rat entraîne l'augmentation de l'expression de la NADPH oxydase (Alves, Haidar et al. 2012). Les souris db/db présentant une augmentation de la NADPH oxydase mais aussi de l'UCP2, ont ce phénotype réversé par l'inhibition de l'AT1R par le losartan. Ces résultats corrélés à la surexpression des composants du SRA observée dans d'autres études, montrent que l'UCP2 est une des voies activées par le SRA en conditions de stress (Chu and Leung 2007). *In vitro*, le candesartan réduit le

stress oxydant induit par une dose élevée de glucose et le palmitate, dans les MIN6 et les îlots de souris. Ceci par l'inhibition de l'activité de la PKC et de la NADPH oxydase, qui améliore globalement le contenu en insuline de ces cellules (Saitoh, Hongwei et al. 2010).

Dans l'étude de Gletsu et al. où l'application d'angiotensine 2 chez des souris pendant 2 à 4 semaines augmentait l'insulinémie sans modifier l'insulinosensibilité, les auteurs suggèrent toutefois que l'hypertension, associée à la production chronique d'angiotensine 2, pourrait entraîner à long-terme une insulino-résistance et participer au développement du diabète de type 2 (Gletsu, Doan et al. 2005).

La figure 20 présente différentes voies de signalisation du SRA des cellules bêta pancréatiques impliquées dans la sécrétion d'insuline et les actions des inhibiteurs de l'AT1R et de l'ACE.

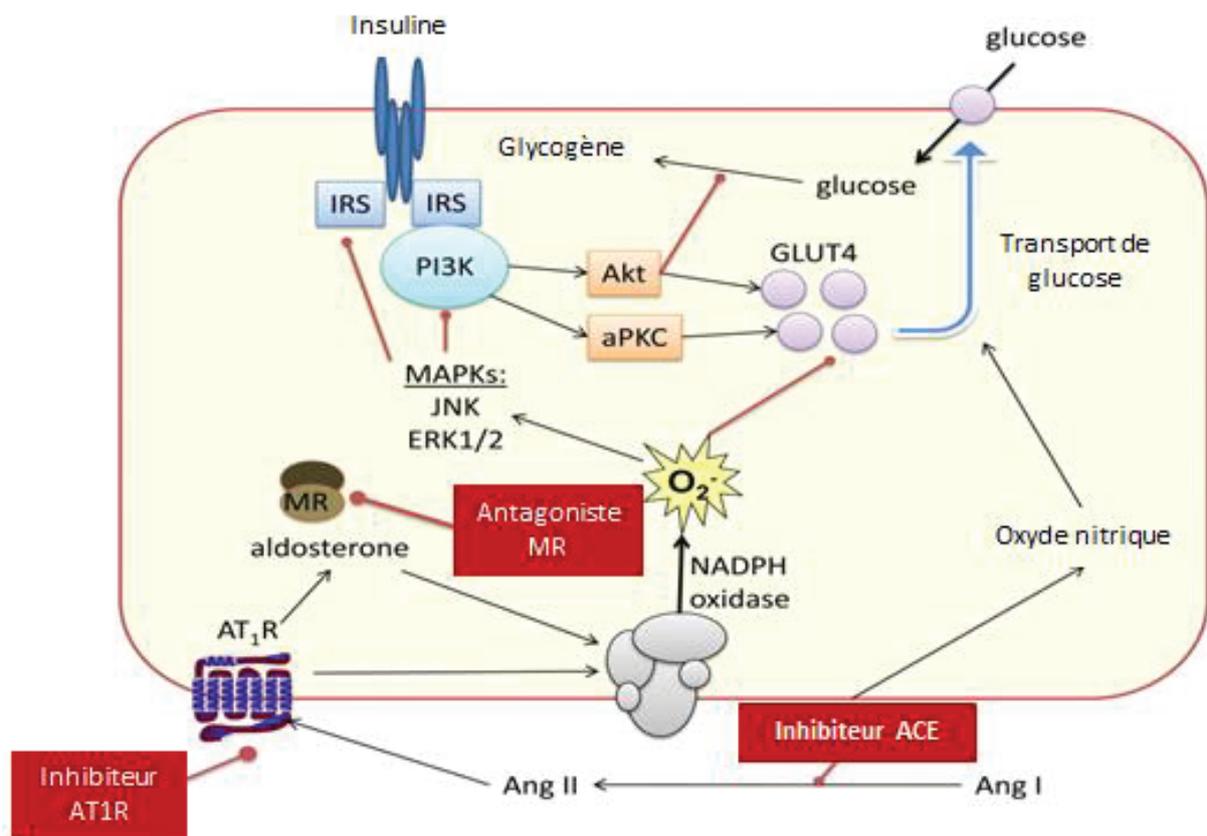


**Figure 20** : Effets du SRA dans les cellules bêta pancréatiques. L'activation de l'AT1R par l'angiotensine 2 mobilise plusieurs voies de signalisation dont celle de la NADPH oxydase, qui produit alors des ROS et inhibe la synthèse d'ATP nécessaire à la sécrétion d'insuline. L'AT1R inhibe aussi constitutivement la sécrétion d'insuline. Les cellules beta sont aussi pourvues de récepteurs aux minéralocorticoïdes comme l'aldostérone, qui est le médiateur d'une partie des effets de l'AT1R. L'inhibition de l'enzyme de conversion et de l'AT1R protège les cellules bêta de ces effets. Figure traduite et adaptée de l'article de (Goossens, Moors et al. 2012).

### 1.3.2.5 L'insulinorésistance

Le SRA systémique et le SRA local sont aussi impliqués dans le phénomène d'insulinorésistance et participent donc au développement du DT2. Chez des patients obèses normotendus, l'expression génique et protéique de l'angiotensinogène et du récepteur AT1 dans le tissu adipeux est plus importante que chez

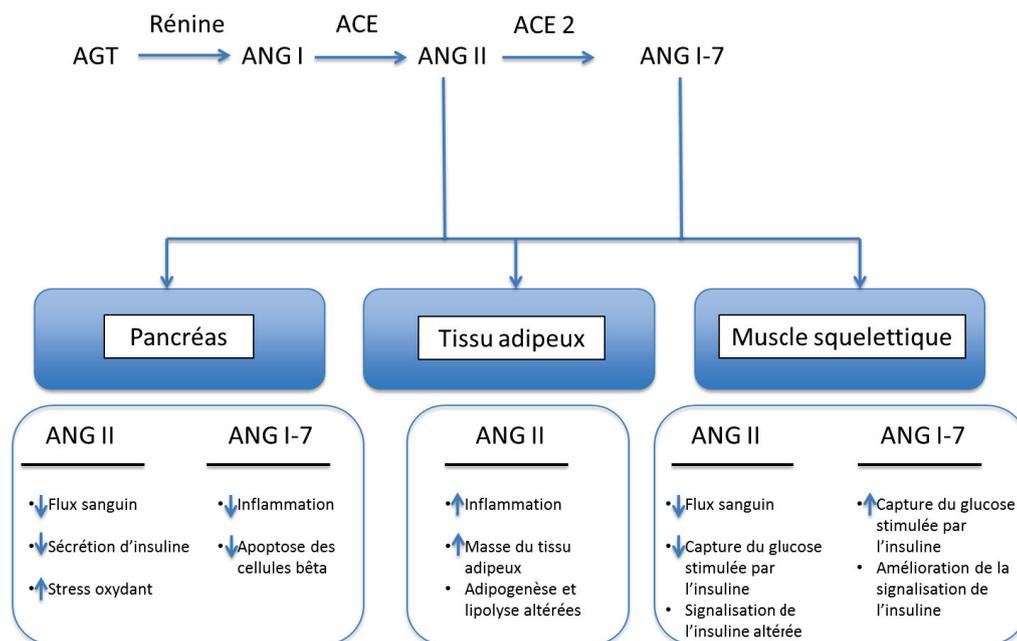
des sujets de poids normal, ce qui suggère que le SRA est impliqué dans la physiologie du tissu adipeux (Giacchetti, Faloia et al. 2002). L'activation du SRA dans le tissu adipeux (Underwood and Adler 2013) (Goossens, Moors et al. 2012) et le muscle squelettique (Moors, Blaak et al. 2013), entraîne l'accroissement de processus délétères qui affectent la sécrétion d'insuline et la signalisation de l'insuline. De nombreuses études ont montré l'implication du SRA en l'inhibant. Ainsi, l'irbesartan, un inhibiteur de l'AT1R, améliore la sensibilité à l'insuline et la fonction métabolique du foie chez des rats nourris avec un régime riche en fructose et présentant un syndrome métabolique (Ibrahim, Amin et al. 2014). Lteif et al. ont montré que l'inhibition du SRA avec du losartan chez des sujets obèses insulino-résistants mais non hypertendus, donc sans modifications des paramètres circulants du SRA, pourrait améliorer le métabolisme du glucose des muscles par l'amélioration de la vasodilatation des vaisseaux des muscles induite par l'insuline (Lteif, Chisholm et al. 2012). La figure 21 résume les modes d'action du SRA et de ses inhibiteurs sur l'insulinorésistance des tissus périphériques.



**Figure 21 :** L'inhibition du système rénine-angiotensine protège de l'insulinorésistance dans les tissus métaboliques. L'activation de l'AT1R par l'angiotensine 2 active la voie de la NADPH oxydase et favorise l'inhibition du récepteur à l'insuline ainsi que l'augmentation des transporteurs GLUT4 dans la membrane plasmique en réponse à une élévation de glucose. L'aldostérone, activateur des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR), joue aussi un rôle en tant que médiateur des effets de l'AT1R. L'inhibition de l'AT1R et des récepteurs aux minéralocorticoïdes préserve de l'insulinorésistance et l'inhibition de l'enzyme de

conversion favorise la production de NO, qui stimule l'augmentation de GLUT4 dans la membrane plasmique. Figure traduite de l'article de (Goossens, Moors et al. 2012).

La fonction bêta cellulaire et insulinosensible des tissus tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux sont améliorés par un traitement avec le telmisartan chez des personnes insulino-résistantes non diabétiques (Nagel, Tietz et al. 2006) (Henriksen and Prasannarong 2013). Cela semble être médié de manière importante par une action directe, notamment sur l'expression du facteur PPAR $\gamma$ . Dans cette étude était observée une amélioration prédominante de la fonction des cellules bêta, montrant ainsi la complexité du phénomène d'insulino-résistance, à la fois lié aux tissus métaboliques et aux cellules sécrétrices d'insuline. Enfin, comme présenté dans la figure 22, les différents acteurs du SRA peuvent agir sur les mêmes tissus et produire des effets opposés sur le métabolisme.



**Figure 22** : Effets de l'angiotensine 2 et de l'angiotensine (1-7) dans le pancréas, le tissu adipeux et le muscle squelettique. L'angiotensine 2 est l'acteur du système rénine-angiotensine le plus décrit, capable d'activer l'AT1R et ' AT2R et d'avoir des effets délétères à long-terme. L'angiotensine (1-7) a été décrite plus récemment, ses effets sont médiés par le récepteur MAS et a des effets protecteurs. Dans cette figure, sont représentés les principaux effets de ces deux molécules, issues de la transformation enzymatique de l'angiotensinogène, sur trois tissus importants dans la régulation de la glycémie et du métabolisme global. Figure traduite de l'article de (Goossens, Moors et al. 2012).

Pour conclure, le SRA fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine du DT2, avec un intérêt plus particulier pour certains aspects tels que le stress oxydant. Peu de données existent encore sur les effets du SRA et l'homéostasie calcique ainsi que le stress du RE et les altérations mitochondriales. Pour exemple, un seul article dans la littérature décrit les effets d'un inhibiteur de l'ACE sur l'apoptose induite par un stress du RE dans des cellules tubulaires rénales chez des rats diabétiques (Sun HL et al. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2009) et un peu moins d'une quarantaine d'articles sur la dysfonction mitochondriale, tous types cellulaires confondus. Appuyée par les effets protecteurs de l'inhibition du système rénine-angiotensine sur la fonction bêta-pancréatique en conditions de glucolipototoxicité, l'hypothèse d'effets plus larges dans les cellules bêta du système rénine-angiotensine pourrait être étudiée avec intérêt.

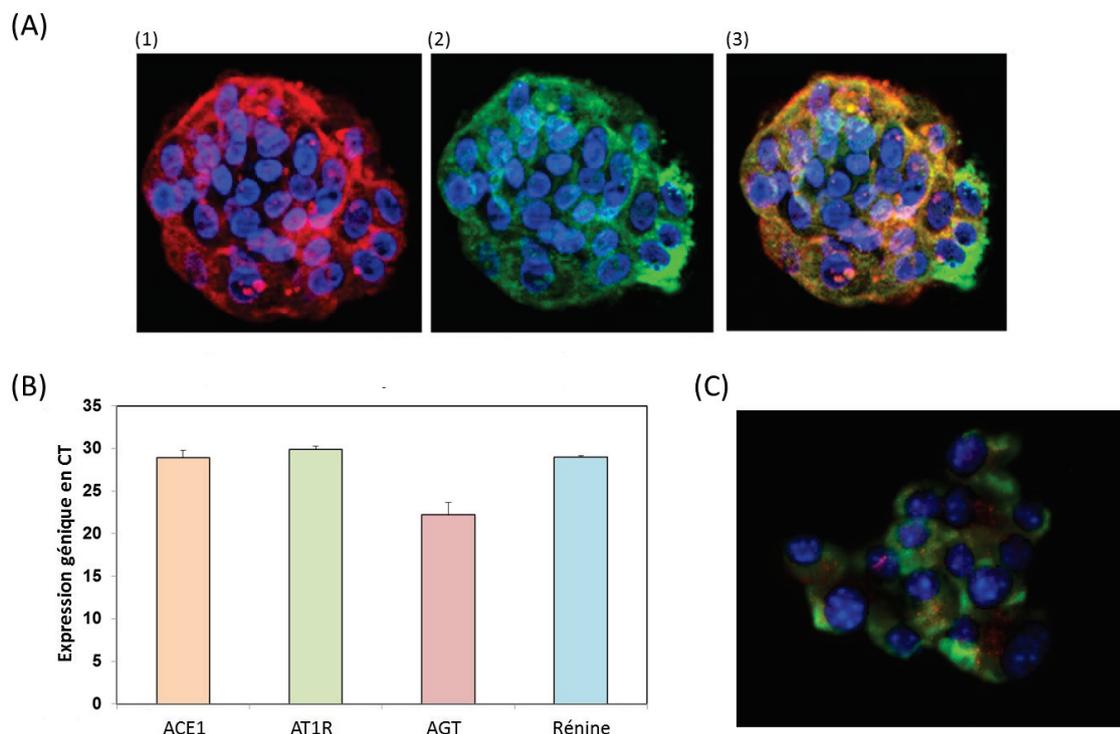
## 2. Travaux réalisés au cours de la thèse

### 2.1 Travaux sur la glucotoxicité

Nous avons étudié *in vitro* les effets du glucose dans les îlots de Langerhans humains à la dose de 16.7 mmol/L retrouvée chez des sujets diabétiques à jeun. Un des objectifs de ces deux premières études est de mettre en évidence *in vitro* les effets du glucose seul sur les cellules bêta qui ne peuvent pas être mesurés directement *in vivo*. Un autre objectif est de connaître les mécanismes d'adaptation du RE et des mitochondries à une dose élevée de glucose et comment ils participent à la dysfonction bêta pancréatique. Ce travail nous a conduit à aborder la régulation du calcium intracellulaire, qui fonctionne comme un signal intégrateur du changement de l'environnement cellulaire (Berridge, Bootman et al. 2003). Nous avons par ailleurs inhibé le système rénine-angiotensine (SRA) des îlots avec le losartan, un inhibiteur du récepteur de type 1 à l'angiotensine 2 (AT1R), afin de savoir si les effets bénéfiques de cette molécule sur l'incidence du DT2 au niveau clinique chez des patients hypertendus à risque de développer cette maladie, peut être relié à un effet direct sur la fonction bêta pancréatique. Le SRA constitue donc un autre mécanisme possible d'action du glucose que nous avons souhaité mesurer.

Ainsi, nous avons travaillé sur 13 préparations d'îlots humains de sujets en état de mort cérébrale provenant du Centre d'isolement et de transplantation de Genève (ECIT) et de l'Unité mixte de thérapie cellulaire et tissulaire de Grenoble (UMTT) que nous avons cultivés durant 96h en présence de 5,5 ou 16,7mM (HG : haut glucose) de glucose avec ou sans losartan durant les dernières 48h. Un des acteurs intracellulaires de l'AT1R est la phospholipase C (PLC). Afin d'étudier si les effets protecteurs du losartan, sont dus à une action sur la PLC, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de la PLC, le U73122, et ceci en présence ou non de losartan pour observer de possibles effets additifs. Si aucun effet additif n'était observé, cela suggérerait que l'inhibition de l'AT1R produirait ses effets par l'inhibition de la PLC et des voies qui en dépendent.

Nous avons tout d'abord montré dans les îlots humains et les MIN6B1 que tous les composants nécessaires au fonctionnement du SRA étaient présents et permettaient la poursuite de notre étude (figure 23).



**Figure 23** : Composants du SRA mis en évidence dans nos modèles d'îlots humains et de MIN6B1. (A) Immunomarquage dans un îlot humain de l'insuline (1 ; rouge), de l'AT1R (2 ; vert) et colocalisation de l'insuline et de l'AT1R (3, orange). Ces résultats montrent ainsi que l'AT1R est exprimé dans les cellules bêta. (B) Expression génique en CT de l'ACE1, de l'AT1R, de l'angiotensinogène (AGT) et de la rénine dans les MIN6B1. (C) Immunomarquage de l'AT1R (vert) et de l'angiotensine 2 (rouge) dans les MIN6B1. Les résultats (B) et (C) montrent que les composants du SRA sont aussi exprimés dans les MIN6B1.

Dans ces conditions, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose était diminuée de 40% dans les îlots cultivés en HG et amélioré totalement par le losartan et le U73122. Ces premiers résultats montraient que nous étions capables d'induire une dysfonction bêta cellulaire avec une dose élevée de glucose, c'est-à-dire d'induire un phénomène de glucotoxicité, et que nous avons une action thérapeutique avec l'inhibition du losartan et de la PLC. Nous avons aussi pu mesurer l'augmentation de l'angiotensinogène et de l'AT1R, deux constituants du SRA, suggérant que le SRA participe au métabolisme du glucose et qu'il est plus actif lorsque la dose de glucose est plus élevée.

Le stress du RE était induit par le HG, et ce au niveau de l'expression ARNm: GRP78, XBP1s et ATF4 et de la protéine GRP78. En revanche, le facteur proapoptotique CHOP n'était pas augmenté. Le stress était donc suffisant pour que soit modifiés des facteurs clefs mais pas suffisant pour activer une des voies de l'apoptose via CHOP. Nous avons alors considéré que nos conditions de culture mimaient les conditions physiopathologiques retrouvées *in vivo* à l'installation d'un DT2.

L'homéostasie calcique est un élément fondamental dans l'adaptation de la cellule bêta à une modification de son environnement, tout particulièrement des métabolites comme le glucose (Rorsman and Braun 2013). Par ailleurs, le RE étant l'organite majeur de régulation des flux calciques dans la cellule et stressé en conditions HG, nous avons cherché à savoir si d'une part l'homéostasie calcique était perturbée

et si d'autre part cette perturbation proviendrait d'une altération de la fonction calcique réticulaire. A l'aide de la sonde fluorescente ratiométrique Fura-2 AM, nous avons constaté que le HG réduisait significativement les concentrations calciques cytosolique et réticulaire. La baisse du calcium réticulaire a été corrélée avec une diminution de l'expression protéique de SERCA2b, pompe d'entrée du calcium dans le RE et l'augmentation de l'expression protéique d'IP3R2, canal de fuite calciques réticulaires. Il y aurait donc moins d'entrée et plus de sortie conduisant à une fuite accrue. La PLC $\beta$  et la PLC $\gamma$  étaient plus exprimées dans les îlots de cette condition, suggérant que le second messenger de la PLC, l'IP3 était plus élevé, et donc plus apte à activer les IP3Rs et la fuite calcique. L'inhibition de l'AT1R par le losartan restaurait le taux de calcium cytosolique et partiellement le taux de calcium réticulaire. L'inhibition de la PLC n'avait pas d'action sur le calcium cytosolique mais inhibait complètement la réduction du calcium réticulaire induite par le HG. En corrélation, l'expression des PLC $\beta$  et PLC $\gamma$  était normalisée par rapport au contrôle, ainsi que celle des Serca2b et IP3R2. Nous en avons conclu que l'amélioration de l'homéostasie calcique par le losartan était dûe en partie à une action sur les deux isoformes mesurées de la PLC, ainsi que sur l'expression des pompes et canaux calciques du RE. Dans la mesure où le calcium réticulaire était restauré partiellement comparativement à l'inhibition de la PLC, nous avons fait l'hypothèse que le losartan agissait aussi par d'autres voies que celle de la PLC pour améliorer la fonction cellulaire beta.

Le stress oxydant fait aussi partie des mécanismes nécessaires à la cellule bêta pour accroître sa sécrétion d'insuline mais est délétère lorsqu'il est trop long ou trop intense (Lenzen 2008). Dans les îlots humains cultivés, le stress oxydant était plus élevé en conditions HG en comparaison du contrôle et du HG en présence de losartan.

L'ensemble de ce travail met en évidence le fait que le glucose agit à de nombreux niveaux dans la cellule bêta, que son élévation est délétère à long terme et conduit à la dysfonction de la sécrétion d'insuline. Le HG induit un stress du RE et un stress oxydant. L'activation et l'accroissement de l'expression de certains composants du SRA est une des voies amplificatrices des effets du glucose. Le SRA participe au contrôle de l'homéostasie calcique des îlots via la voie PLC-IP3-calcium. Son activation conduit à terme à une réduction de la concentration calcique réticulaire et entraîne une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'inhibition du SRA par le losartan protège les îlots des effets du glucose en agissant à la fois sur le RE, et le stress oxydant via notamment les voies calciques.

Ces résultats démontrent donc l'importance d'agir à différents niveaux dans la cellule et ce, de manière concomitante, pour protéger efficacement de la glucotoxicité. Ces résultats confirment que l'inhibition du SRA est une voie thérapeutique à explorer dans le traitement du diabète de type 2.

### 2.1.1 Article 1 (publié)

---

**Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway**

## Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway

Anne-Marie Madec,<sup>\*,1,2</sup> Roméo Cassel,<sup>\*,1</sup> Séverine Dubois,<sup>\*</sup> Sylvie Ducreux,<sup>†</sup> Guillaume Vial,<sup>\*</sup> Marie-Agnès Chauvin,<sup>\*</sup> Aurélie Mesnier,<sup>\*</sup> Karim Chikh,<sup>\*</sup> Domenico Bosco,<sup>‡</sup> Jennifer Rieusset,<sup>\*</sup> Fabien Van Coppenolle,<sup>†</sup> and Charles Thivolet<sup>\*,§</sup>

<sup>\*</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1060/Université Lyon 1, Lyon-Sud Medicine Faculty, Oullins, France; <sup>†</sup>INSERM U1060/Université Lyon 1, Rockefeller Medicine Faculty, Lyon, France; <sup>‡</sup>Cell Isolation and Transplantation Centre, Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland; and <sup>§</sup>Department of Endocrinology and Diabetes, Hospices Civils de Lyon (HCL), Université Lyon 1, Lyon, France

**ABSTRACT** As shown in a large clinical prospective trial, inhibition of the renin-angiotensin system (RAS) can delay the onset of type 2 diabetes in high-risk individuals. We evaluated the beneficial effects of RAS inhibition on  $\beta$ -cell function under glucotoxic conditions. Human islets from 13 donors were cultured in 5.5 mM (controls) or 16.7 mM glucose [high glucose (HG)] for 4 d with or without losartan (5  $\mu$ M), a selective AT1R blocker, and/or U73122 (2  $\mu$ M), a selective PLC inhibitor, during the last 2 d. HG induced RAS activation with overexpression of AT1R ( $P < 0.05$ ) and angiotensinogen ( $P < 0.001$ ) mRNAs. HG increased endoplasmic reticulum (ER) stress markers ( $P < 0.001$ ) such as GRP78, sXBP1, and ATF4 mRNAs and Grp78 protein levels ( $P < 0.01$ ). HG also decreased reticular calcium concentration ( $P < 0.0001$ ) and modified protein expressions of ER calcium pumps with reduction of SERCA2b ( $P < 0.01$ ) and increase of IP3R2 ( $P < 0.05$ ). Losartan prevented these deleterious effects and was associated with improved insulin secretion despite HG exposure. AT1R activation triggers the PLC-IP3-calcium pathway. Losartan prevented the increase of PLC  $\beta 1$  and  $\gamma 1$  protein levels induced by HG ( $P < 0.05$ ). U73122 reproduced all the protective effects of losartan. AT1R blockade protects human islets from the deleterious effects of glucose through inhibition of the

PLC-IP3-calcium pathway.—Madec, A.-M., Cassel, R., Dubois, S., Ducreux, S., Vial, G., Chauvin, M.-A., Mesnier, A., Chikh, K., Bosco, D., Rieusset, J., Van Coppenolle, F., Thivolet, C. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway. *FASEB J.* 27, 5122–5130 (2013). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

**Key Words:** diabetes • human pancreatic  $\beta$ -cells • RAS • AT1R inhibitor • ER stress • calcium homeostasis • PLC-IP3-calcium pathway

A FAILING  $\beta$ -CELL FUNCTION unable to overcome insulin resistance at target tissues determines the onset of type 2 diabetes (T2D; ref. 1). There is increasing evidence that chronic elevated levels of glucose contributes to  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis (2), a process commonly referred to glucotoxicity, with a combination of increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction (3), endoplasmic reticulum (ER) stress (4), and islet inflammation (5). Both antioxidants (6) and inhibitors of ER stress (7) improve  $\beta$ -cell function.

Recently a large clinical prospective trial has shown that inhibition of the renin-angiotensin system (RAS) can delay and/or prevent the onset of T2D in high-risk individuals (8). Moreover, a meta-analysis of randomized clinical studies concluded that patients treated with angiotensin II receptor type 1 (AT1R) blockers or angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors had a 25% reduction in the risk of developing T2D (9). These findings prompted investigation into a novel role of

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; AGT, angiotensinogen; AGTR1, angiotensin 2 type 1 receptor; Ang II, angiotensin II; AT1R, angiotensin II receptor type 1; AT2R, angiotensin II receptor type 2; ATF4, activating transcription factor 4; CHOP, C/EBP homology protein; DCF, 2',7'-dichlorofluorescein; ER, endoplasmic reticulum; GRP78, glucose response protein 78; GSIS, glucose-stimulated insulin secretion; HG, high glucose; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; IRMA, immunoradiometric assay; KRB, Krebs's buffer; KRBH, Krebs-Ringer bicarbonate; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC, phospholipase C; RAS, renin-angiotensin system; ROS, reactive oxygen species; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase; T2D, type 2 diabetes; TBP, TATA box binding protein; XBP1, X-box binding protein 1

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Correspondence: INSERM U1060/University Lyon 1/Inra 1235, Lyon-Sud Medicine, Faculty, 165 Chemin du Grand Revoyet-BP 12, 69921 Oullins Cedex, France. E-mail: [anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr](mailto:anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr)

doi: 10.1096/fj.13-234104

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

angiotensin II (Ang II) in T2D and the protective activity of RAS blockade. A local pancreatic RAS has recently been identified in human pancreatic islets (10). Angiotensinogen was found in the  $\alpha$  cells of the islets, whereas renin and ACE were detected in different area of the islet and microvasculature (11). Ang II induces its effects *via* at least two G-protein-coupled transmembrane receptors, AT1R and AT2R. AT1R was found in  $\beta$  cells and AT2R in outer areas colocalized with somatostatin-positive cells (11). Studies of the effect of Ang II on the endocrine pancreas or pancreatic  $\beta$  cells are difficult to interpret due to conflicting results (11, 12), but inhibiting Ang II effects improved  $\beta$ -cell secretory function and mass in a T2D rodent model (12, 13).

If glucose is the primary regulator of insulin secretion, many second messenger systems including phospholipase C (PLC) are activated by glucose-derived signals (14) and by Ang II (10). PLC, a G-coupled protein, is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) to inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol, both key regulators of cellular responses. Moreover, in pancreatic  $\beta$  cells, AT1R activation increases intracellular calcium both by promoting influx of extracellular calcium and by the PLC-IP<sub>3</sub>-sensitive release of calcium from reticular stores (10).

In this study, we investigated the effects of losartan, an AT1R inhibitor, on human islets exposed to high glucose in parallel and in addition to a phosphoinositide-selective phospholipase C inhibitor (U73122). We showed here that *in vitro* AT1R inhibition by losartan protected human  $\beta$  cells from glucose-induced ER stress responses and improved both ER Ca<sup>2+</sup> storage and  $\beta$ -cell function, suggesting that RAS has a critical role in human  $\beta$ -cell homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Islet culture

Human pancreatic islets from 13 nondiabetic donors (age 50.5 ± 2.6; BMI 24.2 ± 0.9 kg/m<sup>2</sup>; purity of islet preparations >79%) were obtained through the cell isolation and transplantation center from the Geneva University Hospital and the cell isolation unit of Grenoble University Hospital (Grenoble, France). Viability determined by propidium iodide exclusion was >90%. Islets were processed as described previously (15) and cultivated for 4 d in DMEM containing 5% SVF, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin and supplemented either with 5.5 mM (controls) or with 16.7 mM (high glucose [HG]) D-glucose. During the last 2 d of culture, islets were treated or not with losartan (5 µM). In some experiments, islets were treated with PLC inhibitor U73122 (2 µM). We have assessed previously under these experimental conditions the presence of endothelial cells and expression of angiogenic factors, as well as the absence of apoptosis (15).

### Reactive oxygen species (ROS) measurement

ROS levels were determined in human islets by measuring oxidation of the redox-sensitive dye 2',7'-dichlorofluorescein

(DCF). Briefly, experimental islets were washed twice in pre-warmed Krebs buffer (KRB) and incubated in KRB containing 25 mM glucose and 5 µM DCF at 37°C. After 30 min, cells were washed in KRB, and fluorescence ( $\lambda_{ex}$  485 nm,  $\lambda_{em}$  515 nm) was measured in a plate reader (Fusion Microplate System A1536, Packard Instruments, Meriden, CT, USA).

### Insulin secretion study

At the end of the 4 d incubation period, islets were kept at 37°C for 45 min in Krebs-Ringer bicarbonate (KRBH; 125 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 mM NaHCO<sub>3</sub>; and 25 mM HEPES pH 7.4) supplemented with 0.5% bovine serum albumin and 5.5 mM glucose. To assess basal secretion, islets were incubated in KRBH containing 5.5 mM glucose for 45 min, then challenged with 16.7 mM glucose to assess glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Insulin was quantified using a highly specific immunoradiometric assay (IRMA; Bi-insulin IRMA; cis-Bio International, Gif sur-Yvette, France).

### Quantification of mRNAs

Total RNA samples were purified using the TriPure Isolation Reagent kit (Roche, Boulogne-Billancourt, France), and mRNA levels were measured by reverse transcription followed by quantitative real-time PCR using a Rotor-Gene 600 (Corbett Research; Qiagen, Courtaboeuf, France) as described previously (15). To monitor  $\beta$ -cell function and ER stress markers, we measured mRNA levels of angiotensin 2 type 1 receptor (AGTR1), angiotensinogen (AGT), ACE, glucose response protein 78 (GRP78), X-box binding protein 1 (spliced XBP1 and total XBP), activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP homology protein (CHOP), and PLC  $\beta$ 1 and  $\gamma$ 1 isoforms. Values were normalized using TATA box binding protein mRNA (TBP). Primers used for real-time PCR are listed in Table 1.

### Western blot

Islets were lysed in PBS containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 200 mM NaF, 50 mM HEPES, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 mM protease inhibitor cocktail, and 1 mM dithiothreitol. Primary antibodies were directed against Grp78 (Santa Cruz Biotechnology, Nanterre, France), sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2b (Serca2b; Santa Cruz Biotechnology), IP<sub>3</sub> receptor 2 (IP<sub>3</sub>R2; Abcam, Paris, France), PLC  $\gamma$ 1, and PLC  $\gamma$ 1 (Santa Cruz Biotechnology), as well as against actin (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) as controls.

### Intracellular [Ca<sup>2+</sup>] measurements

To measure intracellular [Ca<sup>2+</sup>] dynamics, cells were loaded with 5 µM Fura-2 AM (Invitrogen, Saint Aubin, France) in modified KRB for 30 min at 37°C. Prior to experiments, we rinsed cells twice with Ca<sup>2+</sup>-free KRB solution to remove unhydrolyzed indicator. The Fura-2 AM loaded dishes were placed onto a thermostated chamber maintained at 37°C. Imaging was acquired with a digital cool CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) on an inverted-stage microscope (Nikon Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan) using a  $\times$ 40 oil-immersion objective. Fura-2 dye was excited alternatively at Ca<sup>2+</sup>-sensitive wavelengths (340 and 380 nm) using a dual monochromator (Polychrome II; Till Photonics, Munich, Germany); emission fluorescence was selected through a dichroic mirror (DM400) and a wide-band filter (520–560

TABLE 1. Sequences of primers used for the RT-qPCR of human islets

Gene	Primer sequences	
	Forward	Reverse
ACE	5'-CCGAAACGAAACCCACTTTG-3'	5'-GAACTGGAAGTGGAGGACAA-3'
AGT	5'-TTCTGCACACCCAGCTGAAC-3'	5'-TGTGGGTAAACTCTGTGGG-3'
AGTR1	5'-TGCACCATGTTTTGAGGTG-3'	5'-TGTGGCTTTGCTTTGTCTTG-3'
ATF4	5'-TGCATGCTCTGTTTGAATG-3'	5'-AGAATGTAAGGGGGCAACC-3'
CHOP	5'-CTGGAAGCTGGTATGAGGA-3'	5'-CTCTGACTGGAGTCTGGAGA-3'
GRP78	5'-CCACCTCCAATATCAACTTG-3'	5'-ACCATCAGGGCAACCCGATCA-3'
TBP	5'-TGGTGTGCACAGGAGCCAAG-3'	5'-TTCACATCACAGCTCCGCAC-3'
PLC $\beta$ 1	5'-AGCAGCTGCTTAATCTTCGG-3'	5'-GTCTTCTCCTCTTCCATCTG-3'
PLC $\gamma$ 1	5'-CTGAGCCTGCAAGCCACATC-3'	5'-CCTTGGCTGATATACGATCC-3'
XBP-1T	5'-GTGCAGGCCAGTTGTCACC-3'	5'-TCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'
XBP-1U	5'-CAGACTATGTGCACCTCTGC-3'	5'-TCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3'

nm).  $Ca^{2+}$  signals were then analyzed using Metafluor software (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA). Regions of interest were defined around individual cells. After background subtraction, the ratio  $F_{340}/F_{380}$  was calculated to estimate intracellular  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### Statistical analysis

Data are given as means  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test between 2 groups. For multiple comparisons, differences were determined by 1-way ANOVA and Fisher's exact test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ . Origin (Microcal Software, Northampton, MA, USA) was used for  $[Ca^{2+}]_i$  curve generation and statistical analysis.

## RESULTS

### AT1R blockade by losartan improves HG-induced oxidative stress

We observed that human islets treated with 16.7 mM glucose significantly increased ROS levels when compared to 5.5 mM glucose ( $160.20 \pm 38$  vs.  $89.47 \pm 15$  DCF values/ $\mu$ g protein/ml from 3 independent islet preparations,  $P < 0.01$ ). Incubation with losartan (5  $\mu$ M)

reduced ROS levels by 52% ( $P < 0.01$ ) when compared to islets treated with 16.7 mM glucose alone.

### Losartan and U73122 reduce RAS activation induced by chronic HG

AGTR1, AGT, and ACE genes are expressed in human islets. As shown in Fig. 1, in response to HG, AGTR1 and AGT gene expressions were increased by 150% ( $P < 0.05$ ) and 183% ( $P < 0.001$ ), respectively, although ACE mRNA expression was comparable to controls. Both RAS inhibition by losartan and PLC inhibition by U73122 normalized AGTR1 and AGT mRNA levels, whereas ACE mRNA expression was unchanged. Addition of both losartan and U73122 had similar effects than losartan or U73122 alone. RAS mRNA levels were not modified by addition of losartan and U73122 in basal condition at 5.5 mM glucose (NS;  $P > 0.05$  vs. controls; data not shown).

