



**HAL**  
open science

# Relation entre Stress Oxydant et Homéostasie Glucidique au cours du Diabète de Type 2: Adaptation de la Cellule $\beta$ Pancréatique

Grégory Lacraz

► **To cite this version:**

Grégory Lacraz. Relation entre Stress Oxydant et Homéostasie Glucidique au cours du Diabète de Type 2: Adaptation de la Cellule  $\beta$  Pancréatique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2009. Français. NNT: . tel-00433556

**HAL Id: tel-00433556**

**<https://theses.hal.science/tel-00433556v1>**

Submitted on 20 Nov 2009

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 7

Présentée par  
**Grégory LACRAZ**

Pour obtenir le titre de  
**Docteur de l'Université Paris 7**

Spécialité  
**Physiologie et Physiopathologie**

---

Sujet de thèse  
**Relation entre Stress Oxydant et Homéostasie Glucidique  
au cours du Diabète de Type 2 :  
Adaptation de la Cellule  $\beta$  Pancréatique**

---

*Soutenue le 4 février 2009 devant le jury composé de :*

Professeure Nathalie JANEL  
Professeur Louis CASTEILLA  
Professeur Jean-Christophe JONAS  
Professeur Bernard PORTHA  
Professeur Xavier LEVERVE

Présidente  
Rapporteur  
Rapporteur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse

*“De la Science et des Hommes,  
la Vérité s’amuse parfois...”*

## *Remerciements*

*Je ne saurais exprimer individuellement ma gratitude aux mille et une personnes qui, de près ou de loin, m'ont soutenu et encouragé durant ce périple de 4 années menant au parachèvement de cette thèse. Je tiens néanmoins à adresser mes plus sincères remerciements à quelques personnes en particulier:*

*Je souhaite remercier en premier lieu mes deux directeurs de recherche, Messieurs les Professeurs Bernard Portha et Xavier Lèverve, pour avoir accepté de diriger cette thèse, ainsi que pour leur accueil au sein de leurs laboratoires respectifs. J'ai beaucoup appris à leurs côtés et je leur adresse toute ma gratitude :*

*Merci à Bernard qui m'a donné son entière confiance et tous les moyens nécessaires – intellectuels et financiers – pour accomplir ce long travail de thèse ;*

*Merci à Xavier qui m'a supporté et respecté dans mes choix, notamment celui de poursuivre – plus tôt que prévu – la fin de ma thèse sur Paris ; je tiens également à le remercier pour ses talents oratoires qui ont été pour moi une vraie source d'inspiration ;*

*Je tiens à remercier chaleureusement Madame la Professeure Nathalie Janel qui m'a fait l'honneur de présider et d'examiner ma thèse ;*

*J'associe à ces remerciements Messieurs les Professeurs Louis Casteilla et Jean-Christophe Jonas qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de cette thèse ;*

*J'adresse ensuite mes plus vifs remerciements à tous les membres du LPPN qui m'ont chaleureusement accueilli à mon arrivée sur Paris et accompagné jusqu'à la fin de cette thèse ;*

*J'aimerais aussi remercier les membres de l'équipe du LBF A de Grenoble que j'ai pu côtoyer et qui m'ont très tôt contaminé aux "mito", et plus globalement à la recherche fondamentale ; un clin d'oeil tout particulier à Karine et Roland pour leurs grandes qualités humaines et professionnelles ; et une pensée toute particulière pour Roland qui nous a quitté subitement mais qui reste toujours présent dans nos coeurs ;*

*Je voudrais également exprimer mon amitié et ma gratitude à Françoise Komodelarche qui a fortement contribué à l'émulation scientifique autour de mon sujet de thèse ;*

*Je tiens naturellement à remercier mes proches et amis :*

*À ma mère, pour ton soutien indéfectible depuis toujours ; tu as occupé une place déterminante dans le choix de mes orientations et dans chacune des étapes de vie qui m'ont conduit à être ce que je suis aujourd'hui ;*

*À Loan, pour ta gentillesse inconditionnelle et ta profondeur d'Âme ;*

*À JSL, pour ton courage, ta sincérité et ta gentillesse ;*

*Et enfin, j'adresse mes remerciements à tous les valeureux "danseurs" du dimanche