### AT1R blockade by losartan preserves insulin secretion of human islets exposed to HG

To evaluate the functionality of islets at the end of the 4 d culture period, we investigated insulin secretion at the protein levels by IRMA. As expected, the GSIS of

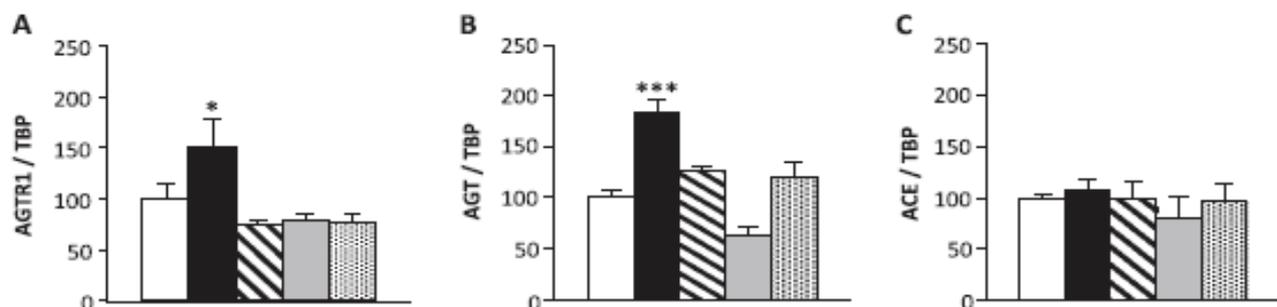


Figure 1. RAS expression in response to HG, losartan, and U73122 in human islets. A) AGTR1 mRNA expression. B) AGT mRNA expression. C) ACE mRNA expression. Expressions were analyzed by qPCR from 10 independent islet preparations. Islets were cultivated in 5.5 mM glucose alone (open bar) or in 16.7 mM glucose alone (solid bar) or with losartan (hatched bar), U73122 (gray bar), or losartan and U73122 (dotted bar). Results are expressed as the percentage of gene variation in comparison to control islets maintained at 5.5 mM glucose. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. 5.5 mM glucose.

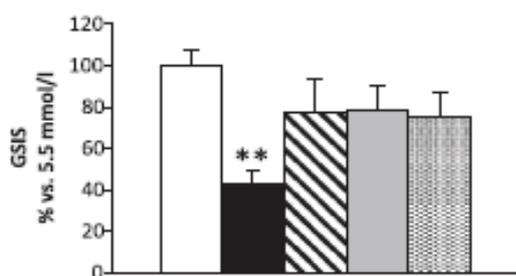
islets exposed to HG was significantly lower than controls (Fig. 2, -57%,  $P < 0.0001$ ). Losartan or U73122 had no effect at 5.5 mM glucose but improved GSIS at 16.7 mM glucose (-23 and -21%, respectively, NS vs. controls). Addition of both losartan and U73122 had similar effects than losartan or U73122 alone (Fig. 2).

#### AT1R blockade by losartan and PLC inhibition abrogates HG-induced ER stress

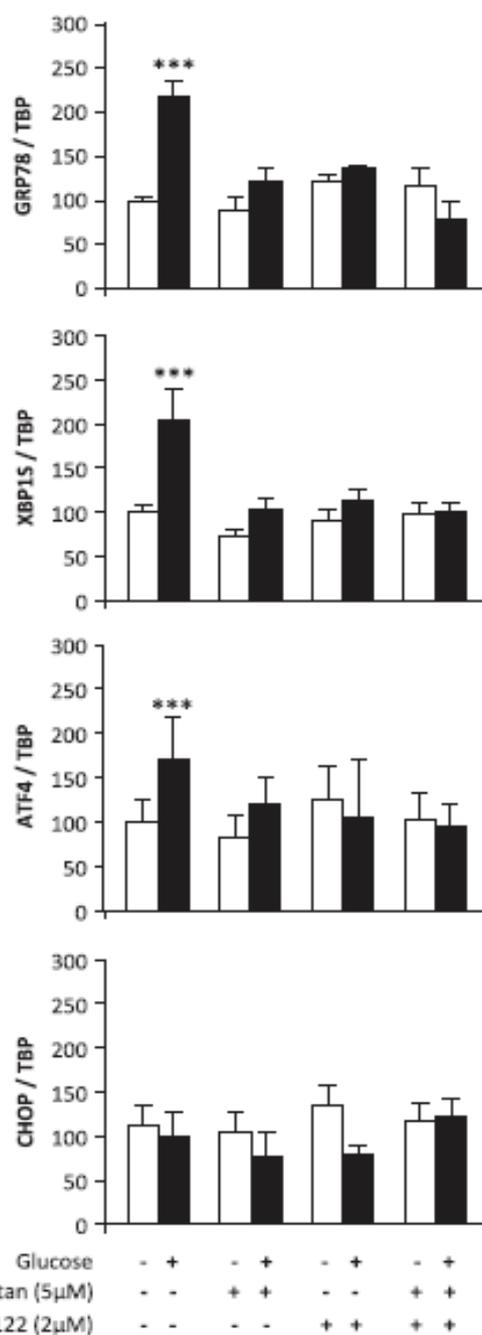
As HG is a source of ER stress in  $\beta$  cells (4), we investigated the capacity of losartan to reduce the glucose-induced activation of the unfolded protein response and ER stress in pancreatic  $\beta$  cells. We observed that HG increased significantly ( $P < 0.001$ ) mRNA levels of several ER stress markers compared to controls, such as GRP78 by 216%, sXBP1 by 206%, and ATF4 by 193% (Fig. 3). However, expression of CHOP, a proapoptotic ER stress factor, was not modified, suggesting that ER stress did not reach critically high levels during our culture conditions. In addition, the amount of Grp78 protein (Fig. 4) was also increased with HG by 147% ( $P < 0.05$ ), and the amount of CHOP was undetectable (not shown). Losartan and U73122 normalized GRP78, sXBP1, and ATF4 mRNA levels (Fig. 3). Losartan or U73122 also normalized Grp78 protein expression (Fig. 4). Addition of both losartan and U73122 had similar effects than losartan or U73122 alone. The expression of mRNA and protein of ER stress markers was not modified by addition of losartan in basal condition (NS vs. respective control islets, Figs. 3, 4).

#### PLC inhibition and AT1R blockade protect calcium homeostasis of human islets from HG deleterious effects

ER is a major internal  $\text{Ca}^{2+}$  storage organelle in  $\beta$  cells, which acts as a  $\text{Ca}^{2+}$  buffer that regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling in the cytosol and ER chaperone activity.



**Figure 2.** Chronic exposure of human islets to 16.7 mM glucose causes a reduction of insulin release. GSIS ( $n=4$ ) after a 45-min challenge with 16.7 mM glucose was expressed as the ratio of insulin concentration in supernatants to protein content in milliunits per liter per milligram. Data are presented as mean  $\pm$  SE. Islets were cultivated in 5.5 mM glucose alone (open bar) or in 16.7 mM glucose alone (solid bar) or with losartan (hatched bar), or U73122 (gray bar), or losartan and U73122 (dotted bar). \*\* $P < 0.01$  vs. 5.5 mM glucose.

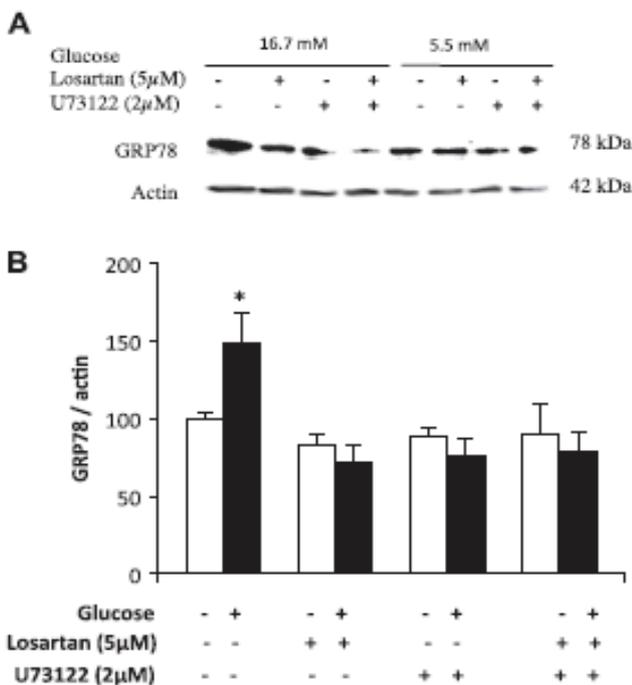


**Figure 3.** Effects of losartan and U73122 on HG-induced ER stress of human islets. Analysis of ER stress responses for GRP78, sXBP1, ATF4, and CHOP mRNAs adjusted to TBP mRNA levels of human islets cultured at 5.5 mM glucose (open bars) or 16.7 mM glucose (solid bars) in the presence or not of losartan, U73122, or losartan and U73122. Results are expressed as the percentage of gene variation in comparison to control islets from 9 independent islet preparations. \*\*\* $P < 0.001$  vs. 5.5 mM glucose.

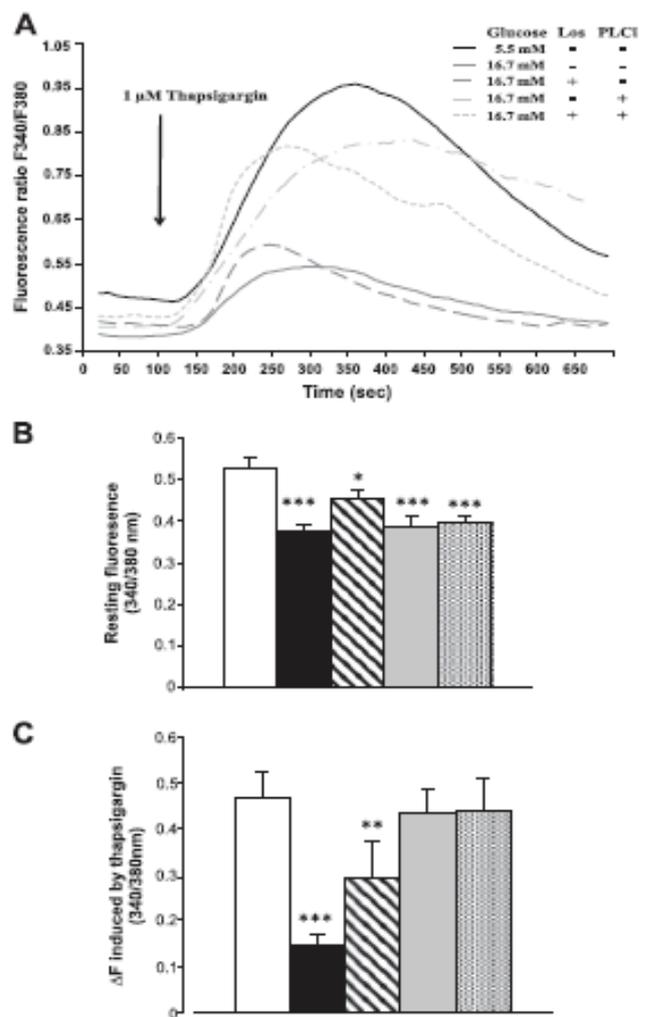
To establish the characteristics of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pools, we first analyzed the resting  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in cytosol  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  using Fura-2 AM dye, in islets exposed to HG with or without losartan and/or U73122. As shown in Fig. 5A, B, HG levels reduced

$[Ca^{2+}]_{cyt}$  in human islets by 30% ( $P < 0.0001$ ) compared to controls. Interestingly, losartan partially prevented glucose-induced  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  reduction (Fig. 5B, -10%,  $P < 0.05$  vs. controls). PLC inhibition with U73122 does not modify the reduction in  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in islets exposed to HG (Fig. 5B). We next examined the status of the reticular  $Ca^{2+}$  pool by comparing the  $Ca^{2+}$  peak obtained after adding thapsigargin, a SERCA inhibitor, in the absence of external  $Ca^{2+}$ . After stimulation of individual islets with a pressure pulse of thapsigargin, we assessed the release of reticular calcium  $[Ca^{2+}]_{ER}$ . As illustrated in Fig. 5A, C, we found a significant decrease by 69% in the amounts of  $[Ca^{2+}]_{ER}$  with HG compared to controls ( $P < 0.0001$ ), as well as a partial protective effect by losartan (-37%,  $P < 0.01$  vs. controls). In the same condition, addition of U73122 normalized the  $[Ca^{2+}]_{ER}$ . Addition of both losartan and U73122 had similar effects than U73122 alone (Fig. 5C).

ER  $Ca^{2+}$  concentration is a balance between active  $Ca^{2+}$  entry through SERCA and  $Ca^{2+}$  release. We further analyzed SERCA2b pump, one of the major SERCA isoform in  $\beta$  cells (16), and we found that HG significantly decreased its protein expression by 35% (Fig. 6A). We also observed an increased protein expression by 131% of IP3R2 release channel ( $P < 0.05$ ), the major glucose-dependent isoform expressed in  $\beta$  cells (ref. 17 and Fig. 6B). Losartan and U73122 have



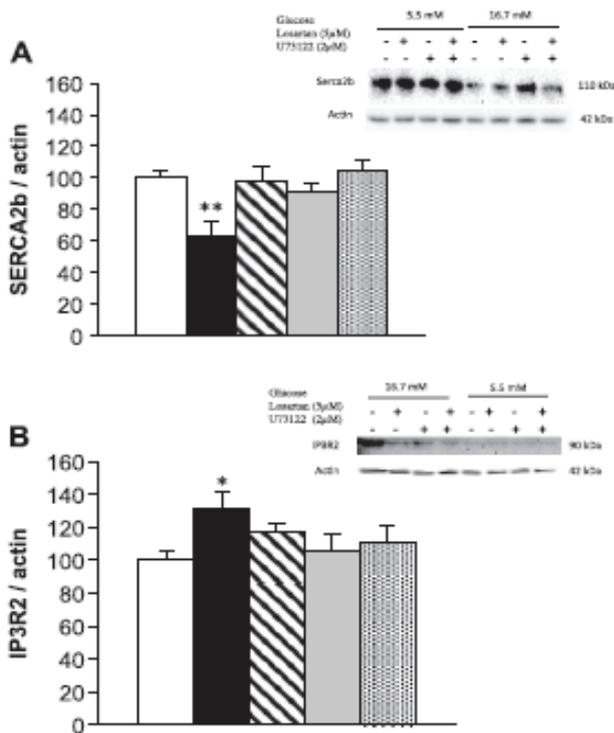
**Figure 4.** Quantitative analysis of GRP78 protein by Western blot. *A*) Western blot from a representative experiment. *B*) Quantification of GRP78. Islets from 6 independent preparations were cultured in 5.5 mM glucose (open bars) or 16.7 mM glucose (solid bars) in the presence or not of losartan, U73122, or losartan and U73122. \* $P < 0.05$  vs. 5.5 mM glucose.



**Figure 5.** Effects of losartan on  $[Ca^{2+}]$  stores of human islets treated by HG. *A*) Representative graph of the effect of 1  $\mu$ M thapsigargin on  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  and  $[Ca^{2+}]_{ER}$  of human islets using 5.5 mM glucose, 16.7 mM glucose, or 16.7 mM glucose with 5  $\mu$ M losartan and/or 2  $\mu$ M U73122. Once the steady state was obtained, 1 mM thapsigargin was added, as indicated by arrow. *B*)  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ : average resting  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  of control cells (open bars), cells treated with 16.7 mM glucose (solid bars) and cells treated with 16.7 mM glucose and losartan (hatched bars), U73122 (gray bars), or losartan and U73122 (dotted bars). *C*)  $[Ca^{2+}]_{ER}$ : calculated mean increase in  $[Ca^{2+}]$  (peak ratio 340/380 nm, resting ratio 340/380 nm) induced by the addition of thapsigargin. Results are means  $\pm$  SE ( $n = 17-32$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs. 5.5 mM glucose.

no action on these expressions in basal conditions but counteracted both SERCA2b decrease and IP3R2 protein overexpression in the presence of HG (Fig. 6). Addition of both losartan and U73122 had similar effects than losartan or U73122 alone on protein expressions (Fig. 6).

Previous studies implicated the activation of PLC as regulator of insulin release (see ref. 14 for review). Fiume *et al.* (18) have recently identified in pancreatic MIN6 murine  $\beta$ -cells distinct PLC isoforms localized in



**Figure 6.** SERCA2b and IP3R2 expression in human islets. *A*) Quantitative analysis of SERCA2b protein expression from 3 independent experiments. Inset: Western blot from a representative experiment. *B*) Quantitative analysis of IP3R2 protein expression ( $n=3$ ). Inset: Western blot from a representative experiment. Islets were cultured in 5.5 mM glucose (open bars), 16.7 mM glucose (solid bars), or 16.7 mM glucose with losartan (hatched bars), U73122 (gray bars), or losartan and U73122 (dotted bars). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 5.5 mM glucose.

the nucleus, PLC $\beta$ 1 and PLC $\delta$ 4, and in the cytoplasm, PLC $\beta$ 1 and PLC $\gamma$ 1. In human islets, we observed that PLC $\beta$ 1 and PLC $\gamma$ 1 mRNA expressions were increased with HG by 194% ( $P < 0.01$ ) as compared to controls (Fig. 7A, B). Addition of losartan normalized their expression as U73122. Addition of both Losartan and U73122 had similar effects than losartan or U73122 alone. We also observed that HG increased protein expression of PLC $\beta$ 1 by 174% and PLC $\gamma$ 1 by 235% ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  vs. controls, respectively; Fig. 7C-E). Losartan partially reduced PLC $\beta$ 1 overexpression (+119%;  $P < 0.05$  vs. controls) and normalized PLC $\gamma$ 1 expression (NS vs. controls). U73122 restored PLC $\beta$ 1 and PLC  $\gamma$ 1 protein expressions similar to controls as well as the addition of both losartan and U73122 (Fig. 7C-E).

## DISCUSSION

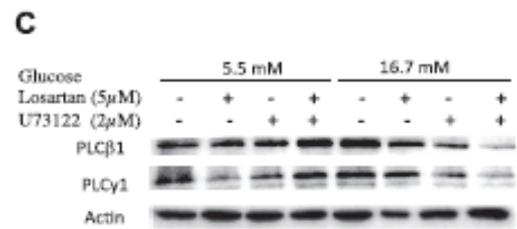
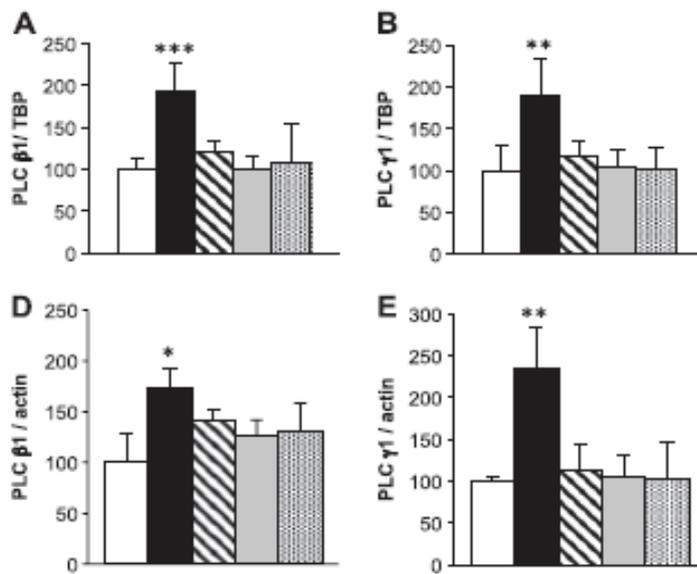
Regular physiological stimulation by glucose plays a crucial role in the maintenance of the  $\beta$ -cell-differentiated phenotype. In contrast, prolonged or repeated

exposure to elevated glucose concentrations both *in vitro* and *in vivo* exerts deleterious effects on the  $\beta$ -cell function, a concept termed glucotoxicity (19). We provide here the first evidence that local RAS inhibition by losartan preserves human islets from glucotoxicity. Losartan has antioxidant effects, protects reticular calcium concentration, abrogates ER stress, and reduces AT1R and AGT overexpression. Moreover, losartan prevented the increase of PLC  $\beta$ 1 and PLC  $\gamma$ 1 protein levels induced by HG. We also show that PLC inhibition by U73122 has similar effects than losartan and could be a new way of understanding the role of RAS-activated pathways in  $\beta$ -cell homeostasis.

Local RAS plays an important role in islet physiology and pathophysiology (10). It regulates pancreatic islet blood flow oxygen tension and islet (pro) insulin biosynthesis (11). Prorenin, AT1R, AT2R, AGT, and ACE are expressed in murine and/or human pancreatic islets (10, 11, 20). Most local RAS effects are mediated *via* the AT1R. Therefore, interfering with this signaling with blockers like losartan should not only alleviate insulin resistance (21) but also improve  $\beta$ -cell function. This supports the improvements of glucose tolerance seen in both murine and rat models of T2D (22, 23) and human T2D (24) after AT1R blockade. Losartan, a tetrazole nonpeptide molecule, is a selective antagonist of AT1R. However, additional interactions, although unlikely, cannot be excluded. We show here that chronic HG treatment induces AT1R and AGT mRNA overexpression in human islets. AGT overexpression could mediate the increase of angiotensin 2 production, leading to AT1R hyperactivation. Previous studies in rodent islets showed that excess of Ang II causes  $\beta$ -cell dysfunction (25). Although accurate quantification of Ang II is hampered by its short half-life, recent data indicate that intrinsic RAS generates high concentrations of Ang II (10). Our data suggest that losartan abrogates this pathway and consequently inhibits the PLC-AT1R-activated pathway. This hypothesis is supported by inhibition of RAS overexpression under HG conditions with U73122, which is established as the archetypal inhibitor of PLC, known to inhibit the generation of inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular mobilization of  $Ca^{2+}$ . The lack of additive effects of both losartan and U73122 suggests a common pathway.

Distinct PLC isoforms localized in the nucleus, PLC $\beta$ 1, and in the cytoplasm, namely, PLC $\beta$ 1 and PLC $\gamma$ 1, were recently identified in pancreatic MIN6 murine  $\beta$  cells. They all affected glucose-induced insulin release (18). In this study, we describe for the first time the existence of these isoforms in human islets and their stimulation following chronic glucose exposure. Treatment by losartan normalizes PLC isoform levels in the same manner as the PLC inhibitor U73122, supporting our hypothesis on a direct effect of losartan on the PLC- $Ca^{2+}$  pathway.

Glucose-activated PLC generates IP3, which induces the release of intracellular calcium from RE through IP3 receptors. Calcium is an important messenger



**Figure 7.** PLC  $\beta$ 1 and PLC  $\gamma$ 1 expression in human islets. *A, B*) Analysis of PLC  $\beta$ 1 (*A*) and PLC  $\gamma$ 1 (*B*) mRNA adjusted to TBP mRNA levels of 7 human islets. *C*) Quantitative analysis of PLC protein by Western blot. Blot is from a representative experiment. *D, E*) Quantification of PLC  $\beta$ 1 (*D*) and PLC  $\gamma$ 1 (*E*) protein expression adjusted to actin expression of 3 islet preparations. Islets were cultured in 5.5 mM glucose (open bars), 16.7 mM glucose (solid bars), or 16.7 mM glucose with losartan (hatched bars), U73122 (gray bars), or losartan and U73122 (dotted bars). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. 5.5 mM glucose.

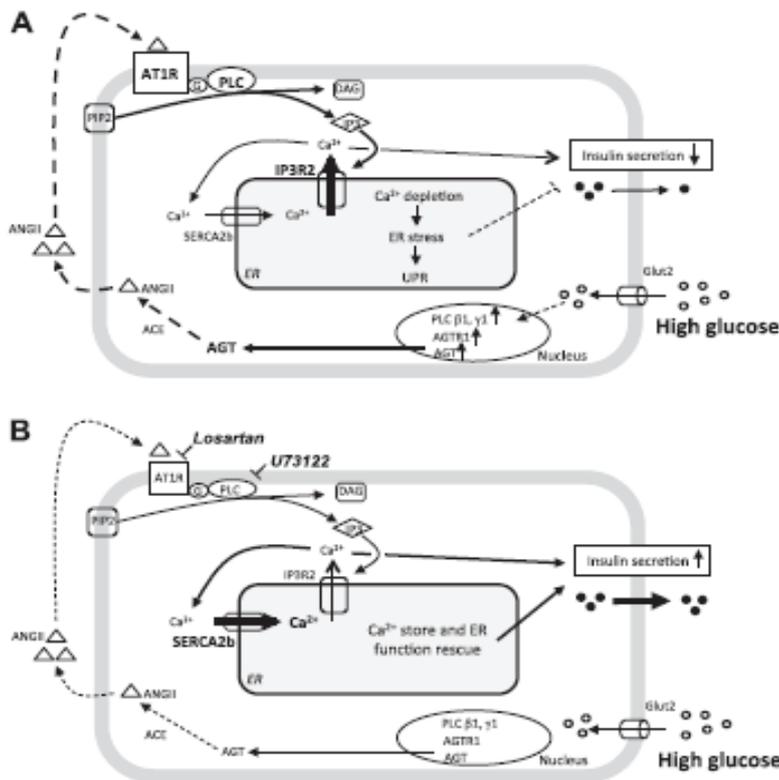
signal required for numerous cellular functions (26). The ER is the main intracellular storage compartment for calcium. Like  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , luminal  $Ca^{2+}$  concentration  $[Ca^{2+}]_{ER}$  is tightly regulated (26). In  $\beta$  cells,  $[Ca^{2+}]_{ER}$  is higher than in other cell types to conform proteins when insulin demand increases in response to glucose (27) and is also highly regulated. This is the reason why we investigated both reticular and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentrations in human  $\beta$  cells exposed to HG. We labeled cytosolic  $Ca^{2+}$  with the ratiometric Fura-2 AM probe and measured the increase of cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration after thapsigargin, a SERCA inhibitor, which leads to the release of reticular  $Ca^{2+}$  and corresponds to  $[Ca^{2+}]_{ER}$  (28). We observe that HG caused a large decrease in both reticular and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentrations.

ER calcium concentration is a balance between active  $Ca^{2+}$  entry through SERCA and  $Ca^{2+}$  release (16). Serca2b is a nonmuscle isoform that catalyzed reticular  $Ca^{2+}$  entrance and represents about half of the Sercas present in the islets of Langerhans and pancreatic  $\beta$ -cell lines (29). IP3R2 is the glucose-dependent activated IP3R isoform in the  $\beta$  cell (17–30). When exposed *in vitro* to HG, we show that human islets reduced SERCA2b protein expression. These data are in accordance with recent reports showing a reduced SERCA2b protein amounts in the islets from patients with T2D (31–32). Decreased SERCA protein levels participate in  $Ca^{2+}$  homeostasis dysregulation (33). Our observation that human islets exposed to HG overexpressed IP3R2 at both the mRNA and protein levels is in accordance with the results obtained both *in vivo* and *in vitro* in the rat PPx model (17). Interestingly, we find that losartan both normalizes SERCA2b protein expression and prevents IP3R2 overexpression. We can therefore conclude that these effects may participate in the prevention of reticular  $Ca^{2+}$  depletion by losartan. PLC inhibition mimics losartan effects on  $Ca^{2+}$  homeostasis,

reinforcing our hypothesis that losartan inhibits the PLC-IP3- $Ca^{2+}$  pathway.

Accumulating evidence indicates that failure of  $\beta$  cells to compensate for excessive insulin needs is a key feature in the pathogenesis of T2D (1, 2). Glucose-induced insulin release is a tightly regulated process. In response to glucose stimulation,  $\beta$  cells increase insulin biosynthesis, which approaches 50% of their total protein production (34). Within this overloaded ER, all proteins will not be correctly folded. This triggers ER stress (35). In this study, we show that chronic exposure of human islets to HG leads to significant ER stress responses, such as activation of IRE1  $\alpha$ /XBP-1 PERK/ATF4 and GRP78/ATF6 pathways. Activation of XBP-1 along with normal expression of CHOP indicates that both glucose concentration and duration of glucose exposure were mild enough not to elicit downstream apoptotic events, a condition similar to diabetic patients of recent onset. Losartan, by inhibiting AT1R activation, counteracts HG-induced ER stress. We speculate that losartan effects are linked to reduction of AT1R mRNA expression. PLC inhibition would have been sufficient to inhibit ER stress. Various studies have shown that preventing ER stress with chemical molecules or chemical chaperones was able to protect  $\beta$ -cell function from glucotoxicity (36). We show here that losartan and PLC inhibition abrogated ER stress and restored glucose-stimulated insulin secretion.

Calcium homeostasis and ER-regulated functions are essential for appropriate integrated  $\beta$ -cell functions. In our study, we show that both  $Ca^{2+}$  homeostasis and ER function are misregulated with chronic HG, leading to impaired  $\beta$ -cell function, as summarized in Fig. 8A. HG activates RAS pathway and PLC. HG also increases IP3R2 and decreases Serca2b, leading to reticular  $Ca^{2+}$  pump imbalance and reticular  $Ca^{2+}$  depletion. More-



**Figure 8.** A) Model of insulin secretion impairment in response to chronic HG in human  $\beta$  cells. Glucose is internalized by GLUT 2, and a cascade of seminal events allows subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  influx and activation of several  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes including PLC and culminates in insulin secretory vesicle release. HG increases AGTR1 and AGT mRNA expression, leading to intraislet autocrine RAS activation and the AT1R-PLC-IP3- $\text{Ca}^{2+}$  pathway. HG increases PLC  $\beta$ 1 and  $\gamma$ 1. These PLC isoforms are in part cytosolic enzymes, which produce IP3 able to activate IP3Rs. HG decreases Serca2b calcium pumps and increases IP3R2 release channels; this imbalance leads to reticular  $\text{Ca}^{2+}$  depletion. Both  $\text{Ca}^{2+}$  dysregulation and ER stress impaired insulin secretion. B) Addition of losartan and U73122, a PLC inhibitor, to HG normalized AT1R and AGT expression, decreased PLC activation, rescued reticular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, abrogated ER stress, and restored insulin secretion. Losartan, by its effect on the PLC-IP3- $\text{Ca}^{2+}$  pathway, restores  $\beta$ -cell function by preserving balance between reticular  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and limiting ER overactivity induced by HG in human islets, showing the possible pivotal role of RAS in T2D.

over, while ER has to conform more proteins, such  $\text{Ca}^{2+}$  depletion may reinforce the induction of ER stress and the impairment of insulin secretion.

We demonstrate for the first time that losartan directly reduces PLC expression in human islets in the same manner as the selective PLC inhibitor U73122. Losartan restores  $\beta$ -cell functions through the AT1R-PLC-IP3- $\text{Ca}^{2+}$  pathway by preserving balance between reticular calcium pumps and by limiting ER overactivity induced by HG (Fig. 8B).

In summary, our results indicate that chronic exposure of human islets to high but moderate glucose concentrations triggers ER stress, interferes with  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and affects insulin secretion. AT1R inhibition by losartan *via* the PLC-IP3- $\text{Ca}^{2+}$  pathway markedly improves all of these alterations and favors  $\beta$ -cell metabolism, suggesting that RAS has a critical role in human  $\beta$ -cell physiology. This observation may have important clinical applications, including the need for early introduction of AT1R blockers in patients with recently diagnosed T2D and for the *in vitro* preconditioning of human islets prior to allogeneic transplantation in type 1 diabetic recipients. [7]

Human islets were provided through Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF) award 31-2008-413 [European Consortium for Islet Transplantation (ECIT) Islet for Basic Research program] from Geneva University Hospital and from the cell isolation laboratory at Grenoble University Hospital (Grenoble, France). The authors thank the genomic platform of INSERM 1060–Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie, et Nutrition (CARMEN). This work was sup-

ported by grants from both INSERM and University Claude Bernard Lyon (UCBL) and Centaure Transplantation Research Network. The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Kahn, S. E. (2003) The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3–19
- Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., Del Prato, S., and Marchetti, P. (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727–735
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chasseaume, E., Chauvin, M. A., Morio, B., Vidal, H., and Rieusset, J. (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 118, 789–800
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, C., Gorgun, C., Glimcher, K. H., and Hotamisligil, G. S. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461
- Hotamisligil, G. S. (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140, 900–917
- Tanaka, Y., Tran, P. O., Harmon, J., and Robertson, R. P. (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, 12963–12968
- Lee, Y. Y., Hong, S. H., Lee, Y. J., Chung, S. S., Jung, H. S., Park, S. G., and Park, K. S. (2010) Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. *BBRC* 397, 735–739
- The Navigator study group. (2010) Effect of Valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 362, 1477–1490
- Geng, D., Jin, D. M., Wu, W., Xu, Y., and Wang, J. F. (2012) Angiotensin receptor blockers for prevention of new-onset type

- 2 diabetes: a meta-analysis of 59,862 patients. *Int. J. Cardiol.* **155**, 236–242
10. Ramracheya, R. D., Muller, D. S., Wu, Y., Whitehouse, B. J., Huang, G. C., Amiel, S. A., Karaliedde, J., Viberti, G., Jones, P. M., and Persaud, S. J. (2006) Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans. *Diabetologia* **49**, 321–331
  11. Chu, K. Y., and Leung, P. S. (2009) Angiotensin II in type 2 diabetes: current protein and peptides. *Science* **10**, 75–84
  12. Chu, K.Y., Lau, T., Carlsson, P. O., and Leung, P. S. (2006) Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* **55**, 367–374
  13. Hunyadi, L., and Catt, K. J. (2006) Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* **20**, 953–970
  14. Yamazaki, H., Zawalich, K. C., and Zawalich, W. S. (2010) Physiologic implications of phosphoinositides and phospholipase C in the regulation of insulin secretion. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **56**, 1–8
  15. Dubois, S., Madec, A. M., Mesnier, A., Armanet, M., Chikh, K., Berney, T., and Thivolet, C. (2010) Glucose inhibits angiogenesis of isolated human pancreatic islets. *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 99–105
  16. Varadi, A., Molnar, E., Ostenson, C. G., and Ashcroft, S. J. H. (1996) Isoforms of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem. J.* **319**, 521–5270
  17. Lee, B., Jonas, J. C., Weir, G. C., and Laychock, S. G. (1999) Glucose regulates expression of inositol 1,2,5-triphosphate receptor isoforms in isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology* **140**, 2173–2182
  18. Fiume, R., Ramazotti, G., Faenza, I., Piazzini, M., Bavelloni, A., Billi, A. M., and Cocco, L. (2012) Nuclear PLCs affect insulin secretion by targeting PPARγ in pancreatic β cells. *FASEB J.* **26**, 203–210
  19. Poirout, V., and Robertson, R. P. (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and β-cell dysfunction. *Endocrin. Rev.* **29**, 351–366
  20. Lupi, R., Guerra, S., Bugliani, M., Boggi, U., Mosca, F., Torri, S., Del Prato, S., and Marchetti, P. (2006) The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets. *Eur. J. Endocrinol.* **154**, 355–361
  21. Henriksen, E. J. (2007) Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* **293**, R974–R980
  22. Tikellis, C., Wookey, P. J., Candido, R., Andrikopoulos, S., Thomas, M. C., and Cooper, M. E. (2004) Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat. *Diabetes* **53**, 989–997
  23. Chu, K. Y., and Leung, P. S. (2007) Angiotensin II type 1 receptor antagonism mediates uncoupling protein 2-driven oxidative stress and ameliorates pancreatic beta-cell function in young type 2 diabetic mice. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 869–878
  24. Gillespie, E. L., White, C. M., Karda, M., Lindberg, M., and Colmena, C. I. (2005) The impact of ACE inhibitors or angiotensin II type 1 receptor blockers on the development of new-onset type 2 diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2261–2266
  25. Lau, T., and Carlsson, P. O., and Leung, P. S. (2004) Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets. *Diabetologia* **47**, 240–248
  26. Michalak, M., Robert Parker, J. M., and Opas, M. (2002) Ca<sup>2+</sup>-signalling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* **32**, 269–278
  27. Mekahli, D., Bultynck, G., Pary, J. B., De Smedt, H., and Missiaen, L. (2011) Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–30
  28. Ducreux, S., Zorzato, F., Ferreiro, A., Jungbluth, H., Muntoni, F., Monnier, N., Müller, C. R., and Treves, S. (2006) Functional properties of ryanodine receptors carrying three amino acid substitutions identified in patients affected by multi-minicore disease and central core disease, expressed in immortalized lymphocytes. *Biochem. J.* **395**, 259–266
  29. Brini, M., and Carafoli, E. (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* **89**, 1341–1378
  30. Luciani, D. S., Gwazd, K. S., Yang, T. L., Kalynyak, T. B., Bychowska, Y., Frey, M. H., Jeffrey, K. D., Sampaio, A. V., Underhill, T. M., and Johnson, J. D. (2009) Roles of IP3R and RyR Ca<sup>2+</sup> channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death. *Diabetes* **58**, 422–432
  31. Varadi, A., Lebel, L., Hashim, Y., Mehta, Z., and Ashcroft, S. J., Turner, R. (1999) Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia* **42**, 1240–1243
  32. Kono, T., Ahn, G., Moss, D.R., Gann, L., Zarain-Herzberg, A., Nishiki, Y., Fueger, P. T., Ogihara, T., and Evans-Molina, C. (2012) PPAR-γ activation restores pancreatic islet SERCA2 levels and prevent β-cell dysfunction under conditions of hyperglycemic and cytokines stress. *Mol. Endocrinol.* **26**, 257–271
  33. Ravier, M. A., Daro, D., Roma, I. P., Jonas, J. C., Cheng-Xue, R., Schuit, F. C., and Gilon, P. (2011) Mechanisms of control of the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta-cells: interplay with cell metabolism and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and role of SERCA2b and SERCA3. *Diabetes* **60**, 2533–2545
  34. Liu, M., Li, Y., Cavener, D., and Arvan, P. (2005) Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **280**, 13209–13212
  35. Back, S. H., and Kaufman, R. J. (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 767–793
  36. Bensellam, M., Laybutt, D. R., and Jonas, J. C. (2012) The molecular mechanisms of pancreatic β-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **364**, 1–27

Received for publication May 31, 2013.  
Accepted for publication August 19, 2013.

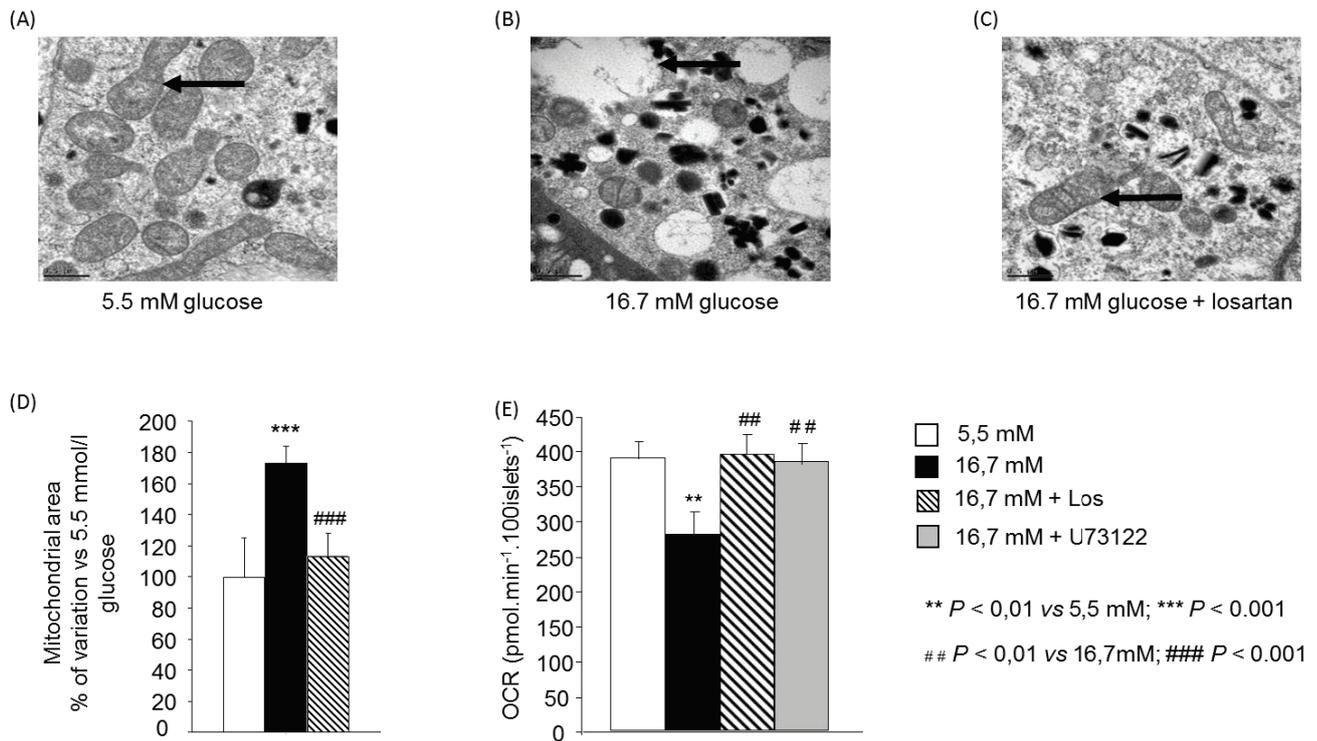
### 2.1.2 Travaux préliminaires

---

## **Le Losartan protège les îlots de Langerhans humains du stress mitochondrial induit par le glucose**

La mitochondrie a aussi un rôle central dans la fonction bêta cellulaire par la production d'ATP responsable à la fois de la sécrétion rapide des vésicules d'insuline et ainsi de l'activation de nombreuses enzymes ATP-dépendantes (Rorsman and Braun 2013). Nous avons ainsi étudié la structure et la fonction des mitochondries dans les îlots humains dans des conditions de glucotoxicité en présence ou non de losartan comme présenté dans l'article 1. Les îlots présentaient des altérations ultrastructurales : gonflement des mitochondries avec une perte de l'intégrité des crêtes mitochondriales (figure 25 A, B, C, D). Par oxygraphie, nous avons constaté que les mitochondries respiration moins en conditions HG qu'en conditions contrôles (figure 25 E). L'ensemble de ces résultats nous a fait supposer que la réduction du GSIS des îlots était certainement aussi dû à la réduction d'activité des mitochondries. L'altération structurale et fonctionnelle des mitochondries pourrait participer à l'état oxydant plus élevé des cellules par un contrôle moindre des électrons libres de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'inhibition du SRA par le losartan protège la structure et la fonction mitochondriales, ce qui suggère qu'elle a des effets multiples dans la cellule (figure 25 C, D). L'inhibition de la PLC reproduit les effets du losartan sur la respiration mitochondriale (figure 25 E).

Nous souhaitons poursuivre cette étude en étudiant plus précisément les mécanismes reliant les effets de l'inhibition de du SRA et l'amélioration de la fonction mitochondrial. Cela en mesurant notamment l'expression de protéines découplantes telles qu'UCP2 et des protéines pro-oxydantes NADPH oxydases. Comme nous l'avons vu précédemment, l'homéostasie calcique a un rôle important dans les régulations cellulaires. Nous souhaitons ainsi étudier les flux calciques entre le RE et les mitochondries dans ces conditions.



**Figure 24 :** Le losartan prévient les altérations morphologiques et fonctionnelles mitochondriales induites par la glucotoxicité dans les îlots de Langerhans humains. (A, B, C) Microscopie électronique de mitochondries cultivées en normogluucose (A), hyperglucose (B) et hyperglucose et losartan (C). Les mitochondries sont dilatées en condition hyperglucosée, le losartan protège de cet effet. (D) La surface des mitochondries observées en microscopie électronique est augmentée en présence d'une dose élevée de glucose, protégée par le losartan (mesure faite sur 100 mitochondries dans des champs différents). (E) Respiration mitochondriale d'îlots humains cultivés en normo- ou hyperglucose, avec ou sans losartan ou inhibiteur de PLC.

## 2.2 Travaux sur la lipotoxicité

La lipotoxicité est aussi un des facteurs qui conduit à la perte de fonction des cellules bêta. *In vitro*, nous avons tout d'abord étudié les effets du palmitate sur les îlots humains et une lignée cellulaire murine MIN6B1. Nous avons choisi le palmitate car il est l'acide gras saturé le plus présent dans le sang et très sujet à variation lors d'une alimentation riche en sucres et en lipides, capable d'induire des stress cellulaires, la dysfonction bêta pancréatique et une insulino-résistance.

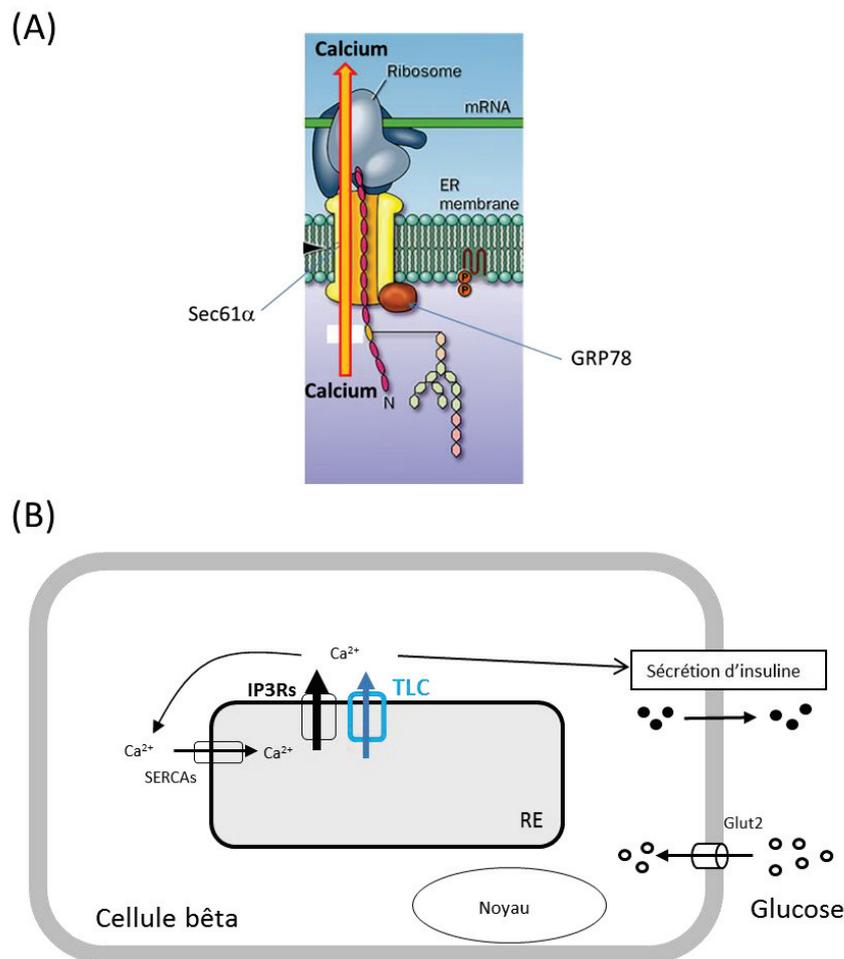
### 2.2.1 Etude *in vitro* : article 2 (soumis)

---

Nous avons cultivé les îlots humains dans un milieu contenant de la BSA ou du palmitate complexée à de la BSA (rapport 6:1). Nos premières expériences ont été réalisées pendant 24h à une dose de 200 $\mu$ M de palmitate mais n'induisait pas de stress significatif ni une perte de fonction. Nous avons choisi de traiter les îlots durant 48h à 500 $\mu$ M de palmitate, conditions qui induisaient cette fois-ci des stress et une diminution de la sécrétion d'insuline.

En effet, le GSIS était réduit de près de 40% en condition palmitate et les trois voies du stress du RE étaient activées. Nous avons pu évaluer cela par la mesure de GRP78, ATF4, ATF6 et XBP1s, qui étaient surexprimés au niveau génique. Le facteur proapoptotique CHOP était lui aussi surexprimé, suggérant une activation du processus apoptotique. L'homéostasie calcique est aussi un phénomène important dans les cellules bêta pour leur adaptation à une élévation en acides gras dans leur environnement. Nous avons donc mesuré les concentrations calciques cytosolique et réticulaire dans les îlots et avons observé une réduction de ces concentrations en présence de palmitate. Nous avons fait alors l'hypothèse que cette perturbation calcique pourrait être à l'origine du stress du RE et participerait à la perte de fonction des cellules bêta.

L'homéostasie calcique se fait grâce à de nombreux canaux et pompes situés dans les membranes des organites de la cellule et dans la membrane plasmique (figure 9). Le RE joue un rôle prépondérant dans les flux calciques de la cellule, via les pompes d'entrée du calcium Sercas et des canaux de fuite tels que les IP3Rs, les RyRs et les TRPs (Berridge, Bootman et al. 2003). Peu d'études montrent un effet bénéfique conséquent de l'inhibition de ces canaux sur la fonction bêta cellulaire. Le translocon, un complexe multiprotéique impliqué dans la traduction et la rétrotranslocation des protéines du RE vers le cytosol, a été montré comme un canal de fuite calcique réticulaire dans des cellules prostatiques cancéreuses (Van Coppenolle, Vanden Abeele et al. 2004). Nous avons fait l'hypothèse qu'il aurait un rôle similaire dans les cellules bêta. Nous avons fait une seconde hypothèse que, si la première se révélait vraie, le translocon pourrait jouer un rôle dans la baisse de la concentration calcique réticulaire induite par le palmitate et que son inhibition pourrait être protectrice pour la physiologie des cellules bêta. La figure 25 représente le translocon et son implication potentielle dans les flux calciques des cellules bêta pancréatiques.



**Figure 25 :** Le translocon et son implication potentielle dans l'homéostasie calcique des cellules bêta pancréatiques. (A) Le translocon est un complexe multiprotéique composé d'un pore permettant le passage des protéines nouvellement conformées. Sec61a est une des protéines du pore et protéine majoritaire du translocon. Le pore est fermé par GRP78 du côté de la lumière réticulaire et ouvert lorsque GRP78 se fixe à la protéine entrant pour la conformer. Cette ouverture pourrait participer à la fuite calcique réticulaire. (B) Le translocon pourrait être un canal de fuite calcique réticulaire passif participant aux flux calciques de la cellule bêta et à sa sécrétion d'insuline, comme les IP3Rs.

Deux molécules pharmacologiques nous ont permis de travailler sur le translocon : la puromycine et l'anisomycine, qui sont respectivement responsables spécifiquement de l'ouverture et de la fermeture du translocon. En aigu, sur des îlots et des MIN6B1, nous avons dans un premier temps appliqué de la puromycine et observé une élévation de la fluorescence de la sonde Fura-2 AM dans le cytosol, signifiant que la puromycine induisait une vidange calcique réticulaire. Nous avons ensuite appliqué sur d'autres îlots de l'anisomycine, 30 minutes avant l'ajout de puromycine. L'effet de celle-ci était réduite de plus de 80%. Ces résultats montrent que la modulation du translocon participe à la régulation de la fuite calcique réticulaire. Nous avons en outre mesuré la vidange calcique réticulaire totale grâce à la thapsigargine. Celle-ci, en inhibant les Sercas, inhibe l'entrée du calcium dans le RE. Nous mesurons alors la fuite non inhibée

du calcium jusqu'à épuisement de celui-ci dans le RE. Lorsque la puromycine est appliquée avant la thapsigargine, la vidange induite par la thapsigargine est moindre, suggérant à nouveau que la puromycine a induit une sortie préalable du calcium à travers le translocon et que le taux de calcium réticulaire était plus faible lorsque la thapsigargine a été ajoutée. Enfin, l'anisomycine en prétraitement de 30 minutes inhibe les effets de la puromycine sur ceux de la thapsigargine. Les résultats étaient similaires dans nos deux modèles. Les îlots sont des structures composées de types cellulaires différents et l'utilisation ici d'une lignée bêta cellulaire montre que les réponses obtenues dans les îlots peuvent provenir des cellules bêta qui les composent. Ces résultats démontrent que le translocon est un canal de fuite calcique réticulaire fonctionnel dans les cellules bêta.

Les effets de la lipotoxicité sont en partie médiés par la perturbation de l'homéostasie calcique et notamment par la baisse de la concentration calcique réticulaire dans les cellules bêta (Cunha, Hekerman et al. 2008). Nous avons émis l'hypothèse que ces altérations, ainsi que la perte de fonction et le stress du RE associés, pourraient être liés à l'activité calcique du translocon. Nous avons aussi supposé qu'en conséquence, l'inhibition de celui-ci protégerait l'homéostasie calcique et les processus cellulaires en conditions de lipotoxicité. Nous avons choisi d'appliquer de l'anisomycine en chronique en conditions BSA contrôles et en conditions palmitate. La dose de palmitate a été choisie après des doses- et des temps-réponses, ainsi la concentration de 200 $\mu$ M durant 24h a été retenue pour les MIN6B1 et 500 $\mu$ M durant 48h pour les îlots humains. En effet, une dose de 200 $\mu$ M n'avait pas d'effets délétères sur les îlots, tandis qu'à 500 $\mu$ M durant 48h les îlots présentaient des altérations. L'anisomycine est un antibiotique, ainsi, à une dose suffisamment élevée, elle inhibe la traduction. Nous souhaitons utiliser une dose capable d'inhiber l'activité calcique du translocon sans modifier la traduction. Un test de dose-réponse nous a permis de conclure que les concentrations 200nM et 500nM d'anisomycine ne modifient pas l'expression protéique de l'actine et de la tubuline et qu'elles pouvaient être utilisées pour nos expériences.

Le palmitate induisait une altération de la fonction bêta cellulaire dans les MIN6B1 et les îlots humains avec une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (GSIS) de 28% et 41% respectivement. Il induisait aussi un stress du RE avec la surexpression des marqueurs GRP78, ATF4, ATF6 et CHOP en terme d'ARNm et GRP78, CHOP, la phosphorylation d'eIF2a et de JNK en terme de protéines pour les MIN6B1 et les ARNm de GRP78 et XBP1s pour les îlots humains. L'apoptose était plus élevée de 36% dans les MIN6B1 cultivées en présence de palmitate. Le palmitate n'induisait pas d'apoptose dans les îlots humains. Enfin, le palmitate réduisait le contenu calcique du RE et augmentait l'expression protéique de Sec61a dans les MIN6B1, une des protéines majoritaires du translocon, sans modification de l'expression des ARNm dans les MIN6B1 et les îlots humains. Ces résultats nous permettaient donc de poursuivre nos expériences pour étudier les effets potentiellement bénéfiques de l'anisomycine.

L'addition d'anisomycine prévenait partiellement la vidange calcique réticulaire dans les deux modèles. Ce résultat suggère donc que le translocon a une implication dans la fuite calcique du RE. Elle ne modifiait pas la surexpression protéique de Sec61a, ce qui montre son action au niveau de l'activité calcique du translocon et non de l'activité de traduction de celui-ci. L'anisomycine avait des effets différents selon le modèle utilisé. En effet, elle prévenait en partie du stress du RE dans les MIN6B1 en maintenant l'expression génique et protéique de GRP78 similaire au contrôle et en réduisant la surexpression d'ATF4. Elle n'améliorait pas l'expression de CHOP, ATF6, et la phosphorylation des protéines eIF2a et JNK. Dans les îlots humains, l'anisomycine n'avait pas d'effets significatifs sur le stress du RE. Par ailleurs, l'apoptose était plus faible en présence d'anisomycine dans les MIN6B1 cultivées avec du palmitate. Enfin, l'inhibition du

translocon permettait de prévenir la sécrétion d'insuline dans les îlots humains mais pas dans les MIN6B1. Il est important de noter d'une part que nous avons utilisé la concentration de 200nM d'anisomycine, qui avait une action spécifique sur le calcium mais pas sur le stress du RE et la sécrétion d'insuline, et d'autre part, qu'aux concentrations de 200nM et 500nM, il n'y avait pas de modification des paramètres mesurés en conditions contrôles.

L'ensemble de ces résultats montrent tout d'abord que le translocon participe de manière passive à la fuite calcique réticulaire de ces cellules. Ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur le fonctionnement de l'homéostasie calcique dans les cellules bêta en conditions physiologiques. L'étude du translocon nous a permis de mettre en évidence l'implication de celui-ci dans la réponse adaptative des cellules bêta à un environnement riche en palmitate.

Nous avons observé une réponse calcique au palmitate similaire entre les îlots humains et les MIN6B1 et une réponse différente en termes de stress du RE et de sécrétion d'insuline. En effet, si les voies GRP78 et CHOP étaient retrouvées toutes deux activées, les voies ATF4 et XBP1s n'étaient pas corrélées. D'autre part, les trois voies du stress du RE étaient activées dans les MIN6B1 tandis que seule la voie XBP1s l'était dans les îlots humains, sous réserve de l'expression d'ATF6 que nous n'avons pas mesurer. Cela suggère que les MIN6B1 répondent plus fortement au palmitate que les îlots humains et qu'il est possible que la modulation de ces voies ait des conséquences spécifiques dans la physiologie des cellules. L'apoptose, mesurée par le dosage de l'activité des caspases, est plus élevée dans les MIN6 cultivées avec du palmitate, mais pas dans les îlots humains. Le GSIS était altéré dans les deux modèles. Ainsi, quelques soient les niveaux de réponses en terme de stress du RE, les îlots humains et les MIN6B1 présentent des altérations fonctionnelles similaires. Par ailleurs, les réponses calciques réticulaires étaient semblables. Il semble donc qu'il y ait des adaptations identiques et différentes selon les mécanismes observés dans nos deux modèles. Nous faisons l'hypothèse que les adaptations identiques concernent des mécanismes qui constituent les réponses fondamentales des cellules bêta. L'homéostasie calcique serait ainsi un système intégrateur essentiel et potentiellement à l'origine de nombreux mécanismes d'adaptations cellulaires.

Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'inhibition du translocon par l'anisomycine dans ces conditions de lipotoxicité prévient de manière similaire la baisse du calcium réticulaire dans les îlots humains et les MIN6B1. Nous pouvons observer que l'amélioration du stress du RE n'est pas corrélée avec une amélioration du GSIS, puisque le stress du RE est réduit dans les MIN6B1 mais pas dans les îlots humains, et le GSIS est amélioré dans les îlots humains mais pas dans les MIN6B1.

Nous faisons l'hypothèse que les îlots humains sont moins sensibles au palmitate que les MIN6B1, en raison d'un stress du RE plus modéré et une absence d'apoptose. L'action de l'anisomycine dans ces conditions pourrait ainsi avoir plus de conséquences sur l'amélioration de la sécrétion d'insuline. Dans les deux modèles, l'anisomycine améliore la concentration calcique réticulaire, ce qui montre la spécificité de l'action de la molécule et ce, quel que soit l'intensité du stress induit. Cependant, la plus grande sensibilité des MIN6B1 empêcherait à l'anisomycine d'agir sur la sécrétion d'insuline car ses effets moduleraient d'abord le stress du RE et l'apoptose en prévenant des voies apoptotiques calcium-dépendantes telles que les voies des calpains (Huang, Gurlo et al. 2010).

Il est aussi possible de penser que l'augmentation du calcium dans le RE signe une amélioration globale de l'homéostasie calcique, la cellule bêta serait alors plus capable d'activer des voies de

signalisation calcium-dépendantes comme celles de l'exocytose et si la machinerie fonctionne de manière adéquate en amont – telle la conformation des protéines par le RE -, la sécrétion d'insuline serait alors plus importante.

Ces résultats montrent donc des niveaux de sensibilité et de régulations différentes entre les îlots humains et les MIN6B1. Il est intéressant de noter la dissociation entre stress du RE et homéostasie calcique et sécrétion d'insuline. En effet, il est souvent décrit dans la littérature que ces éléments sont étroitement liés (Cunha, Hekerman et al. 2008). C'est aussi le cas ici, mais l'amélioration de l'homéostasie calcique ne corrèle pas nécessairement avec une amélioration du stress du RE ou de la sécrétion d'insuline. Ce modèle d'étude pourrait ainsi permettre d'approfondir les mécanismes de chacun de ces éléments indépendamment des autres sur la fonction de la cellule bêta. Par ailleurs, un intérêt pourrait être porté à la fonction mitochondriale, impliquée dans la sécrétion d'insuline et les interactions calciques avec le RE, afin de déterminer si elle participe à ces résultats (Bravo, Vicencio et al. 2011).

Cette étude montre aussi que l'inhibition du translocon dans les cellules bêta pancréatiques prévient des altérations fonctionnelles induites par le palmitate. Si les effets préventifs ne s'appliquent pas forcément à tous les stress cellulaires en même temps, il apparaît que l'inhibition du translocon est une nouvelle voie d'étude potentielle dans la prévention et le traitement du diabète de type 2.

*Article 2 (soumis)*

---

## **Translocon inhibition protects pancreatic beta cell from lipotoxicity**

## Translocon inhibition protects pancreatic beta cells from lipotoxicity

R.Cassel<sup>1</sup>, S.Ducieux<sup>2</sup>, C. Berlé<sup>1</sup>, K. Burda-Jacob<sup>1</sup>, MA. Chauvin<sup>1</sup>, K. Chikh<sup>1</sup>, MR Alam<sup>2</sup>, C. Crola Da Silva<sup>2</sup>, J. Rieusset<sup>1</sup>, C. Thivolet<sup>1,3</sup>, F. Van Coppenolle<sup>2,4</sup>, AM. Madec<sup>1,4</sup>

1. Inserm UMR-U1060 CarMeN Laboratory, University Lyon 1, INRA U1235, INSA de Lyon, Facultés de médecine Charles Mérieux Lyon-Sud, F-69003 Lyon.

2. Inserm UMR-U1060 CarMeN Laboratory, University Lyon 1, INRA U1235, INSA de Lyon, Facultés de médecine Rockefeller, F-69003 Lyon.

3. Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon-Sud, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition, F-69310 Pierre Bénite.

4. These authors equally contributed to this work.

Corresponding author: Anne-Marie MADEC

Address: UMR INSERM U1060  
Faculté de médecine Lyon-Sud  
165 chemin du Grand Revoyet, BP12  
69921 Oullins cedex

Phone number: 33 (0)4 26 23 59 24, Fax: 33 (0)4 26 23 59 16

E-mail: [anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr](mailto:anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr)

Word counts:

Abstract: 246

Main text with legends: 3919

### ABSTRACT

*Aim/hypothesis* The endoplasmic reticulum (ER) regulates many cellular processes including the balance between cell survival and apoptosis. A long-term ER calcium depletion leads to cell death. This phenomenon occurs in pancreatic beta cells where free fatty acids (FFAs) are known to reduce ER calcium content and therefore trigger ER stress, apoptosis or cell dysfunctions. Nevertheless, the molecular mechanism by which calcium leaks from ER during lipotoxicity in pancreatic beta cells is still

unknown. We have therefore explored the role of translocon, one of the ER calcium leak channel, in palmitate-induced ER depletion in pancreatic beta cells.

*Methods* Both anisomycin and puromycin, a blocker and an opener of the translocon respectively, were used to assess the functional calcium activity of the translocon in human islets and MIN6B1 cells. Repercussions of anisomycin treatment were evaluated on beta cell alterations induced by palmitate.

*Results* Puromycin induced a significant ER calcium release, inhibited by anisomycin in both human islets and MIN6B1, demonstrating that the translocon is a functional ER calcium leak channel in beta cells. Palmitate reduced ER calcium content, induced ER stress and decreased insulin secretion in both models.. Interestingly, inhibition of translocon by anisomycin prevented reticular calcium depletion in both models, restored insulin secretion in human islets and partially prevented ER stress in MIN6B1.

*Conclusion* Translocon actively participates to the palmitate-induced ER calcium leak in beta cells. Its inhibition modulates lipotoxicity deleterious effects in beta cells, suggesting a new potential target for the treatment of type 2 diabetes.

**Key words:** calcium homeostasis, translocon, pancreatic beta cells, lipotoxicity, ER stress, diabetes.

## Abbreviations

ATF4: Activating transcription factor 4

ATF6: Activating transcription factor 6

ATP: Adénosin TriPhosphate

CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein HOmologous Protein

eIF2a: eucarotic Initiation Factor 2a

ER: endoplasmic reticulum

ERAD: ER Associated Degradation

FFA: Free Fatty Acid

GRP78: Glucose Regulated Protein 78

IP3R: IP3 Receptor

IRE-1a: Inositol-Requiring Protein 1

JNK: c-JUN N-terminal Kinase

PERK : Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase

ROS: Reactive Oxygen Species

SERCA: Sarco/Endoreticulum Calcium ATPase

Tg: thapsigargin

TRP: Transient Receptor Potential Channel

UPR: Unfolded Protein Response

XBP1: X-box binding protein 1

XBP1s: spliced X-box binding protein 1

## INTRODUCTION

Type 2 diabetes is a worldwide multifactorial disease characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic beta cell dysfunction (1, 2). Free fatty acid (FFA) levels are an independent predictor of future type 2 diabetes (3). High intake of saturated fatty acids (FFAs) has also been linked to higher risks of type 2 diabetes (4). Previous studies have shown that palmitate, the most abundant saturated FFA in blood, inhibits insulin signaling in liver, muscle, and fat cells *in vitro* (5-7). These studies have also shown the deleterious effects of FFAs, collectively termed “lipotoxicity”, on beta cells *in vitro* (8). Mainly based on the findings of *in vitro* studies, it was proposed that beta cell lipotoxicity is directly induced by palmitate at least in part via pathways involving endoplasmic reticulum (ER) stress and reactive oxygen species (ROS) (9, 10), inflammation (11) and autophagy (12). Similarly, prolonged *in vivo* infusion of FFAs impairs beta cell function in rodent models and in humans (13). However, molecular mechanisms by which FFAs induce beta cell dysfunction *in vivo* remain poorly understood.

Chronic exposure to saturated FFAs was shown to enhance the unfolded protein response (UPR) of ER. This phenomenon first protects the cells by promoting the folding of proteins in the ER lumen and/or their degradation by the 26S proteasome. On the contrary, a prolonged UPR could also trigger apoptosis if ER function is not preserved or restored (14-16). Due to high insulin protein production, beta cells are particularly susceptible to the activation of UPR and ER stress. Particularly, the phosphorylation of PERK and the induction of the transcription factor CHOP is a key feature for the saturated FFA-induced progression to apoptosis (17, 18). Relevance of these *in vitro* models to human disease was confirmed by the enhanced expression of ER stress markers in beta cells of type 2 diabetic patients (15, 16) and by the recent clinical trial of an ER stress reducing drug (phenylbutyric acid), which improved beta cell functions caused by prolonged hyperlipidemia (19).

The mechanisms by which saturated FFAs cause ER stress is thus a key question but remains unclear. ER stress is either due to the accumulation of unfolded proteins within the ER or the depletion of calcium store (20, 21), both leading to apoptosis. Calcium plays an important role in ER stress and in UPR, and the regulation of ER calcium homeostasis is closely linked to precise control of ER calcium leak channels permeability. Indeed, ER calcium concentration is an equilibrium between ER calcium entry through SERCA pumps and calcium leak via opened calcium leak channels. These channels, involved in ER stress transduction pathways, are not yet characterized in pancreatic beta cells. Gwiazda *et al.* pointed out a direct link between ER calcium decrease with ER stress in human islets and MIN6 murine beta cells (22). However, the molecular mechanisms of calcium dysregulation during ER stress in beta cells are still unknown. The modulation of ER calcium permeability during UPR could be useful to have a better understanding of ER calcium involvement in UPR in physiological and pathological conditions especially in type 2 diabetes.

In previous studies (23, 24), we have shown that translocon, a complex involved in protein translocation during translation (25), is an ER calcium leak channel in human cancerous prostatic cells. Recently, we further demonstrated that ER calcium depletion by thapsigargin (an inhibitor of SERCA pumps and an ER stress inducer) occurs mainly via translocon, which is also implied in the unfolded proteins retro-translocation for their degradation by the 26S proteasome (26). This process is called ERAD for ER-associated degradation (27). In parallel to ER protein retro-translocation through translocon, calcium may follow the same way. In this study, we investigated for the first time the functionality and the involvement of translocon in palmitate-induced alterations of both human pancreatic islets and murine beta cells. .

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Islet culture**

Human pancreatic islets from 8 non-diabetic donors (electronic supplementary material [ESM] Table 1) were obtained through the Geneva European Consortium for islet transplantation (ECIT) and Grenoble Cell Therapy Unit (UMTC). Islets were processed as described previously (28), and cultured in a DMEM medium containing 5.5 mmol/L glucose and 5% (vol./vol.) SVF. For treatments, islets were incubated with either BSA or palmitate/BSA (6:1, 500 µmol/L), in presence or absence of anisomycin (200 nmol/L or 500 nmol/L.)

### **MIN6B1 culture**

Murine beta cells MIN6B1 were cultured in DMEM medium containing 10% SVF, supplemented either with BSA or BSA/palmitate (6:1, 200 µmol/L), in presence or absence of anisomycin (200 nmol/L or 500 nmol/L).

### **Insulin secretion study**

At the end of the incubation period, GSIS was processed as previously described (28). Human insulin was quantified using a highly specific immuno-radiometric assay (IRMA) (Bi-insulin IRMA, Cis-Bio International, Gif sur-Yvette, France). Mouse insulin was quantified using a mouse insulin sensitive Elisa Kit (ALPCO, Salem, New Hampshire, USA).

### **Intracellular calcium measurements**

To measure intracellular calcium concentration dynamics, experiments were performed using the membrane-permeable calcium-sensitive dye fura-2 AM, as detailed previously (28).

Calcium response to chronic treatment of anisomycin (200 µmol/L) and/or puromycin (200 µmol/L) was obtained by culturing both MIN6B1 and human islets, in their respective cultured medium, during 24h. The concentrations used, in both acute and chronic conditions, are in accordance with those of our previous work (27). Anisomycin was added 30 min before puromycin stimulation.

### **Quantification of mRNAs**

Total mRNA samples were prepared as previously described (28). To monitor ER stress and translocon markers, we measured mRNA levels of glucose response protein 78 (GRP78), X-box binding protein-1 (spliced XBP1 and total XBP), activating transcription factor 4 (ATF4), activating transcription

factor 6 (ATF6), C/EBP homology protein (CHOP), and SEC61a. Values were normalized using TATA box binding protein mRNA (TBP). Primers are listed in ESM Table 2.

### **Western Blot analysis**

MIN6B1 cell proteins were processed as previously depicted (28). Following primary antibodies (1:1000) were used: anti-CHOP/GADD153 (sc-575, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), anti-GRP78, and anti-Sec61 $\alpha$  (ab108613, and Ab1327, Abcam, Paris, France) -eIF2 $\alpha$ , -peIF2 $\alpha$ , -JNK, and anti-pJNK (ab9722, ab9721S, ab9252, ab9251S, Cell Signaling, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Secondary horseradish peroxidase antibodies (1:10,000, Bio-Rad, California, USA) were revealed by using both the Luminata Forte reagent (Western HRP Substrate, Merck-Millipore, Molsheim, France) and the Chemi Doc XRS machine (Bio-Rad). Quantification was performed with the Image Lab software (Bio-Rad).

### **Caspase activation**

Caspase [2 to 10] activation was measured with the Homogeneous Caspases Assay (Roche Diagnostics, Manheim, France), following the manufacturer instructions. Human islets or MIN6B1 cells were cultured in black-walled-96-well microplates. At the end of treatment, free Rhodamine-110 concentrations were next determined in a plate-reading luminometer.

### **Statistical analysis**

Data are given as means  $\pm$  SEM. Comparisons were performed by *t*-test or by ANOVA, Fisher's exact test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. Origin computer program (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) was used for calcium concentration curve generation and statistical analysis.

## RESULTS

We used both anisomycin and puromycin to respectively close and open translocon. As anisomycin is an antibiotic that inhibits protein translation at high concentration, we verified by dose-dependent assay that it does not inhibit protein synthesis in our conditions. Anisomycin did not affect protein translation until 0.5  $\mu\text{mol/L}$  and reduced it by more than 50% at 1 and 2  $\mu\text{mol/L}$  (ESM Fig.1).

### Translocon is functionally involved in beta cell calcium homeostasis

ER is a major internal calcium storage organelle in beta cells, which acts as a calcium buffer that regulates calcium-dependent signaling in the cytosol and ER chaperone activity. As we hypothesized that translocon could be involved in global calcium homeostasis of beta cell as an ER calcium leak channel, we first measured puromycin action on ER calcium content. Cytosolic calcium was thus evaluated using the ratiometric Fura-2 AM probe, each ER calcium release would be seen by an increase of the Fura-2 AM ratio signal. In human islets, puromycin induced an increase in cytosolic calcium concentration. This effect was partly abolished by a 30 min pretreatment with anisomycin (Fig.1A,1C).

We next investigated the reticular calcium pool by comparing the amplitude of calcium peak obtained after adding thapsigargin (Tg) (a SERCA inhibitor) in a calcium-free medium, with puromycin (200 $\mu\text{M}$ ) and/or 30 minutes pretreatment with anisomycin (200 $\mu\text{M}$ ) of human islets and MIN6B1. Tg elicited a transient cytosolic calcium increase in human islets (Fig.1B,1D). Puromycin pretreatment significantly reduced Tg-induced ER calcium release as compared to control conditions (Fig.1B,1D). Anisomycin alone was ineffective in Tg response (Fig.1B,1D). Puromycin, combined with anisomycin, failed to decrease Tg response (Fig.1B,1D). These results suggest that puromycin pretreatment partly depletes ER calcium content via opening of the translocon. We finally verified the impact on the resting calcium concentration and found that the basal calcium level remained similar to control conditions in human islets, whatever were the pretreatments (Fig.1E). Next, we performed similar experiments in MIN6B1 cells, and found that puromycin also induced an ER calcium release which was inhibited by anisomycin pretreatment (Fig.1F, 1H). Resting calcium concentrations were not affected by the different pretreatments (Fig.1J). As observed in human islets, the Tg-induced ER calcium release was significantly decreased by puromycin pretreatment as compared to control conditions (Fig.1G,1I). On the contrary, anisomycin alone, or combined with puromycin increased Tg response (Fig.1G,1I). These data highlight the fact that puromycin pretreatment induced a first ER calcium release which was inhibited by anisomycin.

Altogether, these results clearly illustrated that translocon is a functional ER calcium leak channel in both human islets and MIN6B1 cells.

### Translocon inhibition prevents palmitate-induced reticular calcium depletion

As palmitate is an ER stress inducer in beta cells, we wanted to know if pharmaceutical modulation of translocon opening could modify ER calcium content in a long-term manner in both control and palmitate-treated conditions. To establish the characteristics of the intracellular calcium pools, we first analyzed the resting concentration in cytosol, in both human and murine cells exposed to palmitate with

or without anisomycin. We observed that chronic treatment (24h) with palmitate did not modify resting calcium compared to control conditions in both human islets and MIN6B1 cells (Fig.2A,2C). Chronic addition of anisomycin did not alter resting calcium in control condition in human islets (Fig.2A) and mildly enhanced it in MIN6B1 (Fig.2C). Resting calcium in human islets exposed to palmitate and anisomycin was similar compared to palmitate condition (Fig.2A,2C). After Tg stimulation, reticular calcium concentration was reduced in both human islets and MIN6B1 exposed to chronic palmitate treatment (Fig.2B,2D). Addition of anisomycin partially restored reticular calcium content in both models (Fig.2B,2D). Anisomycin did not modify ER calcium content in basal conditions (Fig.2B,2D).

### **Palmitate increases SEC61 $\alpha$ protein expression**

The translocon complex consists of several protein complexes, one of which is called the Sec61 complex and served as the channel pore. Here, we verified whether palmitate and/or anisomycin treatments altered the Sec61 $\alpha$  expression at mRNA and/or protein levels. Palmitate did not modify SEC61 $\alpha$  mRNA expression neither in human islets (Fig.3A) nor in MIN6B1 cells (Fig.3B), but it significantly increased SEC61 $\alpha$  protein expression in MIN6B1 cells compared to basal conditions (Fig.3C,3D). Anisomycin alone or in combination with palmitate did not modify SEC61 $\alpha$  protein expression in MIN6B1 cells (Fig.3C,3D). These data suggest that the anisomycin capacity to restore ER calcium content under palmitate stress could not be attributed to major variations in the translocon expression.

### **Translocon inhibition modulates palmitate-induced ER stress**

As palmitate is a source of ER stress in beta cells, we investigated the capacity of anisomycin to reduce the ER stress in pancreatic beta cells in response to palmitate.

Human islets cultured with palmitate showed a significant increase of both GRP78 (Fig.4A) and XBP1s (Fig.4D) mRNA levels. A non-significant increase was also observed for CHOP in palmitate-treated islets (Fig.4B), whereas ATF4 was not modified (Fig.4C). Anisomycin had no effects on ER stress marker mRNA expression in basal or palmitate conditions in human islets (Fig.4A-D).

As shown in Fig.4 E-I, palmitate significantly induced ER stress marker mRNA expression in MIN6B1 cells. In addition, palmitate increased protein expression of GRP78 (Fig.5A,5E) and CHOP (Fig.5D,5H), as well as the phosphorylation of both eIF2 $\alpha$  (Fig.5C,5G) and JNK (Fig.5C,5G). Interestingly, the translocon inhibition by anisomycin partially prevented palmitate-induced ATF4 mRNA induction (Fig.4G) and restored GRP78 protein expression (Fig.5A,5E). However, anisomycin had no effect on these markers (Fig.4,5), and on eIF2 $\alpha$  (Fig.5B,5F) and JNK phosphorylation (Fig.5C,5G), in basal conditions and on CHOP protein expression (Fig.5D,5H) in response to palmitate (Fig.5F,5H).

### **Anisomycin significantly reduced palmitate-induced caspase activation**

To assess survival of cells, we next evaluated caspase activity via free Rhodamine-110 measurement in both human islets and MIN6B1 cells cultured in BSA or palmitate conditions. No caspase activation was significantly induced by palmitate in the tested set of human islets in our culture conditions (Fig.6A) and anisomycin treatment did not modify caspase level in both basal and palmitate

conditions (Fig.6A). However in MIN6B1 cells, palmitate triggered an increase of caspase activation (Fig.6B), which was partially reduced by anisomycin treatment (Fig.6B).

### **Anisomycin restores GSIS in palmitate condition in human islets**

We finally measured the beta cell function in our conditions. Palmitate reduced significantly the glucose stimulated insulin secretion (GSIS) in both human islets (Fig.7A) and MIN6B1 cells (Fig.7B). Interestingly, the translocon inhibition by anisomycin treatment prevented the palmitate-induced dysfunction of human islets (Fig.7A), but not of MIN6B1 (Fig.7B).

## **DISCUSSION**

In type 2 diabetes, prolonged exposure to FFAs contributes to both insulin resistance and beta cell dysfunction (29, 30). These data are reinforced by the last results from the large longitudinal prospective study of the EPIC-InterAct case-cohort showing a positive association between plasmatic palmitic acid with incident type 2 diabetes (31). Saturated FFAs, either through oversupply or inappropriate metabolism in the beta cells appear to be one of the primary triggers, but the molecular mechanisms remain poorly understood (32). This lipotoxicity is associated with ER calcium depletion and ER stress (33). An increase in ER calcium efflux first depletes the stores, secondly induces ER stress and finally triggers apoptosis (34). There is so a need to identify by which pathways calcium leaks from the ER of pancreatic beta cells submitted to lipotoxicity in order to find out drugs to restore ER calcium homeostasis. In addition, knowledge of modulation of ER calcium efflux during lipotoxicity would be useful for a better understanding of the ER calcium involvement in type 2 diabetes. This current study provides several important advances in this context.

In a previous work, we have shown that translocon is an ER calcium leak channel involved in ER calcium depletion in human cancerous prostatic cells in ER stress conditions (25). TLC is an ubiquitous multiproteic complex also involved in protein translation and protein retro-translocation from the ER lumen to the cytosol, to be addressed to their target location. Accumulation of unfolded proteins leads to ER stress and UPR. These unfolded protein are retro-translocated from the ER lumen to the cytosol, through the translocon, and degraded by the proteasome (35, 36). ER stress is largely investigated currently in the literature and is shown to be central in a lot of cells integrated answers to glucolipotoxicity (37). Furthermore, GRP78, under resting conditions, binds to the luminal part of ER membrane proteins like IRE1, PERK and ATF6, involved in UPR pathway (for review, see 10). GRP78 is also known to seal the pore of the translocon (38) and so possibly inhibits ER calcium leak. Upon unfolded protein accumulation and during ER stress, GRP78 is released from IRE1 $\alpha$ , PERK, ATF6 and then triggers the UPR response and probably enhance ER calcium depletion.

In the present work, we hypothesized that the translocon could be one of the ER calcium leak channel involved in ER calcium depletion in pancreatic beta cells in lipotoxic conditions. We found that its inhibition prevents beta cell ER function through calcium homeostasis maintenance, with a differential impact on insulin secretion in MIN6B1 and human islets. These points are in accordance with the fact that mutation of Sec61 $\alpha$ 1 is responsible for type 2 diabetes (39).

ER calcium concentration is an equilibrium between calcium entry through SERCA pumps and passive calcium leak. We demonstrated that translocon acts as a functional ER calcium leak channel in pancreatic beta cells by measuring in MIN6B1 and human islets a significant ER calcium depletion in response to acute perfusion of puromycin, which was abrogated by anisomycin. Anisomycin and puromycin did not modify the resting calcium concentration in the both models.

ER calcium homeostasis is involved in many cellular functions like ER stress and apoptosis in beta cells (40). So, we first measured the long-term effects of palmitate on ER calcium content and the putative ability of anisomycin to maintain ER calcium homeostasis and beta cell function. In both human islets and MIN6B1, palmitate induced an ER calcium decrease and anisomycin partially prevented ER calcium stores. The translocon appears as an ER calcium leak channel involved in calcium depletion during palmitate-induced toxicity. This result is in accordance with our data obtained on LNCaP cells (25).

To go further, we next measured the action of anisomycin on SEC61 $\alpha$ 1 expression. Recently, Cnop and al. (41) examined the transcriptome of human islets submitted to palmitate. Among all the genes studied, expression levels of transcripts for Sec61 $\alpha$ 1 and GRP78 were enhanced, highlighting the importance of translocon in lipotoxic islets. In our study, we did not notice an enhancement of the amount of mRNA for SEC61 $\alpha$ 1 whatever the experimental conditions, but an increase at protein level under palmitate condition in MIN6B1 cells. This rise of expression was not abolished by anisomycin. The increase in SEC61 $\alpha$ 1 could participate to a greater ER calcium leak under palmitate conditions.

We investigated the other arms of ER stress. Human islets and MIN6B1 cells were cultivated in mild palmitate conditions to mimic first phase of type 2 diabetes (29,30,42). The both models showed an ER stress with overexpression of GRP78, known to allow UPR. In MIN6B1 cells, IRE1 $\alpha$ , ATF6 and PERK pathways were activated, with induction of the proapoptotic CHOP pathway, whereas only XBP1s was significantly enhanced in human islets. These results indicate that the UPR activated pathways are differentially activated in response to palmitate, with a more elicited effect in MIN6B1 cells. In agreement, a study on lipotoxicity-induced ER stress showed that mild palmitate doses activated preferentially some pathways rather than others in MIN6 cells (43). In MIN6B1 cells, the entire PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4-CHOP pathway was mobilized. Moreover JNK phosphorylation was also enhanced in these cells. As described in the review from Prause M et al. (44), CHOP and JNK phosphorylation activations drive cells to apoptosis, directly or by caspases activation. We confirmed this by measuring an increase in caspase activity in MIN6B1. However, we observed that both CHOP pathway and caspases were not activated in human islets, confirming that palmitate-induced ER stress was more moderate, as observed in the first phase of type 2 diabetes.

Anisomycin reduced GRP78 overexpression and prevented increase of ATF4 in both human islets and MIN6B1 cells and, without any effect on palmitate induced overexpression of CHOP. These data reveal that translocon inhibition is able to prevent from several arms of ER stress triggered by lipotoxicity and is sufficient to reduce palmitate-induced activation of caspases in MIN6B1. This suggests that prevention of apoptosis mediated by anisomycin may be independent of CHOP. Partial reduction of the ER stress is not sufficient to decrease CHOP expression although interestingly ATF4 was reduced at both mRNA and protein levels in MIN6B1, independently of eIF2 $\alpha$  phosphorylation and CHOP decreases. To our knowledge, this is an original description of ER stress modulation and need further investigations. Anisomycin inhibition of ER calcium depletion suggest that cell death of beta cells, due to lipotoxicity, should be mainly triggered by ER calcium depletion rather than an increase in cytosolic calcium concentration, as described in other models (45). Indeed, we did not notice any increase in cytosolic calcium concentration in cells treated with palmitate and anisomycin.

Palmitate is also known to inhibit glucose-induced insulin release (46). As expected, palmitate reduces GSIS in both human islets and MIN6B1 cells. In this study, we further observed that anisomycin

partially prevented ER calcium depletion in both models. Therefore, restorations of ER calcium homeostasis should allow suitable insulin secretion in response to glucose and ER calcium liberation (28,37). This was confirmed in human islets where beta cell function was protected from deleterious effects of lipotoxicity in presence of anisomycin. However, anisomycin did not restore insulin secretion in MIN6B1, despite a similar calcium effect than in human islets. These results suggest that human islets may be more sensitive to translocon inhibition under these conditions perhaps due to a milder ER stress than in MIN6B1 most engaged in apoptosis way. Recent studies suggested that whether calcium and ER function are tightly linked, there are possibilities for independent actions in pancreatic beta cells (43).

To our knowledge, this is the first study to show that the translocon is implicated in both the global calcium homeostasis in pancreatic beta cells, and in lipotoxicity-induced beta cell loss function. Its inhibition resulted in improved calcium homeostasis and beta cell function in human islets. Taken together, these results suggest that the control of calcium homeostasis by translocon inhibition could be a new strategy for preventing or treating type 2 diabetes as a part of combinatorial approaches that might be required to preserve or restore beta cell function as recently concluded in Consensus Statement on type 2 diabetes (47).

## LEGENDS

**Fig.1: Puromycin and anisomycin acute effects on calcium homeostasis in human islets and MIN6B1.** Typical cytosolic calcium traces in response to 200  $\mu$ M puromycin (A,F) or to 1  $\mu$ M thapsigargin (B,G) under control conditions and after 30 min incubation with 200  $\mu$ M anisomycin. (C,H) Cumulative data of peak cytosolic calcium increases evoked by puromycin responses under control conditions and with anisomycin 200  $\mu$ M. (D,I) Cumulative data of peak cytosolic calcium increases evoked by thapsigargin responses and (E,J) resting fluorescence (F340/F380) under control conditions  $\pm$  puromycin or anisomycin pretreatment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . N=44 from 4 different human donors; N= 51-82 at least from 4 independent MIN6 cultures; preparations in duplicate.

**Fig.2: Chronic effects of palmitate and anisomycin treatments on calcium homeostasis.** Quantification of fluorescence ratio (F340/F380) of resting calcium and of reticular calcium release induced by 1  $\mu$ M thapsigargin in (A,B) human and (C,D) MIN6B1 cells under BSA (white bar) and palmitate (black bar) conditions  $\pm$  anisomycin (hatched bars). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . N=44 from 4 different human donors; N=33-44 at least from 3 independent MIN6 cultures; preparations in duplicate.

**Fig.3: Palmitate increased SEC61a expression in MIN6B1.** SEC61a mRNA (A,B) and protein (C,D) expressions were evaluated after treatment with BSA (white bar) or palmitate (black bar)  $\pm$  anisomycin (hatched bars), in (A) human islets (n=3-5) and (B,D) MIN6B1 (n=3-8). (C) Western Blot from a representative experiment. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**Fig.4 : Translocon inhibition modulated palmitate-induced ER stress in MIN6B1.** ER stress mRNA expression markers were measured after BSA (white bar) or palmitate (black bar) ± anisomycin (hatched bars) treatment in human islets (A-D; n=3-6) and MIN6B1 (E-I; n=3-12). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Fig.5 : Anisomycin partially counteracted palmitate-induced ER stress in MIN6B1 protein expression.** ER stress protein expression markers (A-H) were measured in MIN6B1 cultured with BSA (white bar) or palmitate (black bar) ± anisomycin (hatched bars), (n=3 to 9). (A-D) Western blot from respective representative experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Fig.6 : Anisomycin reduced significantly apoptosis induced by palmitate in MIN6B1.** Apoptosis was evaluated (A) in human islets (n=4) and (B) in MIN6B1 (n=9) under BSA (white bar) or palmitate (black bar) treatment ± anisomycin (hatched bars) by a homogeneous fluorimetric caspases assay. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Fig.7 : Anisomycin restored GSIS in palmitate condition in human islets.** GSIS were measured after BSA (white bar) or palmitate (black bar) treatment ± anisomycin (hatched bars) in (A) human islets (n=6) and (B) MIN6B1 (n=9). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## ACKNOWLEDGMENTS

Human islets were provided through the JDRF award 31-2008-413 (ECIT Islet for Basic Research program; T. Berney, D. Bosco) from the Geneva University Hospital and from the Mixed Unit of Cell Therapy (UMTC; V. Persoons) from Grenoble university Hospital. We thank the genomic platform (E. Meugnier, E. Loizon, S. Pesanti) from INSERM UMR-1060 CARMEN.

Preliminary reports of these findings have previously been published in abstract form (48,49) and reported at the 49<sup>th</sup> EASD meeting in Barcelona in 2013 and at the 74th ADA meeting in San Francisco in 2014.

## **FUNDINGS**

**This work was supported from both INSERM and University Claude Bernard Lyon1 (UCBL).**

## **DUALITY of INTEREST**

**The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.**

## **CONTRIBUTORS STATEMENTS**

RC, SD, FVC and AMM designed the study, researched data, contributed to discussion, and wrote the manuscript. CB, KBJ, MAC, KC, MRA and CCDS researched data. JR and CT contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript. All authors contributed to the discussion and revised the manuscript and all approved the final version. FVC and AMM are responsible of the integrity of the work as a whole.

## REFERENCES

1. Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802–1812
2. Kahn SE (2003) The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46;3-19
3. Charles MA, Eschwege E, Thibault N, et al. (1997) The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 40;1101–1106
4. Riserus U, Willett WC, Hu FB (2009) Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res* 48;44-51
5. Dey D, Pal BC, Biswas T, et al. (2007) Lupinoid prevented fatty acid induced inhibition of insulin sensitivity in 3T3 L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem* 300;149–157
6. Hommelberg PP, Plat J, Langen RC, et al. (2009) Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296;E114–E120
7. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, et al. (2009) Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 284;4809–14818
8. Weinberg JM. Lipotoxicity (2006) *Kidney Int* 70;1560–1566
9. Cnop M (2008) Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 36;348–352
10. Fonseca SG, Gromada J, Urano F (2011) Endoplasmic reticulum stress and pancreatic b-cell death. *Trends Endocrinol Metab* 22;266–274
11. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, et al. (2012) Saturated fatty acid and TLR signaling link b-cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metabolism* 15;518–533
12. Martino L, Masini M, Novelli M, et al. (2012) Palmitate Activates Autophagy in INS-1E b-Cells and in Isolated Rat and Human Pancreatic Islets. *PLoS ONE* 7;e36188
13. Giaccia A, Xiao C, OPrescu AI, et al. (2010) Lipid-induced pancreatic b-cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 200;E255-E262
14. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, et al. (2004) Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145;5087-5096
15. Back SH, Kaufman RJ (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81;767-793
16. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M (2008) The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29;42-61
17. Akerfeldt MC, Howes J, Chan JY, et al. (2008) Cytokine-induced beta-cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling. *Diabetes* 57;3034-3044
18. Song B, Scheuner D, Ron D, et al. (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
19. Xiao C, Giaccia A, Lewis GF (2011) Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes* 60;918-24
20. Matus S, Glimcher LH, Hetz C (2011) Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol* 23;239-252
21. Gorlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75;615-630
22. Gwiazda KS, Yang TL, Lin Y, et al. (2009) Effects of palmitate on ER and cytosolic calcium homeostasis in beta cells. *AJP Endocrinol and Metab* 296;E690-701
23. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, et al. (2004) Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117;4135-4142
24. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, et al. (2006) Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *Faseb J* 20;1215-1217
25. Gorlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75;615-630

26. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, et al. (2013) Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J* 27;1600-1609
27. Hoseki J, Ushioda R, Nagata K (2010) Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* 147;19-25
28. Madec AM, Cassel R, Dubois S, et al. (2013) Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway. *FASEB J* 27;5122-5130
29. Kahn SE, Hull R L, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444;840-846
30. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN (2011) Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 60;2441-2449
31. Nita G Forouhi, Albert Koulman, Stephen J Sharp, et al. (2014) Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* S2213-8587(14)70146-9
32. Kuminski CM, Shetty S, Orci L, et al. (2009) Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis* 14;1484-1495
33. Cnop M, Ladrière L, Igoillo-Estève, et al. (2010) Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic b-cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2;76-82
34. Hara T, Mahadevan J, Kanekura L, et al. (2014) Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to b-cell death. *Endocrinology* 155;758-768
35. Crowley KS, Liao S, Worell VE, et al. (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78;461-471
36. Swanton E, Bulleid NJ (2003) Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Membr Biol* 20;99-104
37. Poitout V, Robertson RP (2008) Fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29;351-366.
38. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, et al. (2005) The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168;389-399
39. Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N (2010) A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes* 59;228-235
40. Michalak M, Robert Parker JM, Opas M (2002) Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell calcium* 32;269-278
41. Cnop M, Abdulkarim B, Bottu G, et al. (2014) RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* 63;1978-93
42. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, et al. (2008) Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic b-cells. *J Cell Science* 121;2308-2318
43. Boslem E, MacIntosh G, Prestong AM, et al. (2011) A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 b-cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J* 435;267-276
44. Prause M, Christensen DP, Billestrup N, et al. (2014) JNK1 protects against glucolipotoxicity-mediated beta-cell apoptosis. *Plos One* 9;e87067
45. Huang CJ, Gurlo T, Haataja L, et al. (2010) Calcium-activated calpain-2 is a mediator of beta cell dysfunction and apoptosis in type 2 diabetes. *J Biol Chem* 385;339-348
46. Hoppa MB, Collins S, Ramracheya R, et al. (2009) Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of calcium channels from secretory granules. *Cell Metabolism* 10;455-465
47. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, et al. (2014) Beta-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 99 ;1983-1992
48. Cassel R, Van Coppenolle F, Ducreux S, et al. (2013) The translocon, a functional reticulum leak channel in human islets: towards a new way of protecting pancreatic beta cells from lipotoxicity. *Diabetologia* 56 (Suppl. 1);S218
49. Cassel R, Van Coppenolle F, Ducreux S, et al. (2014) Protection of beta cells from lipotoxicity by modulation of translocon. *Diabetes* 63 (Suppl. 1):A458

Figure 1

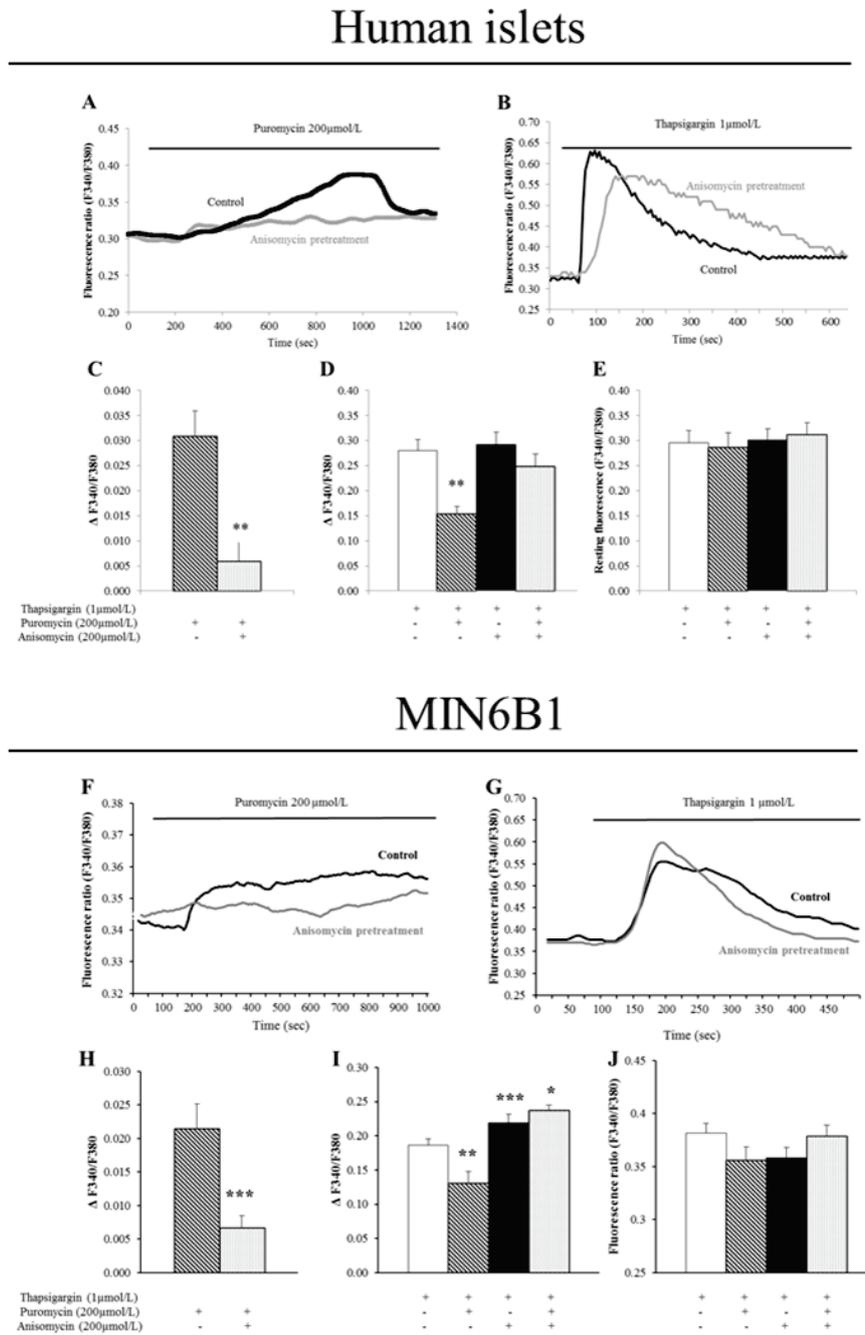


Figure 2

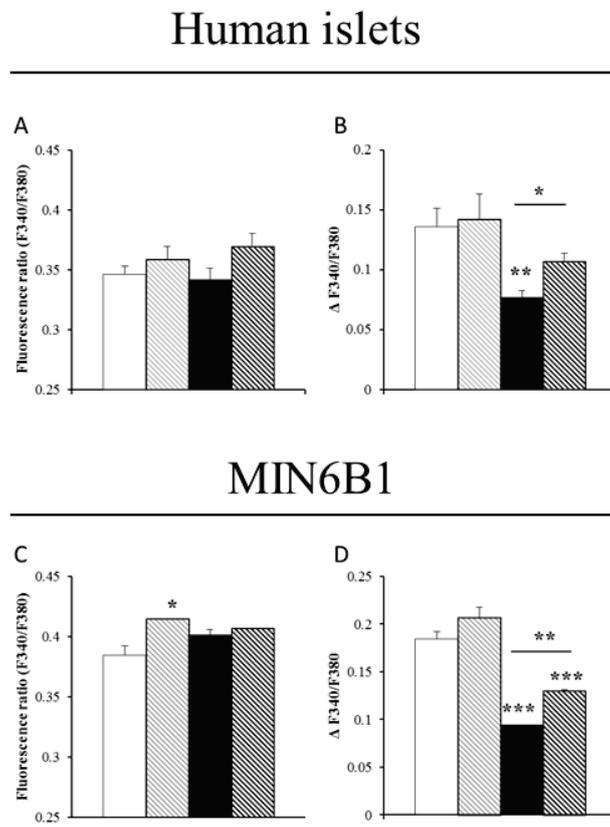


Figure 3

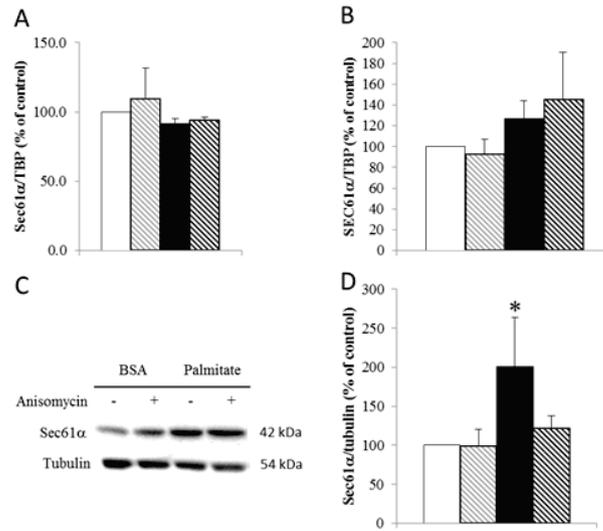
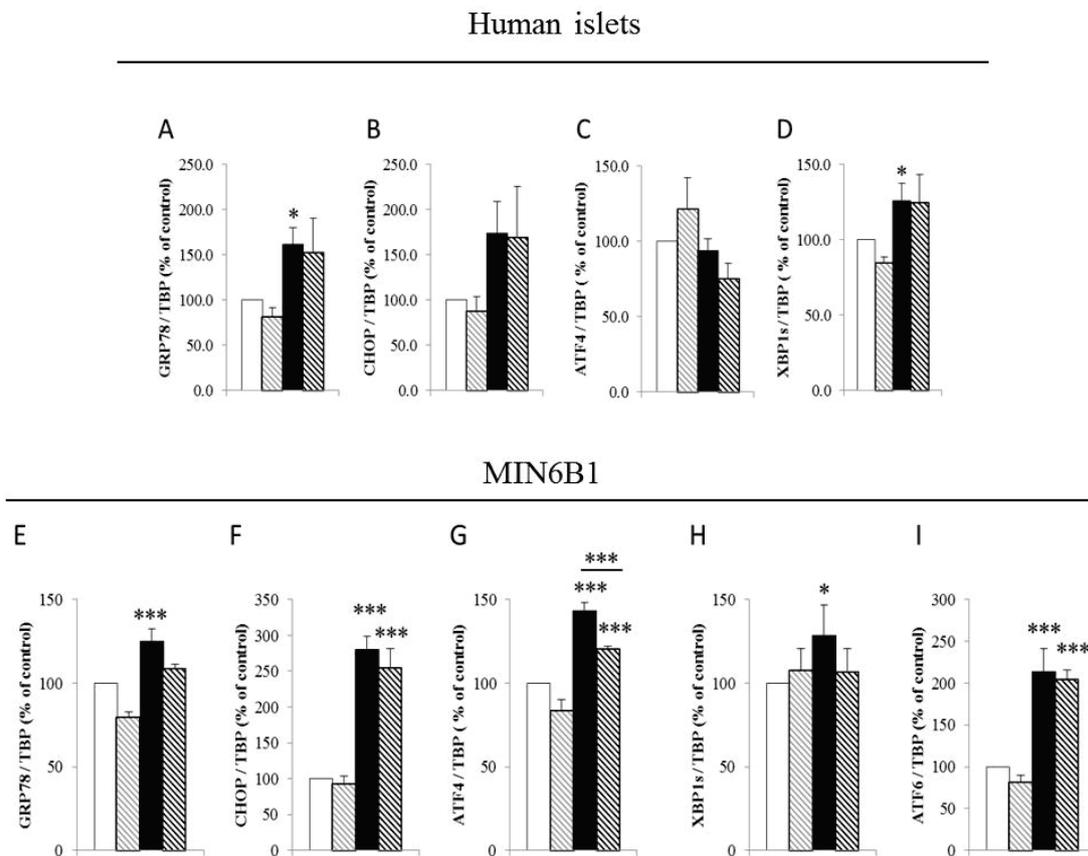


Figure 4



**Figure 5**

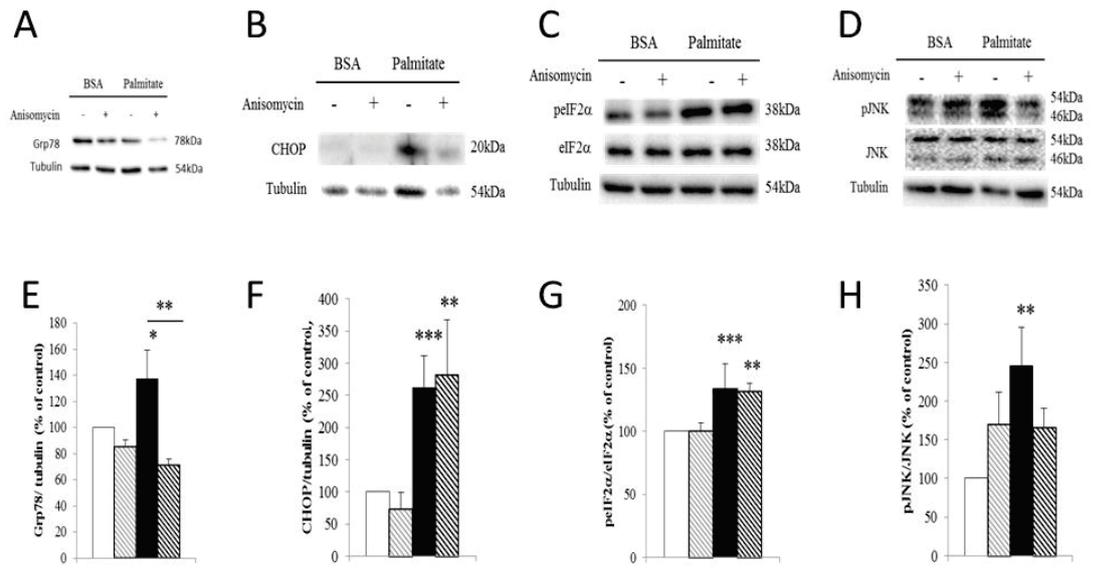


Figure 6

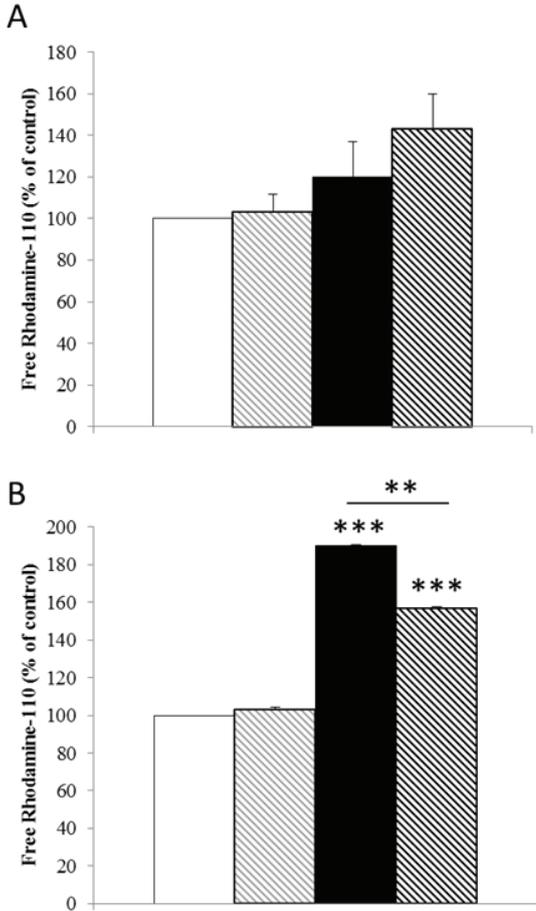
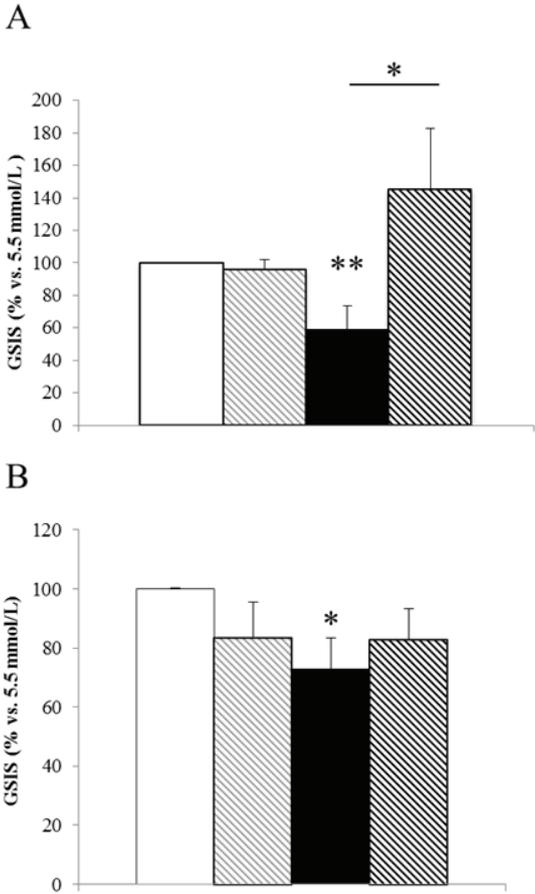
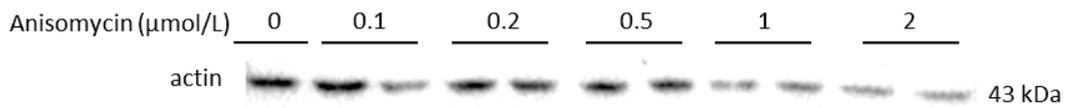


Figure 7

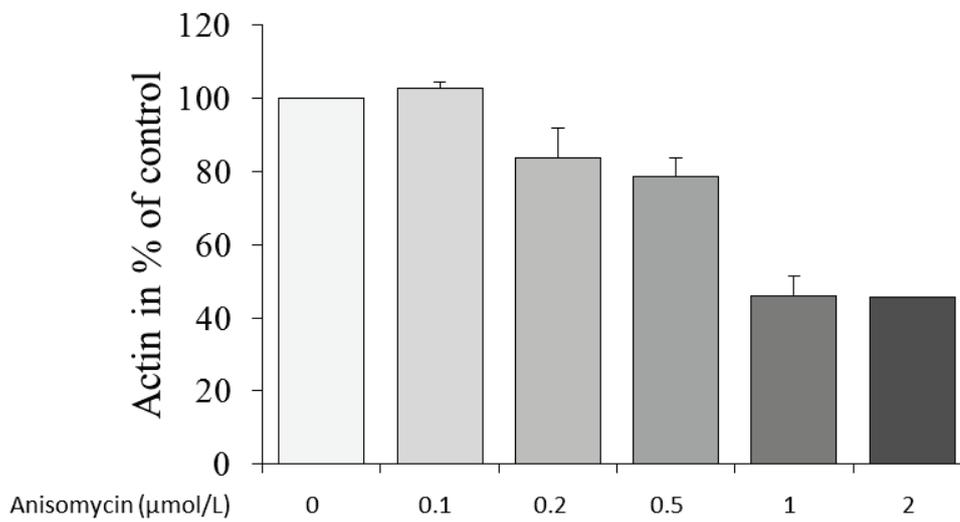


## Figure supplémentaire 1

A



B



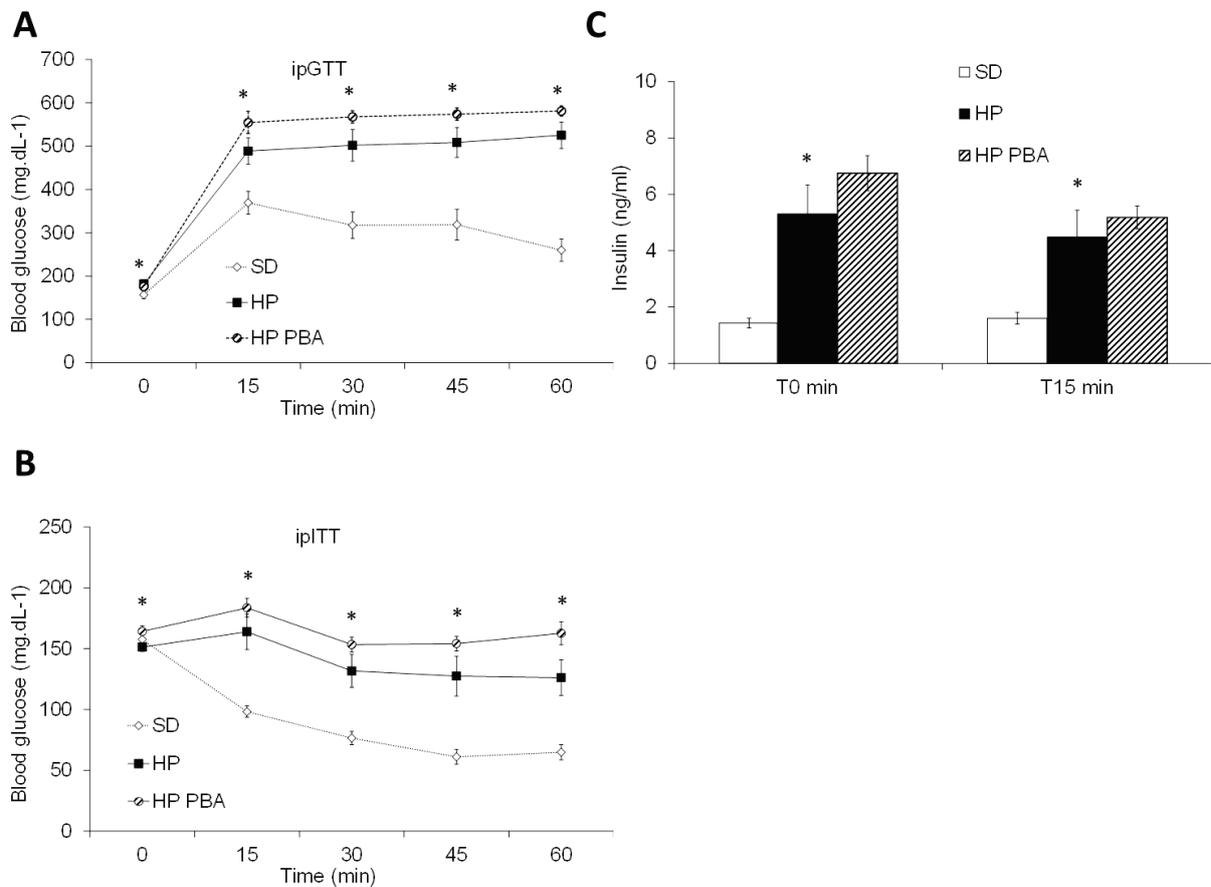
## 2.2.2 Etude *in vivo* : travaux préliminaires

---

### **Perturbations métaboliques chez des souris nourries avec une diète enrichie en palmitate**

Dans une étude *in vivo* réalisée avec Guillaume Vial, nous montrons que nourrir des souris pendant 16 semaines avec une nourriture enrichie de 20% en huile de palme entraîne une intolérance au glucose, une insulino-résistance et une hyperinsulinémie corrélée avec une augmentation de la sécrétion d'insuline (figure 26 A, B, C), sans induction d'un stress du RE ou d'une dysfonction mitochondriale (résultats non présentés ; article en préparation). Les effets du 4-phénylbutyrate (4-PBA), un inhibiteur du stress du RE ne seront pas discutés ici. Nous en avons conclu que l'huile de palme est capable d'induire des modifications métaboliques importantes, mais que le seul changement de ce paramètre n'est pas suffisant pour induire un diabète de type 2. Nous faisons l'hypothèse que le palmitate était pris suffisamment en charge par les tissus métaboliques pour ne pas induire d'élévation de la sécrétion d'insuline ni une dysfonction bêta cellulaire mais pas suffisamment pour maintenir normale la glycémie. Cette hypothèse est appuyée par des travaux montrant que c'est plutôt la modification de la composition lipidique globale qui est à l'origine des pathologies plutôt que la modification d'un seul lipide (Stein, Stevenson et al. 1997). Elle est aussi en concordance avec le fait que l'incidence du diabète de type 2 est corrélée avec l'augmentation concentration de certains acides gras libres dans le sang dont le palmitate (Forouhi, Koulman et al. 2014).

Pour approfondir notre étude *in vitro* sur les effets protecteurs de l'inhibition du translocon sur les cellules bêta, nous souhaiterions traiter avec de l'anisomycine des souris nourries avec une diète riche en palmitate comparée à des souris soumises à une diète riche en lipides ou des souris ob/ob afin d'étudier les paramètres métaboliques et la fonction des îlots de ces souris.



**Figure 26** : Evaluation des paramètres métaboliques de souris nourries 16 semaines avec un régime riche en palmitate (+20%). (A) Test de tolérance au glucose (ipGTT : Glucose tolérance test) qui montre une élévation de la glycémie plus importante en réponse au glucose chez des souris nourries avec une diète enrichie en palmitate avec ou sans 4-PBA comparée aux souris contrôles. (B) Test de tolérance à l'insuline (ipITT : Insulin tolérance test) qui montre une diminution de la glycémie en réponse à l'insuline moindre dans les souris nourries avec une diète enrichie en palmitate avec ou sans 4-PBA comparée aux souris contrôles. (C) Insulinémie à T0 et T15 minutes après injection de glucose au cours du test de tolérance au glucose. Les souris nourries avec un régime enrichie en lipides avec ou sans 4-PBA présentent une insulinémie plus élevée à T0 et T15 minutes que chez les souris contrôles.

### 3. Conclusion générale

L'homéostasie est le résultat d'une régulation fine de tous les paramètres de l'organisme. Nos mécanismes métaboliques sont parfaits en ce sens qu'ils sont aptes à fonctionner de manière autonome et en adéquation avec les variations de l'environnement si on leur donne ce dont ils ont besoin et s'ils ne sont pas atteints d'une mutation génétique réduisant leurs capacités à maintenir l'homéostasie. L'alimentation est ainsi un des facteurs clefs de la vie, comme le souligne Hippocrate dans sa phrase : « Nous sommes ce que nous mangeons. » Hippocrate avait donc déjà noté en son temps l'importance de l'alimentation dans les processus physiologiques du corps.

Le taux de glucose dans le sang est un des paramètres hautement régulés dans l'organisme. En effet, le glucose est le substrat énergétique de la plupart des cellules du corps. L'insuline, produite par les cellules bêta des îlots de Langerhans, est la seule hormone capable de réguler la glycémie en augmentant la capture du glucose par les tissus comme le foie, le muscle et le tissu adipeux (Rizza, Mandarino et al. 1981). Ces cellules ont une fonction particulièrement importante pour l'organisme et nécessitent à la fois un environnement adéquat à leur activité.

A cette fin, les cellules bêta pancréatiques bénéficient au sein de l'îlot d'un microenvironnement très favorable au contact permanent avec le système sanguin et les éléments circulants comme le montre son hypervascularisation (Cabrera, Berman et al. 2006). Cette propriété les rend très efficaces dans la détection de la moindre variation d'un de ses paramètres et dans la sécrétion d'insuline en réponse à cette variation. Les cellules bêta sont très sensibles aux nutriments, comme le glucose et les lipides. Elles sont capables de sécréter une grande quantité d'insuline lors de l'élévation de ces deux paramètres ce qui les ramène rapidement à une valeur normale. Leur faible système antioxydant est une des clefs leur conférant cette propriété adaptative (Lenzen 2008). En effet, comparativement à d'autres types cellulaires, leur capacité à produire un grand nombre d'espèces réactives de l'oxygène lors de l'accroissement de leur activité, participe certainement au déclenchement de nombreux processus adaptatifs comme la recapture et la libération de calcium par le RE, l'activité mitochondriale et la sécrétion d'insuline.

Lorsque la glycémie n'est plus dans ses valeurs normales, le corps tend à la corriger. Un manque ou un excès d'un nutriment pourra être à l'origine de perturbations diverses. Les maladies métaboliques sont les dérégulations du métabolisme, qu'elles soient dues à des causes internes ou externes. Les causes internes sont principalement les mutations génétiques et les marques épigénétiques (Kato 2013). Elles conduisent le corps à produire en excès ou au contraire à trop consommer des nutriments ou des métabolites. Les causes externes sont les excès ou carences alimentaires, la sédentarité, les polluants sous toutes leurs formes, le stress physique ou psychologique etc (Kahn 2003).

Le stress cellulaire se définit comme un changement dans l'activité de la cellule en réponse à un changement environnemental. Un changement ou un excès temporaire est bénéfique pour les cellules et l'organisme : le corps est sans cesse confronté à des situations nouvelles et crée de nouvelles structures et de nouvelles fonctions adaptées à l'environnement du moment. Cela est vrai

pour les cellules bêta lorsqu'elles accroissent les capacités conformationnelles de leur RE pour produire plus d'insuline en réponse à une élévation de glucose par exemple (Park and Ozcan 2013).

Un changement ou un excès à long terme aura pour conséquence d'épuiser les cellules, car il empêchera le nécessaire travail de récupération et entrainera l'altération des structures cellulaires. Il a été montré que la production accrue de ROS conduit à la dysfonction mitochondriale, à l'apoptose et à la réduction de la sécrétion d'insuline (Li, Brun et al. 2009) (Li, Zhou et al. 2013) (Rani, Mehta et al. 2010). Ces conséquences sont d'autant plus importantes que la cause est multifactorielle. En effet, les mécanismes mis en œuvre pourront agir à différents niveaux de la cellule et ainsi s'additionner (Poitout, Amyot et al. 2010). C'est le cas du glucose et des lipides qui, seuls, sont capables d'altérer la fonction bêta pancréatique, et qui, associés, entraînent des effets quantitativement plus importants.

Nous avons choisi d'étudier dans cette thèse les causes du DT2, une maladie métabolique, sous l'angle de l'excès nutriments afin de comprendre comment traiter et prévenir cette pathologie. Nous avons tout d'abord réalisé une analyse détaillée des mécanismes cellulaires impliqués lors de phénomènes gluco- et lipotoxiques dans les cellules bêta pancréatiques qui perdent progressivement leur capacité à compenser l'hyperglycémie induite par un excès de glucose et de lipides dans le sang. Nous avons ensuite replacé nos résultats dans le contexte du DT2 et de toutes les perturbations qui y sont associées. Ces expériences ont été menées sur des îlots de Langerhans humains, des cellules murines MIN6B1, dans le but d'approfondir la connaissance des mécanismes par lesquels la cellule bêta tente de répondre aux besoins de son environnement et comment elle perd ses fonctions.

Nous avons tout d'abord montré que le glucose et le palmitate en excès ont des effets délétères sur la fonction de la cellule bêta. Nous faisons l'hypothèse que c'est l'ensemble des perturbations que nous avons observées qui sont à l'origine de cette dysfonction. Cela à la fois au niveau du RE, du stress oxydant, de la morphologie et de la fonction mitochondriale et de l'homéostasie calcique. Nous avons étudié dans ces conditions le système rénine-angiotensine (SRA), pour lequel de nombreuses études suggèrent qu'outre son rôle systémique de régulation du système cardiovasculaire, il aurait un rôle adaptatif au niveau local. Notre étude a montré que l'hyperactivation du système rénine-angiotensine (SRA) en condition hyperglucosée participe à la baisse de la concentration calcique réticulaire et cytosolique via l'activation de la PLC, au stress du RE, ainsi qu'aux altérations structurales et fonctionnelles des mitochondries et au stress oxydant. Comme nous l'avons dit précédemment, nous suggérons que l'hyperactivation du SRA pourrait apparaître tôt dans l'adaptation à la dose élevée de glucose, afin d'activer le métabolisme cellulaire et répondre au mieux à la demande en insuline. A long terme, cela aurait pour effet d'épuiser les cellules, soumises en permanence à un environnement qui les sollicite.

Ces résultats ont été confirmés par l'inhibition du SRA avec le losartan, un inhibiteur spécifique du récepteur de type 1 à l'angiotensine 2 (AT1R), qui permettait de restaurer à la fois un niveau d'expression similaire aux conditions contrôles des composants du SRA et l'ensemble des fonctions cellulaires.

Par ailleurs, le glucose et le palmitate réduisent la concentration calcique réticulaire. Nous avons montré que l'augmentation de la PLC participait à cette action. Nous avons aussi montré que le translocon est un canal de fuite calcique passif réticulaire dans les cellules bêta et qu'il participe à la

vidange calcique réticulaire en condition de lipotoxicité. Ce résultat a été confirmé par l'augmentation de la concentration calcique réticulaire lorsque le translocon est inhibé de manière spécifique. Cette inhibition permettait de retrouver aussi une fonction insulinique correcte dans les îlots humains mais pas dans les MIN6B1. Nous en avons conclu que le stress induit par le palmitate dans les MIN6B1 était plus élevé que dans les îlots humains du fait de l'induction d'une apoptose et de plusieurs voies du stress du RE dans les MIN6B1 que nous ne retrouvons pas dans les îlots humains.

De manière intéressante, le palmitate et le glucose modifient les mêmes paramètres cellulaires, mais par des voies différentes. La protection de l'homéostasie calcique par le maintien du calcium semble toutefois être une clef d'action dans les deux modèles puisque son rétablissement conduit à l'amélioration de la sécrétion d'insuline dans les îlots humains, de l'apoptose dans les MIN6B1 soumises à la présence de palmitate et participe à la protection de ces cellules en conditions hyperglucosées. Cette dernière donnée a été confirmée par l'inhibition spécifique de la PLC, qui, si celle-ci a certainement des effets multiples, agit notamment au niveau des flux calciques en activant la production d'IP3, permet de restaurer la concentration calcique réticulaire ainsi que toutes les fonctions des cellules bêta.

En conditions de glucotoxicité, l'action de l'inhibition du SRA par le losartan semble agir en amont de nombreuses voies de signalisation. En effet, elle permet d'améliorer tous les stress induits par le glucose, tant au niveau du stress du RE, du stress oxydant, que de l'homéostasie calcique et de la sécrétion d'insuline. Ces résultats suggèrent que l'inhibition du SRA permet d'agir à un haut niveau d'action dans la cellule bêta et qu'il a de ce fait un rôle thérapeutique potentiel important pour la cellule bêta.

Il semble en effet important d'avoir une action sur les différents stress que rencontre la cellule bêta afin de parvenir à une amélioration complète de la fonction insulinosécrétrice. Ceci est suggéré dans un article récent qui discute du fait que les traitements antioxydants ne sont pas suffisants à soigner du diabète de type 2, car notamment le stress du RE et le stress oxydant ne sont pas forcément liés, et qu'améliorer la fonction de l'un n'améliorera pas nécessairement la fonction de l'autre (Mooradian and Haas 2011). Nous pourrions dire que le calcium et les espèces radicalaires font partie des outils de communication intracellulaires et que leur régulation est importante. De nombreuses études suggèrent qu'il faut réduire au maximum le stress oxydant par des traitements antioxydants afin de rétablir une fonction cellulaire normale, et ce, dans de nombreux types cellulaires. Ce qui est vrai, dans la mesure où la quantité d'espèces réactives de l'oxygène est plus grande que la normale. La limite que pose cette approche est qu'elle tend à trop réduire le stress oxydant. En effet, les cellules ont besoin d'un niveau suffisant de ROS pour fonctionner. Un commentaire écrit récemment par Watson nous rappelle que le traitement le plus adapté trouvé jusqu'à présent pour soigner le diabète de type 2 est l'exercice physique, activité qui génère une grande quantité de ROS (Watson 2014). Cet article nous indique aussi que l'excès de traitement antioxydant réduit le niveau des défenses antioxydantes et que lors d'une élévation transitoire de ROS, le système n'est plus capable de suffisamment s'autoréguler par lui-même.

Par ailleurs, comme nous le suggèrent les résultats obtenus in vitro et in vivo en présence de palmitate, prendre un paramètre isolément peut montrer des effets différents selon les modèles utilisés : le palmitate induisait une réduction de la sécrétion d'insuline dans les MIN6B1, absente dans

notre modèle *in vivo*. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les cellules bêta bénéficient *in vivo* d'un environnement hautement régulé par des cellules de types différents, les facteurs hormonaux, neuronaux et humoraux (Magnan and Ktorza 2005). Il semble donc que plus l'équilibre est compromis, plus les capacités d'adaptations sont mises en difficultés et plus les altérations peuvent être importantes. Le palmitate seul *in vivo* modifierait l'équilibre suffisamment pour perturber le métabolisme global mais pas suffisamment pour altérer la fonction des cellules bêta. Il est par ailleurs intéressant de noter que des études antérieures montraient que les acides gras insaturés protégeaient des effets des lipides saturés et que leur augmentation seule n'avaient pas d'effets (El-Assaad, Buteau et al. 2003). Les études actuelles démontrent au contraire que l'oléate seul, un acide gras insaturé, peut produire les mêmes effets que le palmitate *in vitro* et *in vivo* (Koulajian, Ivovic et al. 2013) (Tuo, Wang et al. 2011) (Maris, Waelkens et al. 2011). Le changement de paradigme semble amener des résultats nouveaux et permet d'envisager de nouvelles voies d'étude. Pour toutes ces raisons, nous modulons nos conclusions quant aux effets d'un excès de palmitate dans la nourriture sur le métabolisme des souris.

Les effets bénéfiques de l'inhibition du SRA nous montrent aussi combien notre corps est capable de s'adapter : même soumis à des conditions environnementales qui provoquent en lui des atteintes capables de perturber ses fonctions cellulaires et ses sécrétions hormonales, il a une grande capacité de régénération puisqu'une fois qu'on lui donne des éléments l'aidant à se reposer, il retrouve ses fonctions d'origines. Cependant, l'inhibition du translocon nous montre aussi qu'une action très spécifique peut permettre d'améliorer seulement certaines fonctions. Il est aussi à noter que plus le stress est long et l'intensité forte, plus la pente du vieillissement est grande et plus les conséquences sont importantes. C'est le cas de l'apoptose des cellules bêta lorsque le développement du DT2 est avancé (Poitout, Amyot et al. 2010). Toutefois, d'autres mécanismes de sauvegarde sont mis en place et offrent d'autres possibilités d'actions thérapeutiques, comme l'accroissement de la masse de la population totale des cellules bêta dans les *premières* phases d'adaptation de la pathologie (Poitout, Amyot et al. 2010).

De la même manière qu'il faut altérer plusieurs parties du corps pour entraîner une perturbation globale et durable, il semble important d'agir à plusieurs niveaux, sur plusieurs aspects du corps pour qu'il parvienne à retrouver une fonction correcte. Les inhibiteurs du SRA pourraient agir sur un de ces aspects en protégeant les cellules bêta de l'hyperactivation métabolique induite par le glucose et peut-être le palmitate. L'avantage de leur utilisation dans une pathologie souvent associée au diabète de type 2, l'hypertension, est qu'elle prévient du diabète dans de nombreux cas, comme le montrent les analyses prospectives et rétrospectives sur ce sujet (Abuissa, Jones et al. 2005; McMurray, Holman et al. 2010). L'inhibition du translocon prévient la perte de l'homéostasie calcique et la fonction bêta cellulaire dans les îlots humains. Il est possible que cela soit aussi vrai *in vivo*. En tant que tel, l'anisomycine pourrait être testée *in vivo* afin d'évaluer les effets de cette molécule sur la prévention et la protection du diabète de type 2. D'une part dans les cellules bêta, afin de poursuivre le travail développé ici, qui donne un point d'appui à l'hypothèse d'un rôle du translocon dans l'adaptation bêta cellulaire à un excès de palmitate. D'autre part, dans les autres types cellulaires impliqués dans le diabète de type 2 et les pathologies métaboliques. F. Van Coppenolle a montré que le translocon a aussi un rôle dans l'homéostasie calcique des cellules musculaires cardiaques, dont l'atteinte est très fréquente dans ce type de pathologies (Hammadi, Oulidi et al. 2013).

Au cours de nos expériences, nous avons pu constater la capacité des cellules bêta à s'adapter ou à revenir à un état physiologique lorsqu'un traitement adapté leur était administré. Des mécanismes de plasticité cellulaires semblent à l'origine de cette capacité, comme c'est le cas de l'épigénétique, que nous pourrions étudier au cours de nouvelles expériences afin de compléter les données obtenues au cours de cette thèse. L'épigénétique est à la fois « l'histoire » des adaptations génétiques des cellules et un des moyens de régulation de l'expression de leurs gènes. Dans leur revue sur la connexion entre la régulation de la chromatine et le métabolisme intermédiaire, Gut et al. expliquent dans quelles proportions les modifications épigénétiques influencent le métabolisme cellulaire et global au travers de la régulation génique et qu'on évalue encore peu le rôle essentiel de l'épigénétique dans l'adaptation cellulaire (Gut and Verdin 2013). La programmation intra-utérine, la transmission transgénérationnelle sont des thèmes émergents qui apportent de nouvelles et importantes connaissances dans le domaine de la pathologie (Ng, Lin et al. 2010). Les récentes découvertes sur les modifications épigénétiques dans les îlots de Langerhans humains de patients atteints d'un DT2 permettront certainement une meilleure compréhension de la maladie (Volkmar, Dedeurwaerder et al. 2012) (Cnop 2014). L'épigénétique a aussi un intérêt dans le traitement des maladies comme le montrent les bénéfices de l'exercice physique sur le métabolisme de patients atteints de DT2 (Kirchner, Osler et al. 2013).

En conclusion, au cours de cette thèse, nous avons apporté de nouveaux résultats quant au déroulement de la dysfonction bêta pancréatique induite par la glucolipotoxicité. Nous avons mis en lumière l'importance de l'homéostasie calcique, du RE dans ces phénomènes. Nos résultats confortent le concept de protection métabolique par l'inhibition du système rénine-angiotensine dans le diabète de type 2 et renforcent l'idée que son action est en partie cellule-bêta-dépendante. L'inhibition du translocon s'est aussi révélée être préventive des effets délétères du palmitate et pourrait faire l'objet de nouvelles recherches afin de mieux comprendre l'intérêt qu'elle représente pour le traitement de pathologies métaboliques. L'ensemble de ces résultats ainsi que ceux de la littérature nous montrent un peu plus combien l'organisme est capable d'adaptation, à la fois à des conditions qui ne sont pas propices à son bon fonctionnement, mais aussi dans ses capacités de récupération lorsqu'un traitement adapté lui est donné. Si ces conditions modifient les marques épigénétiques, métaboliques et cellulaires, nous pourrions envisager qu'inscrire de nouvelles marques sur la base de modes de vie plus adaptés pourrait aussi participer à l'amélioration de nos conditions de vie et au traitement de pathologies métaboliques comme le diabète de type 2.

## 4. Références

- Abdul-Ghani, M. and R. A. DeFronzo (2007). "Fasting hyperglycemia impairs glucose- but not insulin-mediated suppression of glucagon secretion." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(5): 1778-1784.
- Abuissa, H., P. G. Jones, et al. (2005). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials." *J Am Coll Cardiol* **46**(5): 821-826.
- Aizawa, T., M. Komatsu, et al. (1998). "Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell." *Trends Pharmacol Sci* **19**(12): 496-499.
- Akazawa, H., N. Yasuda, et al. (2009). "Mechanisms and functions of agonist-independent activation in the angiotensin II type 1 receptor." *Mol Cell Endocrinol* **302**(2): 140-147.
- Alves, E. S., A. A. Haidar, et al. (2012). "Angiotensin II-induced JNK activation is mediated by NAD(P)H oxidase in isolated rat pancreatic islets." *Regul Pept* **175**(1-3): 1-6.
- Amisten, S., A. Salehi, et al. (2013). "An atlas and functional analysis of G-protein coupled receptors in human islets of Langerhans." *Pharmacol Ther* **139**(3): 359-391.
- Anello, M., A. M. Rabuazzo, et al. (1996). "Fast reversibility of glucose-induced desensitization in rat pancreatic islets. Evidence for an involvement of ionic fluxes." *Diabetes* **45**(4): 502-506.
- Back, S. H. and R. J. Kaufman (2012). "Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes." *Annu Rev Biochem* **81**: 767-793.
- Back, S. H., D. Scheuner, et al. (2009). "Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells." *Cell Metab* **10**(1): 13-26.
- Bardini, G., C. M. Rotella, et al. (2012). "Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications." *Rev Diabet Stud* **9**(2-3): 82-93.
- Barker, C. J. and P. O. Berggren (2013). "New horizons in cellular regulation by inositol polyphosphates: insights from the pancreatic beta-cell." *Pharmacol Rev* **65**(2): 641-669.
- Barker, C. J., I. B. Leibiger, et al. (2002). "Phosphorylated inositol compounds in beta -cell stimulus-response coupling." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(6): E1113-1122.
- Barlow, J. and C. Affourtit (2013). "Novel insights into pancreatic beta-cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells." *Biochem J* **456**(3): 417-426.
- Bearer, E. L. and L. Orci (1985). "Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study." *J Cell Biol* **100**(2): 418-428.
- Begg, D. P. and S. C. Woods (2013). "Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective." *Adv Physiol Educ* **37**(1): 53-60.
- Bensellam, M., D. R. Laybutt, et al. (2012). "The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions." *Mol Cell Endocrinol* **364**(1-2): 1-27.
- Bernardi, P. and A. Rasola (2007). "Calcium and cell death: the mitochondrial connection." *Subcell Biochem* **45**: 481-506.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 517-529.
- Boden, G. (2005). "Free fatty acids and insulin secretion in humans." *Curr Diab Rep* **5**(3): 167-170.

- Bommiasamy, H., S. H. Back, et al. (2009). "ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* **122**(Pt 10): 1626-1636.
- Borgstrom, B., A. Dahlqvist, et al. (1957). "Studies of intestinal digestion and absorption in the human." *J Clin Invest* **36**(10): 1521-1536.
- Bosco, D., M. Armanet, et al. (2010). "Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans." *Diabetes* **59**(5): 1202-1210.
- Boslem, E., P. J. Meikle, et al. (2012). "Roles of ceramide and sphingolipids in pancreatic beta-cell function and dysfunction." *Islets* **4**(3): 177-187.
- Bravo, R., J. M. Vicencio, et al. (2011). "Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress." *J Cell Sci* **124**(Pt 13): 2143-2152.
- Brini, M. and E. Carafoli (2009). "Calcium pumps in health and disease." *Physiol Rev* **89**(4): 1341-1378.
- Broca, C., E. Varin, et al. (2014). "Proteasome dysfunction mediates high glucose-induced apoptosis in rodent beta cells and human islets." *PLoS One* **9**(3): e92066.
- Brownlee, I. A., D. J. Forster, et al. (2010). "Physiological parameters governing the action of pancreatic lipase." *Nutr Res Rev* **23**(1): 146-154.
- Brun, T., P. Scarcia, et al. (2013). "Changes in mitochondrial carriers exhibit stress-specific signatures in INS-1E beta-cells exposed to glucose versus fatty acids." *PLoS One* **8**(12): e82364.
- Brunzell, J. D., R. P. Robertson, et al. (1976). "Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests." *J Clin Endocrinol Metab* **42**(2): 222-229.
- Burks, T. N., E. Andres-Mateos, et al. (2011). "Losartan restores skeletal muscle remodeling and protects against disuse atrophy in sarcopenia." *Sci Transl Med* **3**(82): 82ra37.
- Cabrera, O., D. M. Berman, et al. (2006). "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2334-2339.
- Cadavez, L., J. Montane, et al. (2014). "Chaperones ameliorate beta cell dysfunction associated with human islet amyloid polypeptide overexpression." *PLoS One* **9**(7): e101797.
- Casselbrant, A., S. Kostic, et al. (2014). "The muscular expression of RAS in patients with achalasia." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*
- Chen, X., Z. Cui, et al. (2013). "Chronic high glucose induced INS-1 beta cell mitochondrial dysfunction: a comparative mitochondrial proteome with SILAC." *Proteomics* **13**(20): 3030-3039.
- Cheng, Q. and P. S. Leung (2011). "An update on the islet renin-angiotensin system." *Peptides* **32**(5): 1087-1095.
- Chhabra, K. H., H. Xia, et al. (2013). "Pancreatic angiotensin-converting enzyme 2 improves glycemia in angiotensin II-infused mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**(8): E874-884.
- Chu, K. Y., T. Lau, et al. (2006). "Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes." *Diabetes* **55**(2): 367-374.
- Chu, K. Y. and P. S. Leung (2007). "Angiotensin II Type 1 receptor antagonism mediates uncoupling protein 2-driven oxidative stress and ameliorates pancreatic islet beta-cell function in young Type 2 diabetic mice." *Antioxid Redox Signal* **9**(7): 869-878.
- Cnop, M. (2014). "Epigenetic aspects of pancreatic beta cell function in type 2 diabetes." *Arch Public Health* **72**(Suppl 1 Proceedings of the 4th Belgian Nutrition Society): K1.
- Cnop, M., F. Foulle, et al. (2012). "Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes." *Trends Mol Med* **18**(1): 59-68.
- Cnop, M., J. C. Hannaert, et al. (2001). "Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation." *Diabetes* **50**(8): 1771-1777.
- Cnop, M., L. Ladriere, et al. (2007). "Selective inhibition of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha dephosphorylation potentiates fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress and causes pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis." *J Biol Chem* **282**(6): 3989-3997.

- Cnop, M., N. Welsh, et al. (2005). "Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities." *Diabetes* **54 Suppl 2**: S97-107.
- Crespin, S. R., W. B. Greenough, 3rd, et al. (1969). "Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids." *J Clin Invest* **48**(10): 1934-1943.
- Cunha, D. A., P. Hekerman, et al. (2008). "Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells." *J Cell Sci* **121**(Pt 14): 2308-2318.
- De Miguel, C. and J. S. Pollock (2013). "Does endoplasmic reticulum stress mediate endothelin-1-induced renal inflammation?" *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**(2): R107-109.
- De Vos, A., H. Heimberg, et al. (1995). "Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression." *J Clin Invest* **96**(5): 2489-2495.
- Del Guerra, S., M. Grupillo, et al. (2007). "Gliclazide protects human islet beta-cells from apoptosis induced by intermittent high glucose." *Diabetes Metab Res Rev* **23**(3): 234-238.
- Del Guerra, S., R. Lupi, et al. (2005). "Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes." *Diabetes* **54**(3): 727-735.
- Del Prato, S. (2009). "Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies." *Diabet Med* **26**(12): 1185-1192.
- Deuring, J. J., G. M. Fuhler, et al. (2014). "Genomic ATG16L1 risk allele-restricted Paneth cell ER stress in quiescent Crohn's disease." *Gut* **63**(7): 1081-1091.
- Drucker, D. J. (2006). "The biology of incretin hormones." *Cell Metab* **3**(3): 153-165.
- Dubois, M., P. Vacher, et al. (2007). "Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis." *Endocrinology* **148**(4): 1605-1614.
- Dunlop, M. E. and R. G. Larkins (1988). "GTP- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced release of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  from a membrane store co-localized with pancreatic-islet-cell plasma membrane." *Biochem J* **253**(1): 67-72.
- Eguchi, K., I. Manabe, et al. (2012). "Saturated fatty acid and TLR signaling link beta cell dysfunction and islet inflammation." *Cell Metab* **15**(4): 518-533.
- Eizirik, D. L., A. K. Cardozo, et al. (2008). "The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus." *Endocr Rev* **29**(1): 42-61.
- Eizirik, D. L., G. S. Korbitt, et al. (1992). "Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function." *J Clin Invest* **90**(4): 1263-1268.
- Eizirik, D. L., M. Miani, et al. (2013). "Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation." *Diabetologia* **56**(2): 234-241.
- El-Assaad, W., J. Buteau, et al. (2003). "Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death." *Endocrinology* **144**(9): 4154-4163.
- Elks, M. L. (1993). "Chronic perfusion of rat islets with palmitate suppresses glucose-stimulated insulin release." *Endocrinology* **133**(1): 208-214.
- Elouil, H., M. Bensellam, et al. (2007). "Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets." *Diabetologia* **50**(7): 1442-1452.
- Farnsworth, N. L., A. Hemmati, et al. (2014). "Fluorescence recovery after photobleaching reveals regulation and distribution of Cx36 gap junction coupling within mouse islets of langerhans." *J Physiol*.
- Fernandez-Hernando, C., C. M. Ramirez, et al. (2013). "MicroRNAs in metabolic disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(2): 178-185.
- Forouhi, N. G., A. Koulman, et al. (2014). "Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study." *Lancet Diabetes Endocrinol*.
- Fryirs, M. A., P. J. Barter, et al. (2010). "Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(8): 1642-1648.

- Gehrmann, W., M. Elsner, et al. (2010). "Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells." *Diabetes Obes Metab* **12 Suppl 2**: 149-158.
- Gerbino, A., I. Maiellaro, et al. (2012). "Glucose increases extracellular [Ca<sup>2+</sup>] in rat insulinoma (INS-1E) pseudoislets as measured with Ca<sup>2+</sup>-sensitive microelectrodes." *Cell Calcium* **51**(5): 393-401.
- Giacca, A., C. Xiao, et al. (2011). "Lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction: focus on in vivo studies." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**(2): E255-262.
- Giacchetti, G., E. Faloia, et al. (2002). "Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects." *Am J Hypertens* **15**(5): 381-388.
- Girgis, C. M., K. Cheng, et al. (2012). "Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome." *Trends Endocrinol Metab* **23**(8): 372-380.
- Gletsu, N., T. N. Doan, et al. (2005). "Angiotensin II-induced hypertension in mice caused an increase in insulin secretion." *Vascul Pharmacol* **42**(3): 83-92.
- Goossens, G. H., C. C. Moors, et al. (2012). "Valsartan improves adipose tissue function in humans with impaired glucose metabolism: a randomized placebo-controlled double-blind trial." *PLoS One* **7**(6): e39930.
- Graciano, M. F., M. M. Valle, et al. (2011). "Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets." *Islets* **3**(5): 213-223.
- Grill, V. and A. Bjorklund (2009). "Impact of metabolic abnormalities for beta cell function: clinical significance and underlying mechanisms." *Mol Cell Endocrinol* **297**(1-2): 86-92.
- Gut, P. and E. Verdin (2013). "The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism." *Nature* **502**(7472): 489-498.
- Gwiazda, K. S., T. L. Yang, et al. (2009). "Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in beta-cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E690-701.
- Halban, P. A., K. S. Polonsky, et al. (2014). "beta-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment." *J Clin Endocrinol Metab* **99**(6): 1983-1992.
- Hammadi, M., A. Oulidi, et al. (2013). "Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78." *FASEB J* **27**(4): 1600-1609.
- Han, D., B. Yang, et al. (2010). "Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from high glucose." *Biochem J* **425**(3): 541-551.
- Hara, T., J. Mahadevan, et al. (2014). "Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to beta-cell death." *Endocrinology* **155**(3): 758-768.
- Hardtner, C., C. Morke, et al. (2013). "High glucose activates the alternative ACE2/Ang-(1-7)/Mas and APN/Ang IV/IRAP RAS axes in pancreatic beta-cells." *Int J Mol Med* **32**(4): 795-804.
- Harmon, J. S., C. E. Gleason, et al. (2001). "Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats." *Diabetes* **50**(11): 2481-2486.
- Harmon, J. S., R. Stein, et al. (2005). "Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells." *J Biol Chem* **280**(12): 11107-11113.
- Harrison-Bernard, L. M. (2009). "The renal renin-angiotensin system." *Adv Physiol Educ* **33**(4): 270-274.
- Hasan, A. U., K. Ohmori, et al. (2014). "Valsartan ameliorates the constitutive adipokine expression pattern in mature adipocytes: a role for inverse agonism of the angiotensin II type 1 receptor in obesity." *Hypertens Res* **37**(7): 621-628.
- Hasegawa, G., M. Fukui, et al. (2009). "Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, prevents the development of diabetes in male Spontaneously Diabetic Torii rats." *Eur J Pharmacol* **605**(1-3): 164-169.

- Hasty, A. H. and D. G. Harrison (2012). "Endoplasmic reticulum stress and hypertension - a new paradigm?" *J Clin Invest* **122**(11): 3859-3861.
- Hayden, M. R., C. S. Stump, et al. (2006). "Introduction: organ involvement in the cardiometabolic syndrome." *J Cardiometab Syndr* **1**(1): 16-24.
- Henderson, J. R. and M. C. Moss (1985). "A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas." *Q J Exp Physiol* **70**(3): 347-356.
- Henquin, J. C. (2000). "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose." *Diabetes* **49**(11): 1751-1760.
- Henquin, J. C. (2009). "Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation." *Diabetologia* **52**(5): 739-751.
- Henquin, J. C., D. Dufrane, et al. (2006). "Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets." *Diabetes* **55**(12): 3470-3477.
- Henquin, J. C., J. C. Jonas, et al. (1998). "Functional significance of Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic beta cells." *Diabetes Metab* **24**(1): 30-36.
- Henriksen, E. J. and M. Prasannarong (2013). "The role of the renin-angiotensin system in the development of insulin resistance in skeletal muscle." *Mol Cell Endocrinol* **378**(1-2): 15-22.
- Hodson, D. J., R. K. Mitchell, et al. (2013). "Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human beta cell connectivity." *J Clin Invest* **123**(10): 4182-4194.
- Hoppa, M. B., S. Collins, et al. (2009). "Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca(2+) channels from secretory granules." *Cell Metab* **10**(6): 455-465.
- Hotamisligil, G. S. (2010). "Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease." *Cell* **140**(6): 900-917.
- Hraha, T. H., A. B. Bernard, et al. (2014). "Dimensionality and size scaling of coordinated Ca(2+) dynamics in MIN6 beta-cell clusters." *Biophys J* **106**(1): 299-309.
- Huang, C. J., T. Gurlo, et al. (2010). "Calcium-activated calpain-2 is a mediator of beta cell dysfunction and apoptosis in type 2 diabetes." *J Biol Chem* **285**(1): 339-348.
- Hull, R. L., S. Zraika, et al. (2009). "Amyloid formation in human IAPP transgenic mouse islets and pancreas, and human pancreas, is not associated with endoplasmic reticulum stress." *Diabetologia* **52**(6): 1102-1111.
- Ibrahim, M. A., E. F. Amin, et al. (2014). "Montelukast and irbesartan ameliorate metabolic and hepatic disorders in fructose-induced metabolic syndrome in rats." *Eur J Pharmacol* **724**: 204-210.
- Ihoriya, C., M. Satoh, et al. (2014). "Angiotensin II Regulates Islet Microcirculation and Insulin Secretion in Mice." *Microcirculation* **21**(2): 112-123.
- Ismail, K., K. Winkley, et al. (2004). "Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials of psychological interventions to improve glycaemic control in patients with type 2 diabetes." *Lancet* **363**(9421): 1589-1597.
- Itoh, Y., Y. Kawamata, et al. (2003). "Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40." *Nature* **422**(6928): 173-176.
- Ivarsson, R., R. Quintens, et al. (2005). "Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin." *Diabetes* **54**(7): 2132-2142.
- Jackson, M. B. and R. S. Ahima (2006). "Neuroendocrine and metabolic effects of adipocyte-derived hormones." *Clin Sci (Lond)* **110**(2): 143-152.
- Janson, J., R. H. Ashley, et al. (1999). "The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles." *Diabetes* **48**(3): 491-498.
- Jansson, L. and P. O. Carlsson (2002). "Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets." *Diabetologia* **45**(6): 749-763.
- Jaques, F., H. Jousset, et al. (2008). "Dual effect of cell-cell contact disruption on cytosolic calcium and insulin secretion." *Endocrinology* **149**(5): 2494-2505.

- Johnson, E. L. (2012). "Glycemic variability in type 2 diabetes mellitus: oxidative stress and macrovascular complications." *Adv Exp Med Biol* **771**: 139-154.
- Jonkers, F. C. and J. C. Henquin (2001). "Measurements of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in islet cell clusters show that glucose rapidly recruits beta-cells and gradually increases the individual cell response." *Diabetes* **50**(3): 540-550.
- Kahn, S. E. (2003). "The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes." *Diabetologia* **46**(1): 3-19.
- Kalupahana, N. S. and N. Moustaid-Moussa (2012). "The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**(4): 379-390.
- Karaskov, E., C. Scott, et al. (2006). "Chronic palmitate but not oleate exposure induces endoplasmic reticulum stress, which may contribute to INS-1 pancreatic beta-cell apoptosis." *Endocrinology* **147**(7): 3398-3407.
- Karnchanasorn, R., H. Y. Ou, et al. (2013). "Insulin resistance is not necessarily an essential element of metabolic syndrome." *Endocrine* **43**(1): 92-99.
- Karthikeyan, R., G. Marimuthu, et al. (2014). "Should we listen to our clock to prevent type 2 diabetes mellitus?" *Diabetes Res Clin Pract.*
- Kashyap, S., R. Belfort, et al. (2003). "A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes." *Diabetes* **52**(10): 2461-2474.
- Kato, N. (2013). "Insights into the genetic basis of type 2 diabetes." *J Diabetes Investig* **4**(3): 233-244.
- Kharroubi, I., L. Ladriere, et al. (2004). "Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress." *Endocrinology* **145**(11): 5087-5096.
- Kirchner, H., M. E. Osler, et al. (2013). "Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention?" *Trends Cell Biol* **23**(5): 203-209.
- Kiviluoto, S., T. Vervliet, et al. (2013). "Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress." *Biochim Biophys Acta* **1833**(7): 1612-1624.
- Kluth, O., F. Mirhashemi, et al. (2011). "Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure." *Diabetologia* **54**(3): 605-616.
- Kohnert, K. D., E. J. Freyse, et al. (2012). "Glycaemic variability and pancreatic beta-cell dysfunction." *Curr Diabetes Rev* **8**(5): 345-354.
- Komatsu, M., M. Takei, et al. (2013). "Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective." *J Diabetes Investig* **4**(6): 511-516.
- Kono, T., G. Ahn, et al. (2012). "PPAR-gamma activation restores pancreatic islet SERCA2 levels and prevents beta-cell dysfunction under conditions of hyperglycemic and cytokine stress." *Mol Endocrinol* **26**(2): 257-271.
- Kosse, C., A. Gonzalez, et al. (2014). "Predictive models of glucose control: roles for glucose-sensing neurones." *Acta Physiol (Oxf).*
- Koulajian, K., T. Desai, et al. (2013). "NADPH oxidase inhibition prevents beta cell dysfunction induced by prolonged elevation of oleate in rodents." *Diabetologia* **56**(5): 1078-1087.
- Koulajian, K., A. Iovic, et al. (2013). "Overexpression of glutathione peroxidase 4 prevents beta-cell dysfunction induced by prolonged elevation of lipids in vivo." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**(2): E254-262.
- Kruit, J. K., N. Wijesekara, et al. (2012). "Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired beta-cell function." *Diabetes* **61**(3): 659-664.

- Kusminski, C. M., S. Shetty, et al. (2009). "Diabetes and apoptosis: lipotoxicity." *Apoptosis* **14**(12): 1484-1495.
- Ladiges, W. C., S. E. Knoblaugh, et al. (2005). "Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK." *Diabetes* **54**(4): 1074-1081.
- Lai, E., G. Bikopoulos, et al. (2008). "Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(3): E540-550.
- Lam, K. Y. and P. S. Leung (2002). "Regulation and expression of a renin-angiotensin system in human pancreas and pancreatic endocrine tumours." *Eur J Endocrinol* **146**(4): 567-572.
- Larsson-Nyren, G., N. Pakhtusova, et al. (2002). "Isolated mouse pancreatic beta-cells show cell-specific temporal response pattern." *Am J Physiol Cell Physiol* **282**(6): C1199-1204.
- Lau, T., P. O. Carlsson, et al. (2004). "Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets." *Diabetologia* **47**(2): 240-248.
- Laybutt, D. R., A. M. Preston, et al. (2007). "Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes." *Diabetologia* **50**(4): 752-763.
- Laychock, S. G. (1995). "Impaired cyclic AMP response to stimuli in glucose-desensitized rat pancreatic islets." *Mol Cell Endocrinol* **113**(1): 19-28.
- Le Gurun, S., D. Martin, et al. (2003). "Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells." *J Biol Chem* **278**(39): 37690-37697.
- Leahy, J. L., H. E. Cooper, et al. (1986). "Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions." *J Clin Invest* **77**(3): 908-915.
- Lee, B., J. C. Jonas, et al. (1999). "Glucose regulates expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in isolated rat pancreatic islets." *Endocrinology* **140**(5): 2173-2182.
- Lenzen, S. (2008). "Oxidative stress: the vulnerable beta-cell." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 3): 343-347.
- Lenzen, S., J. Drinkgern, et al. (1996). "Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues." *Free Radic Biol Med* **20**(3): 463-466.
- LeRoith, D. (2002). "Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities." *Am J Med* **113** Suppl 6A: 3S-11S.
- Leung, K. K. and P. S. Leung (2008). "Effects of hyperglycemia on angiotensin II receptor type 1 expression and insulin secretion in an INS-1E pancreatic beta-cell line." *JOP* **9**(3): 290-299.
- Leung, P. S. (2007). "The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas." *J Physiol* **580**(Pt 1): 31-37.
- Leung, P. S., W. P. Chan, et al. (1999). "Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas." *J Endocrinol* **160**(1): 13-19.
- Li, N., T. Brun, et al. (2009). "Transient oxidative stress damages mitochondrial machinery inducing persistent beta-cell dysfunction." *J Biol Chem* **284**(35): 23602-23612.
- Li, N., F. Frigerio, et al. (2008). "The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 5): 930-934.
- Li, W., R. Zhao, et al. (2014). "Small islets transplantation superiority to large ones: implications from islet microcirculation and revascularization." *J Diabetes Res* **2014**: 192093.
- Li, Z., Z. Zhou, et al. (2013). "Exendin-4 protects mitochondria from reactive oxygen species induced apoptosis in pancreatic Beta cells." *PLoS One* **8**(10): e76172.
- Lim, S., M. A. Rashid, et al. (2011). "Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic beta-cells against oxidative stress and improve insulin secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity." *Cell Physiol Biochem* **28**(5): 873-886.

- Lipson, K. L., S. G. Fonseca, et al. (2006). "Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1." *Cell Metab* **4**(3): 245-254.
- Listenberger, L. L., X. Han, et al. (2003). "Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3077-3082.
- Lovis, P., E. Roggli, et al. (2008). "Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction." *Diabetes* **57**(10): 2728-2736.
- Lteif, A. A., R. L. Chisholm, et al. (2012). "Effects of losartan on whole body, skeletal muscle and vascular insulin responses in obesity/insulin resistance without hypertension." *Diabetes Obes Metab* **14**(3): 254-261.
- Luciani, D. S., K. S. Gwiazda, et al. (2009). "Roles of IP3R and RyR Ca<sup>2+</sup> channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death." *Diabetes* **58**(2): 422-432.
- Lupi, R., S. Del Guerra, et al. (2006). "The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets." *Eur J Endocrinol* **154**(2): 355-361.
- Lupi, R., F. Dotta, et al. (2002). "Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated." *Diabetes* **51**(5): 1437-1442.
- Maechler, P. and C. B. Wollheim (1999). "Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis." *Nature* **402**(6762): 685-689.
- Maedler, K., J. Oberholzer, et al. (2003). "Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function." *Diabetes* **52**(3): 726-733.
- Maedler, K., G. A. Spinas, et al. (2001). "Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function." *Diabetes* **50**(1): 69-76.
- Malhotra, J. D. and R. J. Kaufman (2007). "Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?" *Antioxid Redox Signal* **9**(12): 2277-2293.
- Marchetti, P., M. Bugliani, et al. (2007). "The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients." *Diabetologia* **50**(12): 2486-2494.
- Maris, M., L. Overbergh, et al. (2012). "Deletion of C/EBP homologous protein (Chop) in C57Bl/6 mice dissociates obesity from insulin resistance." *Diabetologia* **55**(4): 1167-1178.
- Maris, M., E. Waelkens, et al. (2011). "Oleate-induced beta cell dysfunction and apoptosis: a proteomic approach to glucolipotoxicity by an unsaturated fatty acid." *J Proteome Res* **10**(8): 3372-3385.
- Masini, M., M. Anello, et al. (2014). "Prevention by metformin of alterations induced by chronic exposure to high glucose in human islet beta cells is associated with preserved ATP/ADP ratio." *Diabetes Res Clin Pract* **104**(1): 163-170.
- Mazza, S. and T. Maffucci (2014). "Autophagy and pancreatic beta-cells." *Vitam Horm* **95**: 145-164.
- McMurray, J. J., R. R. Holman, et al. (2010). "Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events." *N Engl J Med* **362**(16): 1477-1490.
- Meidute Abaraviciene, S., S. J. Muhammed, et al. (2013). "GPR40 protein levels are crucial to the regulation of stimulated hormone secretion in pancreatic islets. Lessons from spontaneous obesity-prone and non-obese type 2 diabetes in rats." *Mol Cell Endocrinol* **381**(1-2): 150-159.
- Men, X., H. Wang, et al. (2009). "Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(4): 879-890.
- Menge, B. A., L. Gruber, et al. (2011). "Loss of inverse relationship between pulsatile insulin and glucagon secretion in patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **60**(8): 2160-2168.
- Mittra, S., V. S. Bansal, et al. (2008). "From a glucocentric to a lipocentric approach towards metabolic syndrome." *Drug Discov Today* **13**(5-6): 211-218.

- Miura, S., K. Saku, et al. (2003). "Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor." *Hypertens Res* **26**(12): 937-943.
- Miyazaki, M. and S. Takai (2006). "Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase." *J Pharmacol Sci* **100**(5): 391-397.
- Mohammed, A. M. and A. Kowluru (2013). "Activation of apocynin-sensitive NADPH oxidase (Nox2) activity in INS-1 832/13 cells under glucotoxic conditions." *Islets* **5**(3): 129-131.
- Moon, J. Y. (2013). "Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension." *Electrolyte Blood Press* **11**(2): 41-45.
- Mooradian, A. D. and M. J. Haas (2011). "Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes." *Free Radic Biol Med* **50**(9): 1140-1143.
- Moors, C. C., E. E. Blaak, et al. (2013). "The effects of long-term valsartan treatment on skeletal muscle fatty acid handling in humans with impaired glucose metabolism." *J Clin Endocrinol Metab* **98**(5): E891-896.
- Morgan, D., H. R. Oliveira-Emilio, et al. (2007). "Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line." *Diabetologia* **50**(2): 359-369.
- Muhlbauer, E., E. Albrecht, et al. (2011). "Melatonin inhibits insulin secretion in rat insulinoma beta-cells (INS-1) heterologously expressing the human melatonin receptor isoform MT2." *J Pineal Res* **51**(3): 361-372.
- Munsters, M. J. and W. H. Saris (2014). "Body weight regulation and obesity: dietary strategies to improve the metabolic profile." *Annu Rev Food Sci Technol* **5**: 39-51.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochemical Journal* **417**: 1-13.
- Nabeshima, Y., S. Tazuma, et al. (2009). "Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis." *J Hepatol* **50**(6): 1226-1235.
- Nagel, J. M., A. B. Tietz, et al. (2006). "The effect of telmisartan on glucose and lipid metabolism in nondiabetic, insulin-resistant subjects." *Metabolism* **55**(9): 1149-1154.
- Naidoo, N. (2012). "Roles of endoplasmic reticulum and energetic stress in disturbed sleep." *Neuromolecular Med* **14**(3): 213-219.
- Nakayama, M., T. Inoguchi, et al. (2005). "Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of Type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(4): 927-933.
- Newsholme, P., V. Cruzat, et al. (2014). "Nutrient regulation of insulin secretion and action." *J Endocrinol* **221**(3): R105-120.
- Newsholme, P., E. P. Haber, et al. (2007). "Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity." *J Physiol* **583**(Pt 1): 9-24.
- Ng, S. F., R. C. Lin, et al. (2010). "Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring." *Nature* **467**(7318): 963-966.
- Nyman, L. R., E. Ford, et al. (2010). "Glucose-dependent blood flow dynamics in murine pancreatic islets in vivo." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(4): E807-814.
- O'Hagan, C., G. De Vito, et al. (2013). "Exercise prescription in the treatment of type 2 diabetes mellitus : current practices, existing guidelines and future directions." *Sports Med* **43**(1): 39-49.
- Ogawa, S., T. Abe, et al. (2013). "Eicosapentaenoic acid improves glycemic control in elderly bedridden patients with type 2 diabetes." *Tohoku J Exp Med* **231**(1): 63-74.
- Olofsson, C. S., S. Collins, et al. (2007). "Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane." *Diabetes* **56**(7): 1888-1897.

- Olsson, R. and P. O. Carlsson (2006). "The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(5-6): 710-714.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." *Science* **306**(5695): 457-461.
- Park, S. H., S. Y. Kim, et al. (2009). "Regulation of glucose-dependent insulin secretion by insulin: possible role of AMP-activated protein kinase." *Life Sci* **85**(3-4): 178-183.
- Park, S. W. and U. Ozcan (2013). "Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease." *Semin Immunopathol* **35**(3): 351-373.
- Pedersen, M. G., E. Mosekilde, et al. (2013). "Complex patterns of metabolic and Ca(2)(+) entrainment in pancreatic islets by oscillatory glucose." *Biophys J* **105**(1): 29-39.
- Peiris, H., C. S. Bonder, et al. (2014). "The beta-cell/EC axis: how do islet cells talk to each other?" *Diabetes* **63**(1): 3-11.
- Perez-Armendariz, E. M. (2013). "Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function." *Neuropharmacology* **75**: 557-566.
- Piro, S., M. Anello, et al. (2002). "Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress." *Metabolism* **51**(10): 1340-1347.
- Poitout, V., J. Amyot, et al. (2010). "Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell." *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 289-298.
- Poitout, V. and R. P. Robertson (2002). "Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity." *Endocrinology* **143**(2): 339-342.
- Prentki, M., E. Joly, et al. (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." *Diabetes* **51** Suppl 3: S405-413.
- Prentki, M. and C. B. Wollheim (1984). "Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in insulin secreting cells and its regulation by isolated organelles." *Experientia* **40**(10): 1052-1060.
- Preston, A. M., E. Gurisik, et al. (2009). "Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload." *Diabetologia* **52**(11): 2369-2373.
- Ramracheya, R. D., D. S. Muller, et al. (2006). "Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans." *Diabetologia* **49**(2): 321-331.
- Rana, R. S., A. Kowluru, et al. (1986). "Enzymes of phospholipid metabolism in rat pancreatic islets: subcellular distribution and the effect of glucose and calcium." *J Cell Biochem* **32**(2): 143-150.
- Rana, R. S., M. C. Sekar, et al. (1987). "Potentiation by glucose metabolites of inositol trisphosphate-induced calcium mobilization in permeabilized rat pancreatic islets." *J Biol Chem* **262**(28): 13567-13570.
- Rani, S., J. P. Mehta, et al. (2010). "Decreasing Txnip mRNA and protein levels in pancreatic MIN6 cells reduces reactive oxygen species and restores glucose regulated insulin secretion." *Cell Physiol Biochem* **25**(6): 667-674.
- Richards, O. C., S. M. Raines, et al. (2010). "The role of blood vessels, endothelial cells, and vascular pericytes in insulin secretion and peripheral insulin action." *Endocr Rev* **31**(3): 343-363.
- Rizza, R. A., L. J. Mandarino, et al. (1981). "Dose-response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man." *Am J Physiol* **240**(6): E630-639.
- Rolo, A. P. and C. M. Palmeira (2006). "Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress." *Toxicol Appl Pharmacol* **212**(2): 167-178.
- Rorsman, P. and M. Braun (2013). "Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets." *Annu Rev Physiol* **75**: 155-179.
- Roussel, B. D., A. J. Kruppa, et al. (2013). "Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease." *Lancet Neurol* **12**(1): 105-118.

- Rutter, G. A., T. Tsuboi, et al. (2006). "Ca<sup>2+</sup> microdomains and the control of insulin secretion." *Cell Calcium* **40**(5-6): 539-551.
- Saiki, A., M. Ohira, et al. (2009). "Circulating angiotensin II is associated with body fat accumulation and insulin resistance in obese subjects with type 2 diabetes mellitus." *Metabolism* **58**(5): 708-713.
- Saitoh, Y., W. Hongwei, et al. (2010). "Candesartan attenuates fatty acid-induced oxidative stress and NAD(P)H oxidase activity in pancreatic beta-cells." *Diabetes Res Clin Pract* **90**(1): 54-59.
- Sakai, K., K. Matsumoto, et al. (2003). "Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(1): 216-222.
- Santos, C. X., L. Y. Tanaka, et al. (2009). "Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase." *Antioxid Redox Signal* **11**(10): 2409-2427.
- Santos, L. R., E. Rebelato, et al. (2011). "Oleic acid modulates metabolic substrate channeling during glucose-stimulated insulin secretion via NAD(P)H oxidase." *Endocrinology* **152**(10): 3614-3621.
- Sanyal, D., S. Ghosh, et al. (2012). "Dyslipidemia, metabolic syndrome, and liver enzymes in impaired glucose tolerance and new onset untreated, type 2 diabetes Indian subjects." *Indian J Endocrinol Metab* **16**(Suppl 2): S434-435.
- Schroder, K., R. Zhou, et al. (2010). "The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?" *Science* **327**(5963): 296-300.
- Schulz, N., O. Kluth, et al. (2013). "Minor role of mitochondrial respiration for fatty-acid induced insulin secretion." *Int J Mol Sci* **14**(9): 18989-18998.
- Schweizer, J. R., P. A. Miranda, et al. (2012). "Angiotensin-converting enzyme inhibition increases glucose-induced insulin secretion in response to acute restraint." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **39**(12): 1034-1037.
- Seo, H. Y., Y. D. Kim, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner." *Endocrinology* **149**(8): 3832-3841.
- Shawl, A. I., K. H. Park, et al. (2009). "Insulin receptor signaling for the proliferation of pancreatic beta-cells: involvement of Ca<sup>2+</sup> second messengers, IP3, NAADP and cADPR." *Islets* **1**(3): 216-223.
- Shimabukuro, M., M. Higa, et al. (1998). "Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression." *J Biol Chem* **273**(49): 32487-32490.
- Spitler, K. M., T. Matsumoto, et al. (2013). "Suppression of endoplasmic reticulum stress improves endothelium-dependent contractile responses in aorta of the spontaneously hypertensive rat." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**(3): H344-353.
- Stein, D. T., B. E. Stevenson, et al. (1997). "The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation." *J Clin Invest* **100**(2): 398-403.
- Steneberg, P., N. Rubins, et al. (2005). "The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse." *Cell Metab* **1**(4): 245-258.
- Sun, P., T. Wang, et al. (2013). "DC260126: a small-molecule antagonist of GPR40 that protects against pancreatic beta-Cells dysfunction in db/db mice." *PLoS One* **8**(6): e66744.
- Supale, S., N. Li, et al. (2012). "Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta cells." *Trends Endocrinol Metab* **23**(9): 477-487.
- Tahmasebi, M., J. R. Puddefoot, et al. (1999). "The tissue renin-angiotensin system in human pancreas." *J Endocrinol* **161**(2): 317-322.
- Tengholm, A. and E. Gylfe (2009). "Oscillatory control of insulin secretion." *Mol Cell Endocrinol* **297**(1-2): 58-72.

- Thameem, F., V. S. Farook, et al. (2006). "Association of amino acid variants in the activating transcription factor 6 gene (ATF6) on 1q21-q23 with type 2 diabetes in Pima Indians." *Diabetes* **55**(3): 839-842.
- Thorens, B. (2011). "Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion." *Diabetes Obes Metab* **13 Suppl 1**: 82-88.
- Tikellis, C., P. J. Wookey, et al. (2004). "Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat." *Diabetes* **53**(4): 989-997.
- Tonooka, N., E. Oseid, et al. (2007). "Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation." *Clin Transplant* **21**(6): 767-772.
- Tu, B. P. and J. S. Weissman (2004). "Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences." *J Cell Biol* **164**(3): 341-346.
- Tuo, Y., D. D. Feng, et al. (2012). "Long-term in vitro treatment of INS-1 rat pancreatic beta-cells by unsaturated free fatty acids protects cells against gluco- and lipotoxicities via activation of GPR40 receptors." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **39**(5): 423-428.
- Tuo, Y., D. Wang, et al. (2011). "Long-term exposure of INS-1 rat insulinoma cells to linoleic acid and glucose in vitro affects cell viability and function through mitochondrial-mediated pathways." *Endocrine* **39**(2): 128-138.
- Underwood, P. C. and G. K. Adler (2013). "The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans." *Curr Hypertens Rep* **15**(1): 59-70.
- Unger, R. H. and S. Grundy (1985). "Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes." *Diabetologia* **28**(3): 119-121.
- Vamecq, J., A. F. Dessein, et al. (2012). "Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis." *Curr Drug Metab* **13**(10): 1388-1400.
- van Baak, M. A. (2014). "24-hour glucose profiles on diets varying in protein content and glycemic index." *Nutrients* **6**(8): 3050-3061.
- Van Coppenolle, F., F. Vanden Abeele, et al. (2004). "Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores." *J Cell Sci* **117**(Pt 18): 4135-4142.
- Vejakama, P., A. Thakkinstian, et al. (2012). "Renoprotective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetic patients: a systematic review and network meta-analysis." *Diabetologia* **55**(3): 566-578.
- Verberne, A. J., A. Sabetghadam, et al. (2014). "Neural pathways that control the glucose counterregulatory response." *Front Neurosci* **8**: 38.
- Verma, M. K., M. K. Sadasivuni, et al. (2014). "Activation of GPR40 attenuates chronic inflammation induced impact on pancreatic beta-cells health and function." *BMC Cell Biol* **15**: 24.
- Victor, V. M., M. Rocha, et al. (2011). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes." *Curr Pharm Des* **17**(36): 3947-3958.
- Volkmar, M., S. Dedeurwaerder, et al. (2012). "DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients." *EMBO J* **31**(6): 1405-1426.
- Wallace, M., H. Whelan, et al. (2013). "Metabolomic analysis of pancreatic beta cells following exposure to high glucose." *Biochim Biophys Acta* **1830**(3): 2583-2590.
- Wang, X., H. Li, et al. (2004). "Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6." *Diabetes* **53**(1): 129-140.
- Warnotte, C., P. Gilon, et al. (1994). "Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells." *Diabetes* **43**(5): 703-711.
- Watson, J. D. (2014). "Type 2 diabetes as a redox disease." *Lancet* **383**(9919): 841-843.
- Wei, J., S. Rahman, et al. (2013). "Protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in chronic lung disease." *Chest* **143**(4): 1098-1105.

- Weir, G. C. and S. Bonner-Weir (2013). "Islet beta cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death." *Ann N Y Acad Sci* **1281**: 92-105.
- Weyer, C., C. Bogardus, et al. (1999). "The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *J Clin Invest* **104**(6): 787-794.
- Wiederkehr, A. and C. B. Wollheim (2012). "Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic beta-cell." *Mol Cell Endocrinol* **353**(1-2): 128-137.
- Wojtusciszyn, A., M. Armanet, et al. (2008). "Insulin secretion from human beta cells is heterogeneous and dependent on cell-to-cell contacts." *Diabetologia* **51**(10): 1843-1852.
- Wu, P., L. Yang, et al. (2010). "The relationship between GPR40 and lipotoxicity of the pancreatic beta-cells as well as the effect of pioglitazone." *Biochem Biophys Res Commun* **403**(1): 36-39.
- Xiao, C., A. Giacca, et al. (2006). "Differential effects of monounsaturated, polyunsaturated and saturated fat ingestion on glucose-stimulated insulin secretion, sensitivity and clearance in overweight and obese, non-diabetic humans." *Diabetologia* **49**(6): 1371-1379.
- Zain, M. and F. R. Awan (2014). "Mini review: Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS): Its biology and drug targets for treating diabetic nephropathy." *Pak J Pharm Sci* **27**(5): 1379-1391.
- Zheng, X., X. Wang, et al. (2012). "Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic beta-cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP." *Cell Death Dis* **3**: e322.
- Zhou, Y. P. and V. Grill (1995). "Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans." *J Clin Endocrinol Metab* **80**(5): 1584-1590.
- Zraika, S., K. Aston-Mourney, et al. (2006). "The influence of genetic background on the induction of oxidative stress and impaired insulin secretion in mouse islets." *Diabetologia* **49**(6): 1254-1263.

## 5. Annexes

### 5.1 Article en collaboration (en révision)

Dans le cadre d'une collaboration initiée en 2012 avec Jérémie Bellien et Clothilde Roche du Laboratoire Inserm U1096 de Rouen, nous avons participé à l'étude des effets cardiovasculaires et métaboliques du t-AUCB ; un inhibiteur de l'enzyme sEH (Epoxyhydrolase soluble) chez des souris nourries durant 16 semaines avec un régime enrichi en lipides (HFD) avec ou sans t-AUCB ou glibenclamide comme molécule antidiabétique contrôle. Cette étude n'ayant pas fait partie du projet de thèse, elle est présentée en annexe sous la forme de l'article de Clothilde Roche et al. en cours de révisions au journal scientifique AJP-Heart and Circulatory Physiology.

## **Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese type 2 diabetic mice**

Authors: Clothilde Roche<sup>1,2</sup>, Marie Besnier<sup>1,2,\*</sup>, Roméo Cassel<sup>3,\*</sup>, Najah Harouki<sup>1,2</sup>, David Coquerel<sup>1,2</sup>, Dominique Guerrot<sup>1,2,4</sup>, Lionel Nicol<sup>1,2</sup>, Emmanuelle Loizon<sup>3</sup>, Christophe Morisseau<sup>5</sup>, Paul Mulder<sup>1,2</sup>, Antoine Ouvrard-Pascaud<sup>1,2</sup>, Anne-Marie Madec<sup>3</sup>, Vincent Richard<sup>1,2,6</sup>, Jeremy Bellien<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1096, Rouen, France

<sup>2</sup>University of Rouen, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France

<sup>3</sup> INSERM U1060-CarMeN / INRA 1235 / Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins, France

<sup>4</sup>Department of Nephrology, Rouen University Hospital, Rouen, France

<sup>5</sup>Department of Entomology and Nematology, and UCD comprehensive Cancer Center, University of California, Davis, CA

<sup>6</sup>Department of Pharmacology, Rouen University Hospital, Rouen, France

\*Both authors contributed equally to this work

CR, MB, RC, NH, DC, DG, LN, EL, CM, PM, and AOP. collected and analyzed the data. AMM designed and supervised the metabolic experiments, interpreted the data and made critical revision of the manuscript. VR supervised the experiments and made critical revision of the manuscript. JB designed and supervised the cardiovascular experiments, interpreted the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Running head: Cardiovascular impact of sEH inhibition in type 2 diabetes

Correspondence: Dr Jeremy Bellien, Service de Pharmacologie, CHU de Rouen, 76031 Rouen Cedex, France. Tel : +33232889030, Fax : +33232889049, Email: [jeremy.Bellien@chu-rouen.fr](mailto:jeremy.Bellien@chu-rouen.fr)

## ABSTRACT

This study addressed the hypothesis that inhibiting the soluble epoxide hydrolase (sEH)-mediated degradation of epoxy-fatty acids, notably epoxyeicosatrienoic acids, has an additional impact against cardiovascular damage in type 2 diabetes, beyond its previously demonstrated beneficial effect on glucose homeostasis. The cardiovascular and metabolic effects of the sEH inhibitor *t*-AUCB (10 mg/l in drinking water) were compared to those of the sulfonylurea glibenclamide (80 mg/l), both administered for 8 weeks in FVB mice subjected to a high-fat diet (HFD, 60% fat) for 16 weeks. Mice on control chow diet (10% fat) and non-treated HFD mice served as controls. Glibenclamide and *t*-AUCB similarly prevented the increased fasting glycemia in HFD mice but only *t*-AUCB improved glucose tolerance and decreased gluconeogenesis, without modifying weight gain. Moreover, *t*-AUCB reduced adipose tissue inflammation, plasma free fatty acids and LDL cholesterol, and prevented hepatic steatosis. Furthermore, only the sEH inhibitor improved endothelium-dependent relaxations to acetylcholine, assessed by myography in isolated coronary arteries. This improvement was related to a restoration of epoxyeicosatrienoic acid and nitric oxide pathways, as shown by the increased inhibitory effects of the NO-synthase and cytochrome P450 epoxygenase inhibitors, L-NA and MSPPOH, on these relaxations. Moreover, *t*-AUCB decreased cardiac hypertrophy, fibrosis and inflammation, and improved diastolic function, as demonstrated by the increased E/A ratio (echocardiography) and decreased slope of the end-diastolic pressure-volume relation (invasive hemodynamics). These results demonstrate that sEH inhibition improves coronary endothelial function and prevents cardiac remodeling and diastolic dysfunction in obese type 2 diabetic mice.

Keywords: Type 2 diabetes, soluble epoxide hydrolase, endothelium, cardiac function.

## GLOSSARY

BK<sub>Ca</sub>: large-conductance calcium-activated potassium channels

CYP450: cytochrome P450

EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor

EET: epoxyeicosatrienoic acid

eNOS: endothelial NO-synthase

GTT: glucose tolerance test

HFD: high-fat diet

IK<sub>Ca</sub>: intermediate-conductance calcium-activated potassium channels

IL: interleukin

ITT: insulin tolerance test

K<sub>Ca</sub>: calcium-activated potassium channels

L-NA: *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine

LV: left ventricular

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MSPPOH: *N*-methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)-hexanamide

PTT: pyruvate tolerance test

sEH: soluble epoxide hydrolase

SK<sub>Ca</sub>: small-conductance calcium-activated potassium channels

*t*-AUCB: *trans*-4-[4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy]-benzoic acid

TNF $\alpha$  tumor necrosis factor-alpha

## INTRODUCTION

Endothelial dysfunction and accelerated atherosclerosis, secondary to the chronic pro-inflammatory state generated by hyperinsulinemia, hyperglycemia and dyslipidemia, play a critical role in the development of cardiovascular complications of type 2 diabetes (9,13,19). However, the strict control of glycemia and of traditional cardiovascular risk factors does not improve cardiovascular outcomes in type 2 diabetic patients, and new therapeutic strategies are needed (19,20).

In this context, pharmacological therapies targeting both the metabolic and cardiovascular abnormalities in type 2 diabetes would be ideal candidates. An emerging pharmacological approach consists in inhibiting soluble epoxide hydrolase (sEH), which is an ubiquitously distributed enzyme that rapidly metabolizes epoxy-fatty acids, in particular epoxyeicosatrienoic acids (EETs), into their corresponding less active diols (3,17). EETs synthesized in endothelial cells by cytochrome P450 (CYP450) epoxygenases contribute to the regulation of vascular tone by acting as endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHF) through the activation of calcium-activated potassium ( $K_{Ca}$ ) channels, and display potent effects against inflammation and remodeling (3,4,17). In addition, CYP450 epoxygenases and sEH are expressed in metabolic organs and locally synthesized EETs appear to contribute to the regulation of glucose and lipid homeostasis (3,17).

Recent evidence indicates that CYP450 epoxygenase overexpression or sEH inhibition/genetic deletion improve glucose homeostasis in diabetes by increasing both insulin release and sensitivity (11,12,21). However, the associated impact on endothelial dysfunction and cardiac alterations remains to be thoroughly investigated in particular in a context of type 2 diabetes. Indeed, in insulin-resistant animals, endothelial dysfunction is associated with modifications in the vascular expression of CYP450, sEH and  $K_{Ca}$  channels, thus giving indirect evidence for the presence of an altered EET pathway at the cardiovascular level (16,23). Finally, whether sEH inhibition prevents adipose tissue inflammation, which triggers the development of insulin resistance, and/or improves lipid homeostasis remains largely unknown (5).

Thus, the aim of the present study was to compare, in a murine model of type 2 diabetes, the effects of the chronic administration of a sEH inhibitor to those of a "pure" prevention of hyperglycemia by a sulfonylurea on cardiovascular damage, with particular emphasis on endothelial function, cardiac function and structure, as well as on metabolic abnormalities.

## MATERIALS AND METHODS

The protocol was approved by a local institutional review committee and conducted in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Animal model and treatments

Male FVB/N mice (Janvier), 6-8 weeks of age, weighing 26-30g were used for these experiments. This strain was chosen based on our previous studies showing that, in accordance with our findings in humans, EETs contribute with NO to endothelium-dependent responses in arteries isolated from these mice (2,6). Mice were fed with either a standard chow diet (control mice, n=40, D12450B, 10% energy by fat, Research Diets) or a high-fat diet (HFD, n=136, D12492B, 60% energy by fat, Research Diets) for 16 weeks. Eight weeks after starting the HFD, mice were randomized to receive either the potent sEH inhibitor *trans*-4-(4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy)-benzoic acid (*t*-AUCB: 10 mg/l in drinking water, n=48) or glibenclamide (80 mg/l, n=42; Sigma-Aldrich) or were not treated (n=46) for the remaining 8 weeks (7). Animal body weight along with food and caloric intake were monitored weekly. Blood pressure and heart rate were monitored every 4 weeks in trained conscious animals using a non-invasive computerized tail-cuff system (CODA 2, Kent Scientific) (6). The blood level of *t*-AUCB was quantified by LC-MS/MS (7).

### Coronary vascular studies

Coronary vascular reactivity was evaluated at W8 and W16 by myography (Dual Wire Myograph System, Danish Myo Technology). For this purpose, mice were anesthetized (3.6 mg/kg xylazine, 90 mg/kg ketamine) and the heart was immediately removed and placed in cold, oxygenated Krebs buffer. A segment of the septal coronary artery, 1 mm-long and ~100  $\mu$ m in diameter, was carefully dissected and mounted in a small vessel myograph for isometric tension recording. All measurements were performed after vessel contraction with  $10^{-5}$  M serotonin and pharmacological inhibitors were applied for 30 minutes before assessing the relaxant responses. The endothelium-dependent relaxations to acetylcholine ( $10^{-9}$  to  $10^{-4.5}$  M) were assessed in the absence and in the presence of the NO-synthase inhibitor *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NA,  $10^{-4}$  M) and the CYP450 epoxygenase inhibitor *N*-methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)-hexanamide (MSPPOH,  $10^{-4}$  M) (6). Endothelium-independent relaxations to the NO donor sodium nitroprusside ( $10^{-9}$  to  $10^{-4.5}$  M). In addition, the coronary relaxing responses to NS1619, an opener of large-conductance calcium-activated potassium (BK<sub>Ca</sub>) channels NS1619 ( $10^{-6}$  to  $10^{-4.5}$  M), which are the main smooth muscle cellular targets of EETs mediating their hyperpolarizing effect, were assessed (3,6). Furthermore, the coronary relaxing responses to NS309, an opener of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium (SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub>) channels ( $10^{-8}$  to  $10^{-5}$  M), which mediate the classical EDH response without necessary involvement of a chemical factor, were assessed (3,6). Coronary protein expressions of eNOS, sEH and BK<sub>Ca</sub> channels were determined by Western-blot analysis, and results were normalized to actin level (6,15).

## Cardiac evaluations

In mice anesthetized with isoflurane (1 to 2%), left ventricular (LV) dimensions and function were assessed at W0, W8, and W16, using a Vivid 7 ultrasound device (GE medical) (6,15). The heart was imaged in the 2D mode in the parasternal short axis view. With the use of M mode image, LV end-diastolic (EDD) and systolic diameters (ESD), and end-diastolic LV wall thickness were measured. Ejection fraction (EF) was calculated from the LV cross-sectional area as  $EF (\%) = ((LVDA - LVSA) / LVDA) \times 100$  where LVDA and LVSA are LV diastolic and systolic area, estimated from EDD and ESD. In addition, a pulsed Doppler of the LV outflow was performed to obtain heart rate (HR) and velocity time integral (VTI) allowing the calculation of stroke volume ( $SV = \pi \times LV \text{ outflow radius}^2 \times VTI$ ) and cardiac output ( $CO = SV \times HR$ ). Furthermore, Doppler measurements were made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view, allowing to determine peak early (E) and late (A) mitral inflow velocities, and calculation of the E/A ratio.

Myocardial perfusion was assessed at W16 by cardiac magnetic resonance imaging (MRI) in anesthetized mice using a 4.7 T horizontal bore scanner (Bruker) and the arterial spin labelling technique (15).

LV hemodynamics were assessed at W16 in anesthetized mice (6,15). A 2F miniaturized combined conductance catheter-micromanometer (model SPR-838, Millar) connected to a pressure-conductance unit (MPCU-200, Millar) was introduced in the carotid artery and advanced into the left ventricle. LV pressure-volume loops were recorded at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab, allowing the calculation of LV end-systolic and end-diastolic pressures, LV  $dP/dt_{min/max}$ , LV relaxation constant tau (Weiss method) and LV end-systolic and end-diastolic pressure-volume relations as indicators of load-independent LV passive elastance and compliance function respectively.

Finally, the heart was harvested, the ventricles were weighed and a section of the left ventricle was snap frozen for subsequent determination of LV collagen density, using 8-micrometer-thick histological slices stained with Sirius Red. Leukocyte infiltration was assessed by the quantification of CD45-positive cells by immunohistochemistry. The LV protein expression of sEH, phospho-Akt (pAkt, serine 473), which mediate some of the cardioprotective effects of EETs, and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) was determined by Western-blot analysis (6,15).

## Metabolic parameters

Fasting glucose and insulin levels were determined before (W0), 8 weeks (W8) and 16 weeks (W16) after starting normal chow diet or HFD. Briefly, after a 16-hour fast, glycemia was measured in blood collected from the tail using a glucometer (StatStrip Xpress, Nova Biomedical), and insulin was determined in plasma, obtained from retro-orbital blood collection in mice anesthetized with isoflurane (1 to 2%), by an enzyme-linked immunosorbent assay (Ultra Sensitive Insulin mouse Assay, Crystal Chem Inc). Glucose, pyruvate and insulin tolerance tests (GTT, PTT and ITT, respectively) were performed at W16 to assess glucose tolerance, neoglucogenesis and peripheral insulin sensitivity respectively. For glucose and pyruvate

tolerance tests, mice were fasted for 16 hours and glucose or pyruvate were administered by gavage at the dose of 2 mg/g body weight. For insulin tolerance test, mice were fasted for 6 hours and human insulin (1 mU/g, Actrapid, Novo Nordisk A/S) was administered i.p. For all tests, blood glucose values were measured just before and 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after administration.

Plasma LDL cholesterol, triglycerides and free fatty acids were measured at W16 by enzyme-linked immunosorbent assays (EHDL-100, EFFA-100 and ETGA-200, BioAssay Systems). For determination of hepatic steatosis, freshly dissected livers were frozen and cryostat sections 8- $\mu$ m thick were further processed for Oil Red O lipid staining.

The mRNA expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-10, endothelial NO-synthase (eNOS), the macrophage marker CD68, and TATA-binding protein as a reference gene was assessed by real-time RT-PCR in epididymal white adipose tissue.

### Statistical analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  SEM. The Shapiro-Wilk test was used to assess normality. In order to evaluate the effect of HFD, all parameters obtained in control and HFD mice were compared by unpaired t-test or nonparametric Wilcoxon rank-sum test as appropriate. In order to evaluate the effect of the pharmacological treatments, non-treated HFD mice and HFD mice treated with either glibenclamide or *t*-AUCB were compared using one-way ANOVA or nonparametric Kruskal-Wallis test as appropriate, followed, in case of significance, by Tukey-Kramer test or Dunn's test for multiple comparisons. Coronary experiments, GTT, ITT and PTT were analyzed by repeated-measured ANOVA for serial measurements. Statistical analysis was performed with NCSS software (version 07.1.14). A two-sided  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

At W16, the blood concentration of *t*-AUCB in HFD mice treated for 8 weeks was  $16.2 \pm 7.1$  nmol/l ( $n=11$ ), higher than the  $IC_{50}$  determined *in vitro*, using the recombinant murine sEH enzyme (8 nM) (7). Food intake was similar between groups, but caloric intake was higher in non-treated HFD mice compared with control mice, resulting in a higher body weight gain (Figure 1). These parameters were not affected by glibenclamide nor by *t*-AUCB.

### Effects of sEH inhibition on coronary vascular reactivity

Compared with control mice, the coronary endothelium-dependent relaxations to acetylcholine were markedly reduced in non-treated HFD mice at W16 (Figure 2A). L-NA decreased these relaxations in both groups but this decrease was lesser in HFD mice compared with control mice (Figure 2B;  $-21 \pm 4\%$  vs  $-33 \pm 5\%$  at  $3 \times 10^{-5}$  M acetylcholine,  $P < 0.01$ ), showing an altered NO pathway. MSPPOH further decreased these relaxations in control but not in HFD mice (Figure 2B), demonstrating the abolition of EET pathway. Coronary relaxations to sodium nitroprusside (Figure 2C) were slightly decreased in HFD mice as well as, more markedly, the relaxations to NS309 (Figure 2D) and NS1619 (Figure 2E).

Compared with non-treated HFD mice, glibenclamide further decreased the relaxations to NS1619, without affecting all the other coronary responses (Figure 2). In contrast, *t*-AUCB fully restored the relaxations to acetylcholine (Figure 2A), increased the inhibitory effect of L-NA on these relaxations (Figure 2B;  $-28 \pm 4\%$  at  $3 \times 10^{-5}$  M acetylcholine,  $P < 0.05$  vs non-treated HFD mice) and improved the relaxations to sodium nitroprusside (Figure 2C). Importantly, *t*-AUCB also restored the sensitivity to MSPPOH (Figure 2B). Moreover, the inhibitory effect of MSPPOH was already decreased in non-treated HFD mice at W8 compared with control mice ( $-24 \pm 6\%$  vs.  $-53 \pm 2\%$  at  $3 \times 10^{-5}$  M acetylcholine,  $P < 0.01$ ), showing that *t*-AUCB not only prevents but reverses endothelial dysfunction by restoring EET pathway. Furthermore, *t*-AUCB did not significantly modify the relaxations to NS309 (Figure 2D) and NS1619 (Figure 2E).

Western-blot analysis showed no significant difference between groups for the coronary expressions of sEH and  $BK_{Ca}$  channels but eNOS expression tended to be increased by *t*-AUCB (Figure 3).

### Effects of sEH inhibition on hemodynamics, cardiac function and structure

Peripheral blood pressure and heart rate remained similar between groups from W0 to W16 (Table 1). Echocardiography showed a progressive increase in LV end-diastolic anterior and posterior wall thicknesses from W0 to W16 in non-treated HFD mice compared with control mice, without change in LV end-diastolic diameter (Table 2 and Figures 4A, 4B and 4C). The presence of LV hypertrophy was confirmed at W16 by the higher LV weight to tibia length ratio in HFD mice (Figure 5A). This was associated with an increased LV collagen density (Figure 5B) but a non-significant enhancement of CD45-positive cells (Figure 5C). Western-blot analysis showed no change in the LV protein expressions of pAkt and sEH but an increased expression of NF $\kappa$ B (Figure 5D).

Furthermore, there was a decrease in the E/A ratio from W0 to W16 in non-treated HFD mice compared with control mice, suggesting diastolic dysfunction (Figure 4D and Table 2). Diastolic dysfunction was confirmed by invasive hemodynamics, demonstrating increased slope of the LV end-diastolic pressure-volume relationship, indicator of load-independent LV passive compliance, in HFD mice, while LV end-diastolic pressure, dP/dt<sub>min</sub> and relaxation constant tau were not significantly modified (Table 2). In contrast, systolic function remained similar between groups, as shown by the absence of difference for cardiac output and ejection fraction (Figures 4E and 4F, and Table 2), as well as for end-systolic pressure, dP/dt<sub>max</sub> and slope of the end-systolic pressure-volume relationship (Table 2). Finally, myocardial perfusion was reduced in non-treated HFD mice (10.6±0.7 ml/min/g, n=9) compared with control mice (12.5±1.0 ml/min/g, n=10, *P*<0.001).

LV remodeling was not affected by glibenclamide but was improved by *t*-AUCB, as shown at W16 by their decreased LV anterior and posterior wall thicknesses, without change in LV end-diastolic diameter (Table 2). Similarly, *t*-AUCB but not glibenclamide significantly reduced LV weight, collagen density, CD45-positive cells, NF- $\kappa$ B expression and increased LV pAkt expression (Figure 5).

Furthermore, only *t*-AUCB improved cardiac diastolic dysfunction, as shown by the increased E/A ratio and the decreased LV end-diastolic pressure-volume relationship, compared with non-treated HFD mice (Table 2). Cardiac systolic function was not altered either by glibenclamide or *t*-AUCB (Table 2). Finally, myocardial perfusion was not affected by glibenclamide (11.2±1.2 ml/min/g, n=11) nor by *t*-AUCB (10.6±1.1 ml/min/g, n=11) compared with non-treated HFD mice.

#### Effects of sEH inhibition on metabolic parameters

Compared with control mice, there was an increase in fasting glucose and insulin levels at W8 and W16 in non-treated HFD mice (Table 1). In addition, GTT, PTT and ITT were impaired at W16 in HFD mice (Figure 6), further demonstrating the development of insulin resistance and diabetes.

Regarding plasma lipids, non-treated HFD mice had increased free fatty acids (Figure 7A) and LDL cholesterol (Figure 7B) compared with control mice, without change in triglyceride levels (Figure 7C). Moreover, there was an increased hepatic lipid content in HFD mice (Figure 7D). In adipose tissue, the mRNA expression of eNOS was decreased while the expressions of MCP-1, TNF- $\alpha$  and CD68 were increased, without change in IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-10 (Table 3).

The increase in fasting glycemia at W16 was similarly prevented by glibenclamide and *t*-AUCB while fasting insulinemia remained unchanged (Table 1). Only *t*-AUCB improved GTT and PTT, without affecting ITT (Figure 6).

Only *t*-AUCB significantly prevented the increase in plasma free fatty acids and LDL cholesterol, and reduced triglyceride levels (Figures 7A, 7B and 7C). At last, *t*-AUCB but not glibenclamide prevented hepatic steatosis (Figure 7D), as well as the decreased expression of eNOS and the increased expressions of MCP-1, TNF- $\alpha$ , CD68 in adipose tissue (Table 3).

## DISCUSSION

The major finding of this study is that the chronic administration of a sEH inhibitor not only prevents hyperglycemia but also improves cardiovascular function and structure in a model of type 2 diabetes.

High-fat feeding in FVB mice was associated with the development of type 2 diabetes, illustrated by the progressive increase in fasting insulinemia and glycemia, and confirmed by glucose intolerance and insulin resistance. Moreover, the altered PTT showed an enhanced gluconeogenesis, which is a main mechanism of the increased fasting glycemia (18). Furthermore, adipose tissue activation were demonstrated in HFD mice by the decreased eNOS expression and the increased expressions of TNF $\alpha$ , MCP-1 and CD68, and in circulating levels of free fatty acids. The associated hepatic steatosis may contribute to alter lipid metabolism, illustrated by the increase in plasma LDL cholesterol.

Regarding the cardiovascular function and structure, we first observed the presence of a prominent endothelial dysfunction in coronary arteries of HFD mice, as previously observed in other vascular beds in animal models of insulin resistance (8,22). However, we demonstrated for the first time that a progressive alteration in EET pathway is a major contributor, as shown by the decrease at W8 and the complete loss at W16 of the inhibitory effect of MSPPOH on the coronary relaxations to acetylcholine in HFD mice. Because coronary sEH expression was not increased, an increased activity of sEH may exist, as previously observed in adipocytes of HFD mice (4). Additionally, a decreased activity of BK<sub>Ca</sub> channels, which are the main cellular targets of EETs mediating their hyperpolarizing effects, probably contributes. Indeed, there was an altered coronary relaxation to the opener of these channels NS1619, without change in protein expression in HFD mice. Moreover, the reduced relaxing responses to NS309 suggest that, in addition to EETs, the classical EDH response mediated by endothelial SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels is altered in HFD mice. In addition, our results also show an alteration in NO pathway, illustrated by the decreased responsiveness to L-NA in HFD mice associated to the decrease in smooth muscle sensitivity to exogenous NO. Furthermore, although HFD mice did not exhibit blood pressure elevation in these conditions, LV hypertrophy, fibrosis and inflammation were observed, demonstrating the development of a cardiac maladaptive remodeling. Moreover echocardiography and LV hemodynamics showed the development of diastolic dysfunction. Finally, myocardial perfusion was reduced in HFD mice, maybe contributing to alter cardiac function and structure (1).

In this context, sEH inhibition with *t*-AUCB reversed the increase in fasting glycemia in HFD mice and importantly, this hypoglycemic effect was of similar magnitude to that obtained with the insulin secretagogue glibenclamide, without modification in weight gain. Prevention of hyperglycemia has been previously obtained in animal models of type 2 diabetes using sEH inhibition/gene deletion or CYP450 epoxygenase overexpression (16,22,23). Regarding the mechanisms of the hypoglycemic effect of sEH inhibitors, it can be assumed that the impact of such strategies on insulin resistance is inconstant, varying with the models and methods used and the period of investigations chosen after disease onset (10,16). In this work, *t*-AUCB partially prevented the increase in fasting insulinemia, glucose intolerance and altered gluconeogenesis, without affecting ITT. These results suggest an improvement in insulin sensitivity mainly at the hepatic but less at the muscular level. In addition, both drugs appeared to improve lipid homeostasis, but only the effects of *t*-AUCB were significant. This difference may be notably

related to the prevention of adipose tissue activation, which triggers systemic inflammation and insulin resistance in obesity (5). In fact, *t*-AUCB alleviated in fat tissues the increased mRNA expression of proinflammatory cytokines and CD68 and the decreased eNOS expression, as well as it normalized free fatty acids and triglycerides. In addition, the decrease in hepatic steatosis probably contributed to improve hepatic function, as shown by the normalization of plasma LDL cholesterol (10).

Furthermore, sEH inhibition reversed the endothelial dysfunction of coronary arteries in HFD mice, while glibenclamide did not, beside a similar hypoglycemic effect. Previous studies reported a protective effect of sEH inhibitors on the endothelial function of diabetic mesenteric arteries and aortas but the mechanisms involved were not identified (8,22). In this study, we show an improvement in EET availability, as expected from the prevention of EET degradation by *t*-AUCB, but without complete restoration of BK<sub>Ca</sub> channels activity. Moreover, sEH inhibition improved the NO-mediated coronary relaxation, an effect that may be related to the restoration of smooth muscle reactivity to NO and to an enhanced NO production by EETs (3,15). Surprisingly, this was not accompanied by a restoration of myocardial perfusion. This may be related to the need for a higher duration of follow-up or to the fact that the classical EDH pathway, which is not affected by *t*-AUCB, plays a role at this level. Nonetheless, *t*-AUCB, but not glibenclamide, prevented cardiac diastolic function, as shown by the improvement in LV compliance, together with opposing the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in HFD mice. These effects are probably related to the decrease in LV leukocyte infiltration and inflammation, illustrated by the reduction in CD45-positive cells and in NF- $\kappa$ B protein expression, and to the increase in pAkt, which mediate some cardiac protective effects of EETs (3,15,17). Accordingly, one recent study showed that the genetic modulation of EET pathway through CYP450 epoxygenase overexpression protects streptozotocin-induced diabetic mice from the development of cardiac remodeling and dysfunction (13).

## CONCLUSION

Altogether, these results show that the pharmacological inhibition of sEH reverses coronary endothelial dysfunction, and prevents the early development of cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction in a murine model of type 2 diabetes, beyond its glucose-lowering effect. This positive impact on cardiovascular damage, together with the improvement in metabolic homeostasis, prompts sEH inhibition as a novel and valuable therapeutic perspective in type 2 diabetes. At this time, sEH inhibitors have entered the first phases of clinical development and our data strongly support the growing interest for this treatment in insulin resistant and type 2 diabetic patients.

## **GRANT**

This study was funded by a grant from the Fondation de France (2011-20459) and by NIEHS Superfund Basic Research Program grant (P42 ES04699).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Alexandre Gueret, Julie Favre, Brigitte Dautreaux and Annie Lejeune (Inserm U1096) for their technical support, Dr. Hua Dong (University of California, Davis) for the quantification of *t*-AUCB in blood, Stéphanie Chanon for her technical assistance in cryostat sections of mouse liver and the genomic platform of INSERM 1060-CarMeN.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. **Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry JP, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F, Bauer F, Cao Y, Thuillez C, Mulder P, Richard V, Brakenhielm E.** Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation* 124: 1059-1069, 2011.
2. **Bellien J, Iacob M, Remy-Jouet I, Lucas D, Monteil C, Gutierrez L, Vendeville C, Dreano Y, Mercier A, Thuillez C, Joannides R.** Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered NO and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension. *Circulation* 125: 1266-1275, 2012.
3. **Bellien J, Joannides R, Richard V, Thuillez C.** Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol Ther* 131: 1-17, 2011.
4. **De Taeye BM, Morisseau C, Coyle J, Covington JW, Luria A, Yang J, Murphy SB, Friedman DB, Hammock BB, Vaughan DE.** Expression and regulation of soluble epoxide hydrolase in adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* 18: 489-498, 2010.
5. **Fuentes E, Fuentes F, Vilahur G, Badimon L, Palomo I.** Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators Inflamm* 2013: 136584, 2013.
6. **Gao J, Bellien J, Gomez E, Henry JP, Dautreux B, Bounoure F, Skiba M, Thuillez C, Richard V.** Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension. *J Hypertens* 29: 1128-1135, 2011.
7. **Hwang SH, Tsai HJ, Liu JY, Morisseau C, Hammock BD.** Orally bioavailable potent soluble epoxide hydrolase inhibitors. *J Med Chem* 50: 3825-3840, 2007.
8. **Iyer A, Kauter K, Alam MA, Hwang SH, Morisseau C, Hammock BD, Brown L.** Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase ameliorates diet-induced metabolic syndrome in rats. *Exp Diabetes Res* 2012: 758614, 2012.
9. **Laakso M.** Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: the Kelly West Award Lecture 2008. *Diabetes Care* 33: 442-449, 2010.
10. **Liu Y, Dang H, Li D, Pang W, Hammock BD, Zhu Y.** Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates high-fat-diet-induced hepatic steatosis by reduced systemic inflammatory status in mice. *PLoS One* 7: e39165, 2012.
11. **Luo P, Chang HH, Zhou Y, Zhang S, Hwang SH, Morisseau C, Wang CY, Inscho EW, Hammock BD, Wang MH.** Inhibition or deletion of soluble epoxide hydrolase prevents hyperglycemia, promotes insulin secretion, and reduces islet apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 430-438, 2010.
12. **Luria A, Bettaieb A, Xi Y, Shieh GJ, Liu HC, Inoue H, Tsai HJ, Imig JD, Haj FG, Hammock BD.** Soluble epoxide hydrolase deficiency alters pancreatic islet size and improves glucose homeostasis in a model of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9038-9043, 2011.
13. **Ma B, Xiong X, Chen C, Li H, Xu X, Li X, Li R, Chen G, Dackor RT, Zeldin DC, Wang DW.** Cardiac-specific overexpression of CYP2J2 attenuates diabetic cardiomyopathy in male streptozotocin-induced diabetic mice. *Endocrinology* 154: 2843-2856, 2013.
14. **Mazzone T, Chait A, Plutzky J.** Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet* 371: 1800-1809, 2008.
15. **Merabet N, Bellien J, Glevarec E, Nicol L, Lucas D, Jouet I, Bounoure F, Dreano Y, Wecker D, Thuillez C, Mulder P.** Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 52: 660-666, 2012.
16. **Miller AW, Dimitropoulou C, Han G, White RE, Busija DW, Carrier GO.**

Epoxyeicosatrienoic acid-induced relaxation is impaired in insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1524-H1531, 2001.

17. **Morisseau C, Hammock BD.** Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 37-58, 2013.

18. **Perriello G, Pampanelli S, Del Sindaco P, Lalli C, Ciofetta M, Volpi E, Santeu-sanio F, Brunetti P, Bolli GB.** Evidence of increased systemic glucose production and gluconeogenesis in an early stage of NIDDM. *Diabetes* 46: 1010-1016, 1997.

19. **Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA.** Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord* 11: 61-74, 2010.

20. **Tandon N, Ali MK, Narayan KM.** Pharmacologic prevention of microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: implications of the results of recent clinical trials in type 2 diabetes. *Am J Cardiovasc Drugs* 12: 7-22, 2012.

21. **Xu X, Zhao CX, Wang L, Tu L, Fang X, Zheng C, Edin ML, Zeldin DC, Wang DW.** Increased CYP2J3 expression reduces insulin resistance in fructose-treated rats and db/db mice. *Diabetes* 59: 997-1005, 2010.

22. **Zhang LN, Vincelette J, Chen D, Gless RD, Anandan SK, Rubanyi GM, Webb HK, MacIntyre DE, Wang YX.** Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. *Eur J Pharmacol* 654: 68-74, 2011.

23. **Zhao X, Dey A, Romanko OP, Stepp DW, Wang MH, Zhou Y, Jin L, Pollock JS, Webb RC, Imig JD.** Decreased epoxygenase and increased epoxide hydrolase expression in the mesenteric artery of obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R188-R196, 2005.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Evolution of food intake (A), caloric intake (B) and weight gain (C) in control mice (n=30), non-treated high-fat diet (HFD) mice (n=28), HFD mice treated with glibenclamide (GLI, n=30) or with *t*-AUCB (n=36). \**P*<0.05 vs. all other groups.

**Figure 2.** Coronary endothelium-dependent relaxations to acetylcholine under basal conditions (A), inhibitory effect of *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NA) and *N*-methylsulfonyl-6-(2-propargyloxyphenyl)-hexanamide (MSPPOH) on the relaxations to 3x10<sup>-5</sup> M acetylcholine (B), endothelium-independent relaxations to sodium nitroprusside (C) and relaxations to NS309 (D) and NS1619 (E), at W16 in control mice, non-treated high-fat diet (HFD) mice, HFD mice treated with glibenclamide (GLI) or with *t*-AUCB (n=4-5 per condition). \**P*<0.05, non-treated HFD vs control; †*P*<0.05, HFD+*t*-AUCB vs non-treated HFD; ‡*P*<0.05, HFD+*t*-AUCB vs HFD+GLI; §*P*<0.05 L-NA vs control conditions; ||*P*<0.05, MSPPOH vs L-NA.

**Figure 3.** Western-blot analysis of left descending coronary artery protein expressions of endothelial NO-synthase (eNOS) (A), soluble epoxide hydrolase (sEH) (B) and large-conductance calcium-activated potassium (BK<sub>Ca</sub>) channels (C), normalized to smooth muscle actin at W16 in control mice (n=6-8), non-treated high-fat diet (HFD) mice (n=5-6), HFD mice treated with glibenclamide (GLI, n=5-6) or with *t*-AUCB (n=6).

**Figure 4.** Evolution of left ventricular end-diastolic (LVED) anterior wall thickness (A), LVED posterior wall thickness (B), LVED diameter (C), E/A ratio (D), cardiac output (E), and ejection fraction (F) in control and non-treated high-fat diet (HFD) mice from week 0 to week 16 (n=6-11 per group). \**P*<0.05 vs. control.

**Figure 5.** Left ventricular (LV) weight-to-tibia length ratio (A), LV collagen density (B), CD45-positive cells (C), and LV protein expression of phospho-Akt (pAkt), nuclear factor-kappa B (NF-κB), soluble epoxide hydrolase (sEH), normalized to actin (D), at W16 in control mice (n=7-16), non-treated high-fat diet (HFD) mice (n=6-15), HFD mice treated with glibenclamide (GLI, n=6-15) or with *t*-AUCB (n=7-18). \**P*<0.05 vs control; †*P*<0.05 vs non-treated HFD; ‡*P*<0.05 vs HFD+GLI.

**Figure 6.** Evolution of glycemia during glucose (A), pyruvate (B) and insulin (C) tolerance tests at W16 in control mice (n=4-8), non-treated high-fat diet (HFD) mice (n=4-10), HFD mice treated with glibenclamide (GLI, n=5-12) or with *t*-AUCB (n=5-11). \**P*<0.05 vs control; †*P*<0.05 vs non-treated HFD; ‡*P*<0.05 vs HFD+GLI.

**Figure 7.** Plasma levels of free fatty acids (A), LDL cholesterol (B), triglycerides (C), and histological scores of lipid content in the liver (D) at W16 in control mice (n=4-9), non-treated high-fat diet (HFD) mice (n=4-8), HFD mice treated with glibenclamide (GLI, n=5-11) or with *t*-AUCB (n=5-10). \**P*<0.05 vs control; †*P*<0.05 vs non-treated HFD; ‡*P*<0.05 vs HFD+GLI.

**Table 1.** Evolution of peripheral blood pressure, heart rate, fasting glycemia and insulinemia from W0 to W16 in control mice, non-treated high-fat diet mice and high-fat diet mice treated with glibenclamide or with *t*-AUCB

Parameters	Control		Non-treated high-fat diet		High-fat diet + glibenclamide		High-fat diet + <i>t</i> -AUCB	
	W0	W8	W0	W8	W0	W8	W0	W8
Systolic blood pressure (mmHg)	106±5	105±6	107±1	103±7	105±5	97±8	107±5	101±7
Diastolic blood pressure (mmHg)	76±3	70±6	72±2	67±6	70±1	66±8	77±5	72±6
Heart rate (bpm)	694±64	673±22	703±31	696±43	751±29	757±28	707±91	750±42
Glycemia (mmol/l)	6.0±0.6	5.6±0.6	6.0±0.7	7.6±0.5*	5.7±0.6	7.6±0.3	5.1±0.3 <sup>†</sup>	8.3±0.4
Insulinemia (mU/l)	10.2±0.1	10.8±1.5	8.9±0.3	13.1±1.1*	10.7±2.1	16.0±2.7	10.0±1.8	16.5±2.3

Values are means ± SEM. \* $P < 0.05$  vs. control, <sup>†</sup> $P < 0.05$  vs. non-treated high-fat diet (n=4-11 per group).

**Table 2.** Echocardiography and invasive hemodynamics

Parameters	Control	Non-treated high-fat diet	High-fat diet + glibenclamide	High-fat diet + t-AUCB
Echocardiography				
LV end-diastolic anterior wall thickness, $\mu\text{m}$	739 $\pm$ 22	956 $\pm$ 23*	957 $\pm$ 23	889 $\pm$ 24 <sup>†‡</sup>
LV end-diastolic posterior wall thickness, $\mu\text{m}$	734 $\pm$ 21	944 $\pm$ 15*	971 $\pm$ 23	865 $\pm$ 27 <sup>†‡</sup>
LV end-diastolic diameter, mm	3.99 $\pm$ 0.09	3.89 $\pm$ 0.09	4.08 $\pm$ 0.06	4.02 $\pm$ 0.05
Stroke volume, $\mu\text{l}$	68.9 $\pm$ 2.2	69.1 $\pm$ 2.1	69.3 $\pm$ 2.0	70.1 $\pm$ 2.4
Heart rate, bpm	539 $\pm$ 8	549 $\pm$ 9	547 $\pm$ 8	541 $\pm$ 8
Cardiac output, ml/min	37.1 $\pm$ 1.4	37.8 $\pm$ 0.9	37.9 $\pm$ 1.1	38.1 $\pm$ 1.6
Ejection fraction, %	82.3 $\pm$ 0.9	80.0 $\pm$ 1.1	78.1 $\pm$ 0.5	81.1 $\pm$ 1.1
E/A ratio	1.25 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.03*	1.07 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.04 <sup>†‡</sup>
Invasive hemodynamics				
LV end-diastolic pressure, mmHg	4.2 $\pm$ 0.6	9.8 $\pm$ 3.5	9.2 $\pm$ 3.6	8.3 $\pm$ 2.3
dP/dt <sub>min</sub> , $-10^{-3}$ mmHg/sec	3275 $\pm$ 161	2461 $\pm$ 391	3186 $\pm$ 836	2691 $\pm$ 368
Tau, ms	7.93 $\pm$ 1.04	16.3 $\pm$ 7.2	9.07 $\pm$ 1.59	7.38 $\pm$ 0.73
LV end-diastolic pressure-volume relation, mmHg/RVU	1.90 $\pm$ 0.55	3.81 $\pm$ 0.61*	3.12 $\pm$ 0.79	1.88 $\pm$ 0.22 <sup>†</sup>
LV end-systolic pressure, mmHg	70.4 $\pm$ 3.1	68.1 $\pm$ 5.7	78.8 $\pm$ 6.9	67.1 $\pm$ 5.8
dP/dt <sub>max</sub> , $-10^{-3}$ mmHg/sec	3226 $\pm$ 253	3036 $\pm$ 394	3196 $\pm$ 312	2546 $\pm$ 243
LV end-systolic pressure volume relation, mmHg/RVU	22.1 $\pm$ 1.9	21.8 $\pm$ 2.3	21.9 $\pm$ 3.5	18.9 $\pm$ 2.1

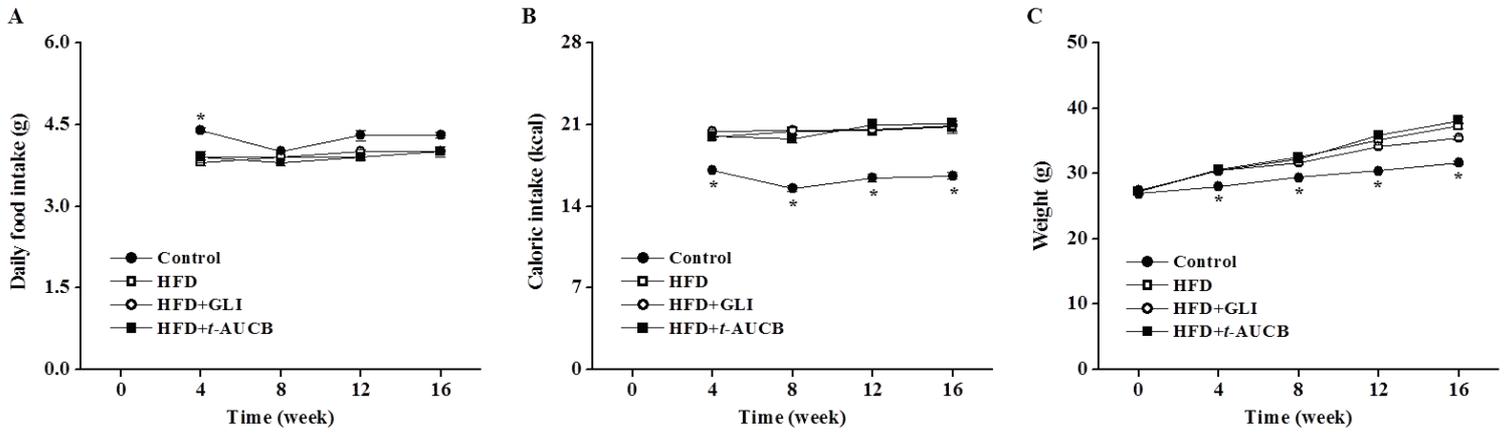
Values are means  $\pm$  SEM. LV, left ventricular. \* $P$ <0.05 vs control, <sup>†</sup> $P$ <0.05 vs non-treated high-fat diet, <sup>‡</sup> $P$ <0.05 vs glibenclamide (n=5-10 per group).

**Table 3.** Adipose tissue mRNA expressions

Parameters (A.U.)	Control	Non-treated high-fat diet	High-fat diet + glibenclamide	High-fat diet + t-AUCB
Tumor necrosis factor- $\alpha$	0.34 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.02*	0.43 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.04 <sup>†</sup>
Monocyte chemoattractant protein-1	0.6 $\pm$ 0.2	4.3 $\pm$ 1.1*	4.0 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.2 <sup>††</sup>
Interleukine-1 $\beta$	222 $\pm$ 51	439 $\pm$ 122	325 $\pm$ 129	294 $\pm$ 40
Interleukine-6	0.35 $\pm$ 0.23	0.69 $\pm$ 0.25	0.35 $\pm$ 0.26	0.15 $\pm$ 0.05
Interleukine-10	0.77 $\pm$ 0.32	0.95 $\pm$ 0.22	0.49 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.09
Endothelial NO-synthase	551 $\pm$ 31	374 $\pm$ 39*	283 $\pm$ 61	588 $\pm$ 35 <sup>††</sup>
CD68	10.5 $\pm$ 1.8	25.5 $\pm$ 3.7*	35.3 $\pm$ 10.9	14.3 $\pm$ 3.3 <sup>††</sup>

Values are means  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05 vs control, <sup>†</sup> $P$ <0.05 vs non-treated high-fat diet, <sup>††</sup> $P$ <0.05 vs glibenclamide (n=4-11 per group).

Figure 1



**Figure 2**

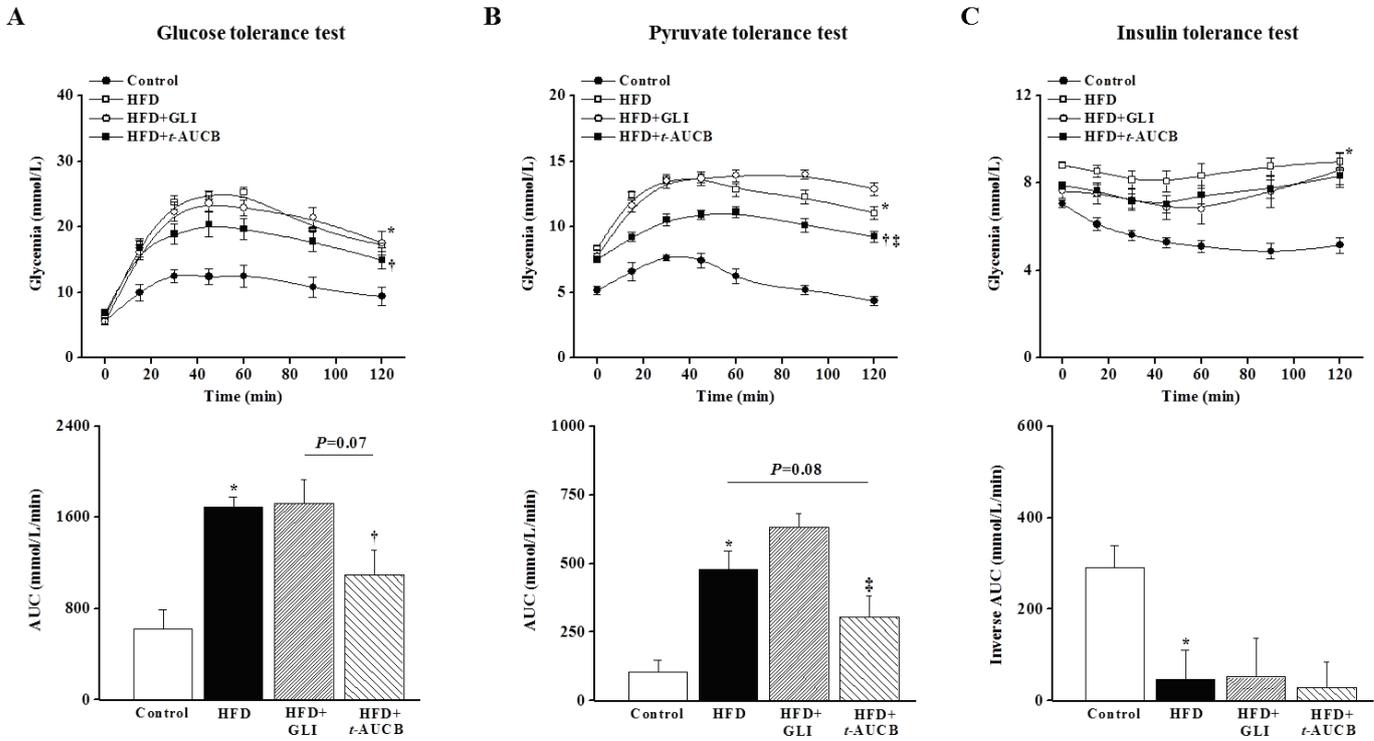


Figure 3

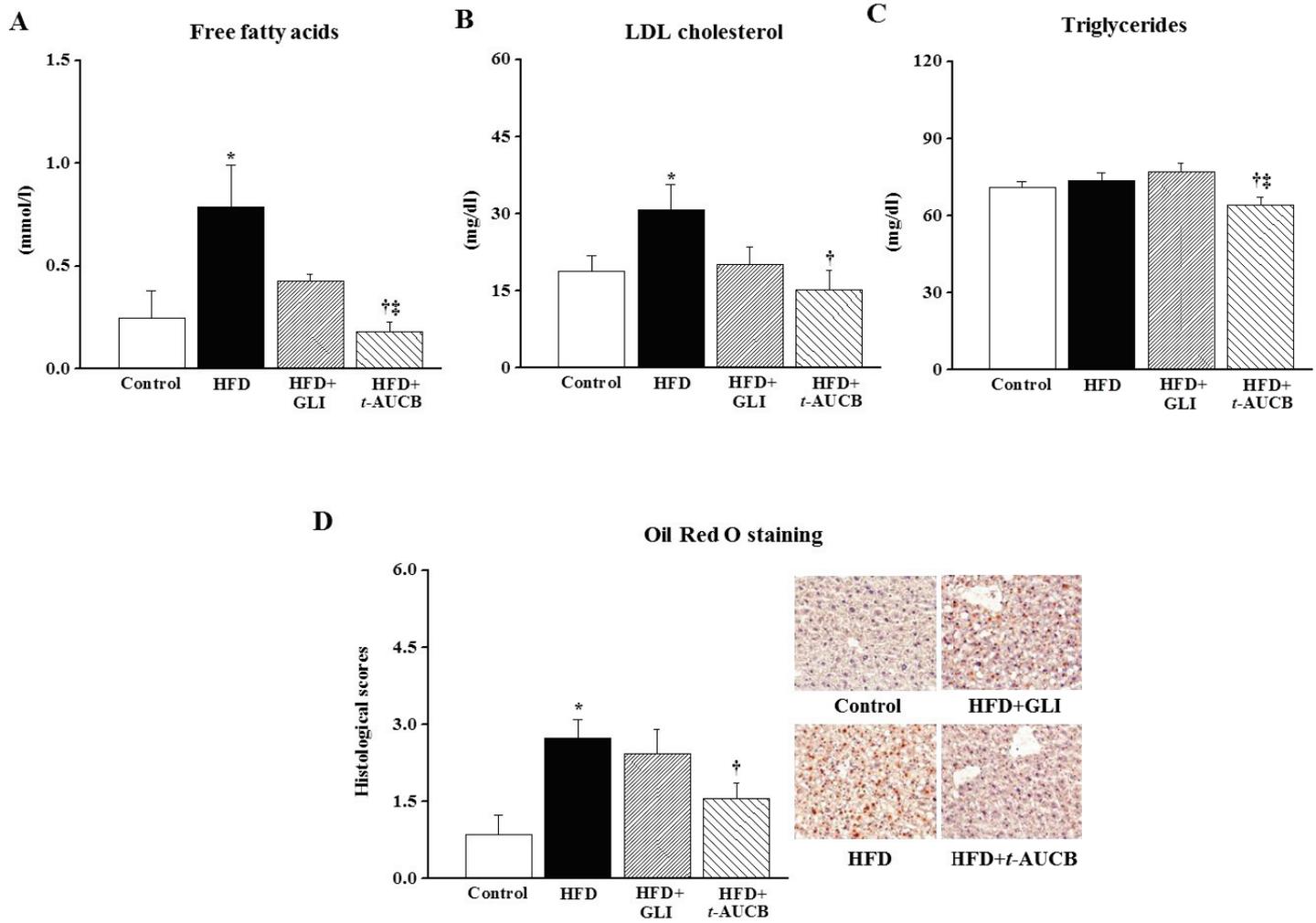


Figure 4

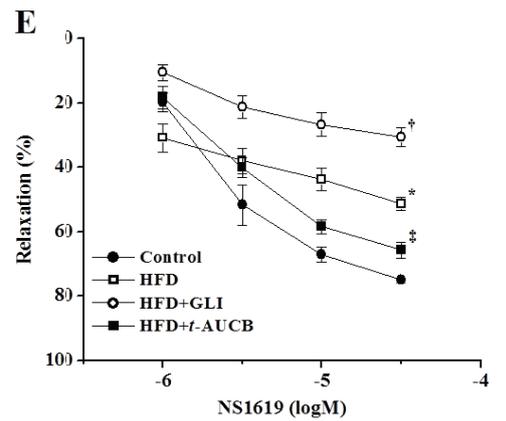
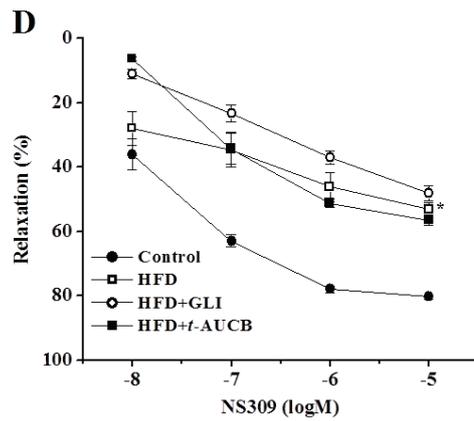
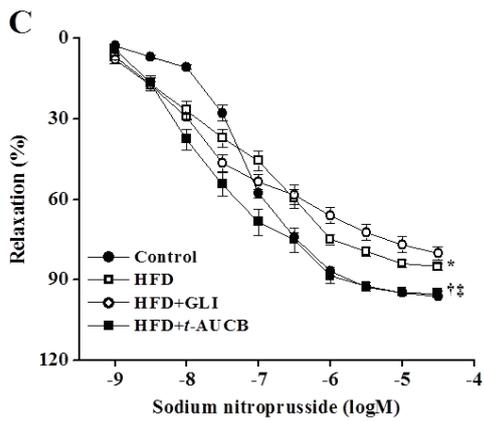
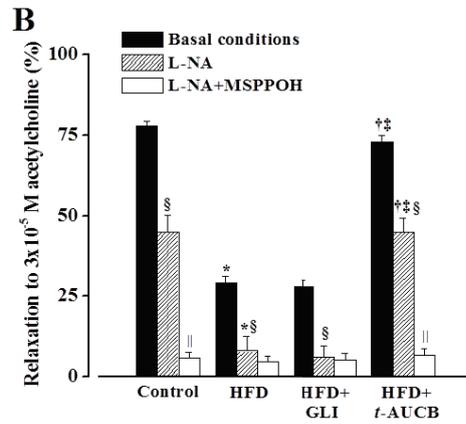
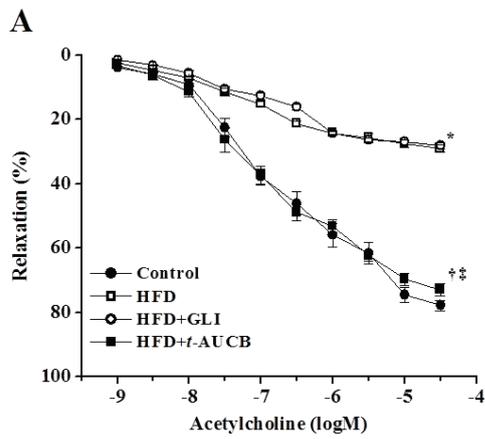


Figure 5

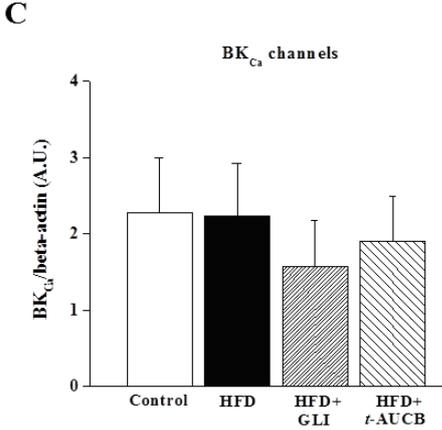
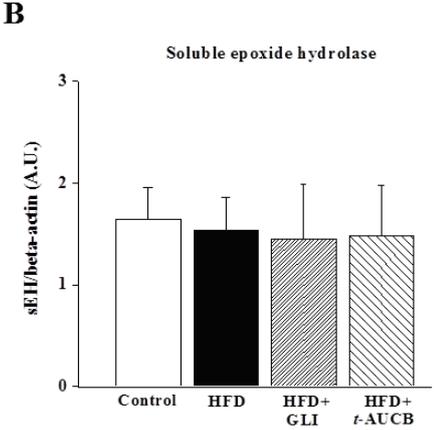
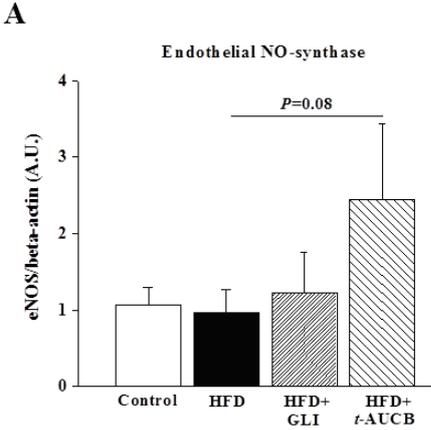
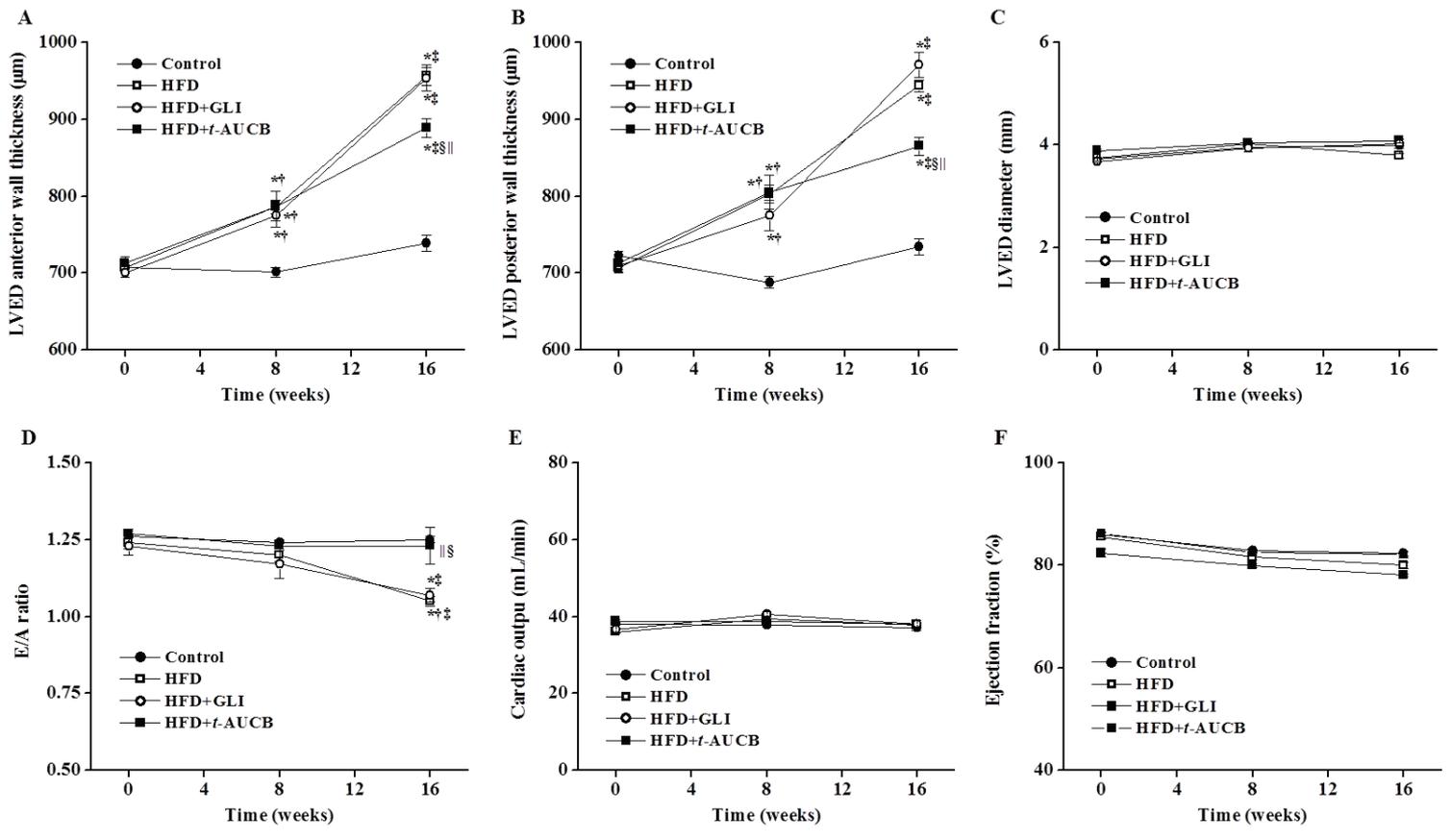


Figure 6



**Figure 7**

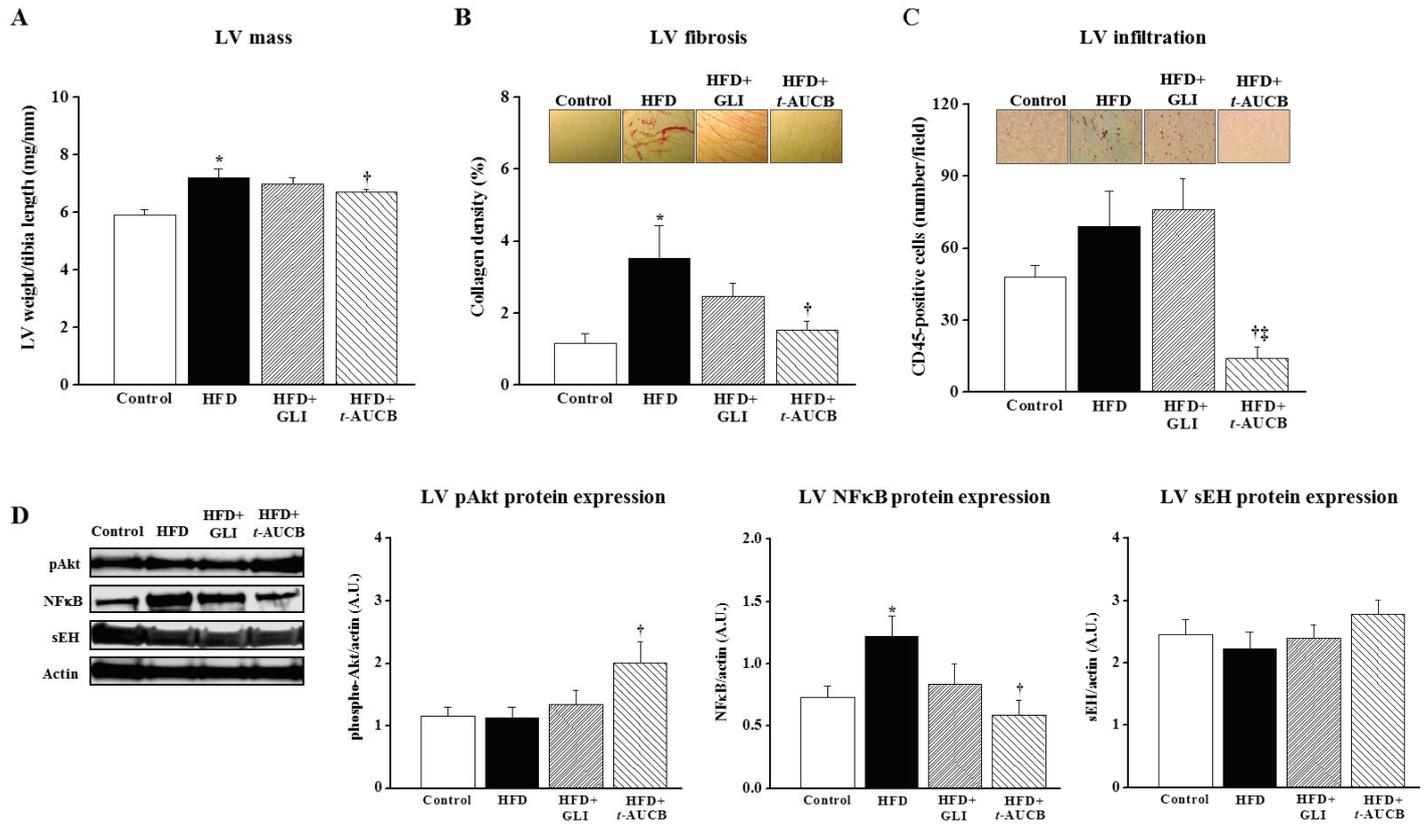
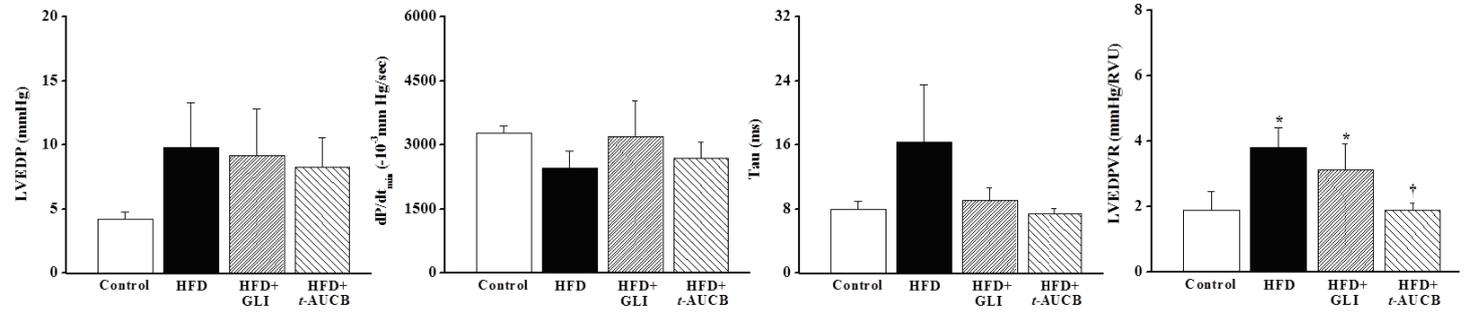
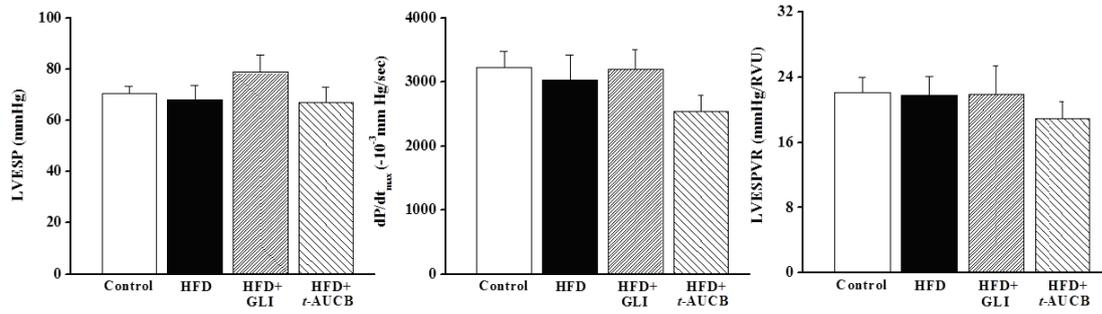


Figure 8

A



B



## 5.2 Congrès et formations suivies au cours de la thèse

### 5.2.1 Congrès

---

- Congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD) mars 2011 – Genève (Suisse)

Présentation d'un poster

***Le Losartan protège les îlots pancréatiques humains du stress du réticulum et du stress oxydant induits par le glucose.***

Romeo Cassel, Séverine Dubois, Yi Pan, Aurélia Mesnier, MA Chauvin, Doménico Bosco, Odile Richard, Charles Thivolet, Anne-Marie Madec

- Congrès de l'European Association for the Study of Diabetes (EASD) septembre 2011 – Lisbonne (Portugal)

Présentation d'un poster commenté

***Losartan Protects Human Pancreatic Islets And MIN6B1 Cells From Glucotoxic ER and Oxidative Stress.***

R.Cassel, S.Dubois, Y.Pan, A.Mesnier, D.Bosco, O.Richard, C.h.Thivolet, A.M.Madec

- Colloque G2L2 mars 2012 – Lyon (France)

Présentation d'un poster commenté

***L'inhibition de l'AT1R par le Losartan dans les îlots de Langerhans humains revient à les protéger des stress du RE et mitochondrial en réponse au glucose.***

R Cassel, AM Madec, S Ducreux, S Dubois, MA Chauvin, Y Pan, E. Errazuriz-Cerda, K Chikh, D Bosco, J Rieusset, F Van Coppenolle, Ch Thivolet

- Colloque Réseau Meet'Ochondrie septembre 2012 – Soustons (France)

Présentation d'un poster

***Le Losartan protège les îlots de Langerhans humains du stress mitochondrial induit par le glucose.***

R.Cassel, G.Vial, M.C.Chauvin, J.Rieusset, C.Thivolet, A-M.Madec

- Congrès de l'EASD octobre 2012 – Berlin (Allemagne)

Présentation d'un poster commenté

***Losartan protects human islets from chronic high glucose exposure by prevention of cytosolic and reticular calcium homeostasis.***

R. Cassel, S. Dubois, Y. Pan, A. Mesnier, C. Thivolet, A.-M. Madec;

- Colloque G2L2 avril 2013 – Genève (Suisse)
- Congrès de la SFD mars 2013 – Montpellier (France)

Présentation d'un poster commenté

***Le maintien de l'homéostasie calcique par l'inhibition du SRA protège les îlots humains des effets de la glucotoxicité.***

R.Cassel, S. Ducreux, S. Dubois, G. Vial, M-A. Chauvin, J. Rieusset, F. Van Coppenolle, C. Thivolet, A-M. Madec

Présentation d'un poster

***Le Losartan, inhibiteur spécifique du récepteur AT1 de l'angiotensine II, protège les cellules bêta de la lipotoxicité induite par le palmitate.***

R.Cassel, G. Vial, S. Ducreux, M-A. Chauvin, E. Erratchi, J. Rieusset, C. Thivolet, F. Van Coppenolle, A-M. Madec

- Congrès de l'EASD septembre 2013 – Barcelone (Espagne)

Présentation d'un poster commenté

***The translocon is a reticular calcium leak channel in pancreatic beta cells : towards a new way of protection from lipotoxicity.***

Roméo Cassel, Fabien Van Coppenolle, Sylvie Ducreux, Marie-Agnès Chauvin, Jennifer Rieusset, Charles Thivolet, Anne-Marie Madec

- Symposium de l'Islet Study Group (ISG) septembre 2013 – Stiges (Espagne)

Présentation d'un poster

***The translocon is a reticular calcium leak channel in pancreatic beta cells : towards a new way of protection from lipotoxicity.***

Roméo Cassel, Fabien Van Coppenolle, Sylvie Ducreux, Marie-Agnès Chauvin, Jennifer Rieusset, Charles Thivolet, Anne-Marie Madec

- Congrès de la SFD mars 2014 – Paris (France)

Communication orale

***L'inhibition du translocon protège les cellules bêta de la lipotoxicité en prévenant l'homéostasie calcique.***

Roméo Cassel, Fabien Van Coppenolle, Sylvie Ducreux, Marie-Agnès Chauvin, Jennifer Rieusset, Charles Thivolet, Anne-Marie Madec

- **Congrès de l'American Diabetes Association (ADA) juin 2014 – San Francisco (Etats-Unis)**

Présentation d'un poster commenté

***Protection of Beta Cells from Lipotoxicity by Modulation of Translocon.***

Roméo Cassel, Fabien Van Coppenolle, Sylvie Ducreux, Clara Berle, Marie-Agnès Chauvin, Jennifer Rieusset, Charles Thivolet, Anne-Marie Madec

### **5.2.2 Formations**

---

Monitorat 2011-2014 Université Lyon 1

Expérimentation animale niveau 1 – Université Lyon 1 – juin 2012

Stage de recherche translationnelle dans un service hospitalier – service d'endocrinologie Hôpital Lyon-Sud dirigé par Charles Thivolet – mai 2013

Accueil de lycéens dans le laboratoire – Université Lyon 1 – mars 2013

Formation à la rédaction d'articles scientifiques en anglais – Université Lyon 1 - mai 2014

## 6. Résumés

### 6.1 Résumé en français

Le diabète de type 2 est une pathologie chronique complexe associant une altération de sécrétion de l'insuline par le pancréas et une résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques, notamment au niveau du foie et du muscle squelettique. Son origine est multifactorielle, alliant des anomalies génétiques et environnementales, en particulier nutritionnelles. Un des mécanismes par lesquels les facteurs nutritionnels (comme les glucides et les lipides en excès) contribuent au développement du diabète et à son aggravation est la glucolipotoxicité. En effet, l'élévation de la glycémie et des lipides plasmatiques, ainsi que l'accumulation ectopique de lipides dans les tissus, participent au développement de l'insulinorésistance hépatique et musculaire et aux dysfonctions des cellules bêta, en partie via l'induction d'un stress métabolique, impliquant notamment le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique (RE) et la perturbation de l'homéostasie calcique.

Nous avons étudié les effets de la glucotoxicité et de la lipotoxicité dans les cellules bêta pancréatiques et les mécanismes impliqués. Nous nous sommes aussi intéressés à des traitements potentiellement protecteurs de la fonction bêta-pancréatique. Nous avons fait l'hypothèse que les effets bénéfiques de l'inhibition du système rénine-angiotensine sur l'incidence du diabète de type 2 chez l'homme étaient médiés par une action directe sur les cellules bêta.

Nos résultats montrent que le glucose chronique à une dose élevée entraîne une réduction de la sécrétion d'insuline des cellules bêta des îlots de Langerhans humains par une action conjointe sur le stress du RE, le stress oxydant et l'homéostasie calcique. L'inhibition du SRA a permis de restaurer cette fonction grâce notamment à une action inhibitrice sur la voie Phospholipase C-IP3-Calcium.

Nous avons montré *in vitro* qu'une dose modérée de palmitate, acide gras saturé corrélé positivement avec l'incidence du diabète de type 2, entraîne une perte de fonction des îlots de Langerhans humains et des cellules bêta murines MIN6B1, ainsi qu'une réduction de la concentration calcique réticulaire, un stress du RE. Nous avons fait l'hypothèse que le translocon, un complexe multiprotéique responsable de la traduction, serait potentiellement impliqué dans l'homéostasie calcique des cellules bêta. Nos résultats montrent que le translocon est un canal de fuite calcique réticulaire passif impliqué dans la physiologie de la cellule bêta et qu'il peut ainsi constituer une cible thérapeutique en conditions de lipotoxicité. Son inhibition a préservé l'homéostasie calcique dans les îlots humains et les MIN6B1, effet accompagné par une protection de la fonction insulinosécrétrice dans les îlots et de l'apoptose dans les MIN6B1 et par une amélioration partielle du stress du RE dans les deux modèles.

*In vivo*, nous avons montré que des souris nourries 16 semaines avec un régime enrichi en palmitate (+20%) présentent une intolérance au glucose, une insulinorésistance et une hyper-insulinémie. Mais elles ne présentent pas d'altération de la fonction insulinosécrétrice,

du stress du RE et de la respiration mitochondriale dans les îlots de Langerhans, à la différence du modèle *in vitro* suggérant d'autres niveaux de régulation physiologiques *in vivo*.

L'ensemble de ces résultats montrent que les effets de la glucotoxicité et de la lipotoxicité sont liés à des actions intracellulaires multiples où la perturbation de l'homéostasie calcique joue un rôle majeur. L'amélioration de celle-ci par l'inhibition du SRA et du translocon conduit à une amélioration de la fonction bêta-pancréatique. Ces résultats offrent ainsi de nouvelles pistes dans la compréhension, la prévention et le traitement du diabète de type 2.

Mots clefs : diabète de type 2, cellules bêta pancréatiques, îlots de Langerhans humains, cellules MIN6B1, glucotoxicité, lipotoxicité, translocon, système rénine-angiotensine, homéostasie calcique, stress du réticulum endoplasmique

## 6.2 Résumé en anglais

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic and complex pathology which associates insulin secretion alteration of pancreatic beta cells and insulinresistance of peripheric tissues, such as the liver and skeletal muscles. T2D is a multifactorial disease, with genetic and environmental abnormalities and notably nutritional abnormalities. One mechanism among others by which nutritional factors (as glucides and lipids in excess) contributes to the development of the T2D and its worsening is glucolipotoxicity. Indeed, hyperglycemia and high plasmatic lipid levels and ectopic lipid accumulation in tissues, participate to the development of liver and muscular insulinresistance and pancreatic beta cell dysfunction. This phenomenon is partly mediated by a metabolic stress which include in particular an oxidative stress, an endoplasmic reticulum (ER) stress and a perturbation of cellular calcium homeostasis.

We studied the effects of glucotoxicity and lipotoxicity in pancreatic beta cells and associated mechanisms. We also studied treatments that could protect beta cell function. We hypothesized that beneficial effects of renin-angiotensin system (RAS) inhibition on T2D in human could be mediated by a direct action on pancreatic beta cells.

Our results show that chronic high glucose leads to a decreased insulin secretion by beta cells of human islets of Langerhans by an action on ER stress, oxidative stress and perturbation of calcium homeostasis. RAS inhibition restores this function in part through the inhibition of the Phospholipase C–IP3-Calcium pathway.

We also showed *in vitro* that a moderate palmitate concentration, a saturated free fatty acid positively correlated with T2D incidence, leads to a loss of function of human pancreatic

islets and murine beta cell MIN6B1. It also reduced reticular calcium concentration and activates an ER stress. We hypothesized that the translocon, a multiproteic complex implicated in the translation, could potentially be implicated in the calcium homeostasis of beta cells. Our results exhibited that the translocon is a reticular calcium leak channel of beta cells and that it could be a therapeutic target in lipotoxic conditions. Its inhibition prevented effectively calcium homeostasis in human islets and MIN6B1, insulin secretion in human islets and apoptosis in MIN6B1, and a partial prevention of ER stress in both models.

*In vivo*, we pointed out that mice fed with a high palmitate diet (+20%) during 16 weeks present a glucose intolerance, an insulinresistance and an hyperinsulinemia. But mice did not exhibited insulin secretion alteration, neither ER stress nor mitochondrial respiration alterations in pancreatic islets. This is a difference with *in vitro* models, suggesting different physiologic levels of regulation *in vivo*.

Altogether, these results showed that the effects of glucotoxicity and lipotoxicity are linked to multiple intracellular actions in which calcium homeostasis play a major role. The improvement of calcium homeostasis by RAS and translocon inhibition leads to an improvement of beta cell function. These results highlight new ways of understanding, prevention and treatment of type 2 diabetes.

Key words: type 2 diabetes, pancreatic beta cells, human pancreatic islets, MIN6B1 cells, glucotoxicity, lipotoxicity, translocon, renin-angiotensin system, calcium homeostasis, endoplasmic reticulum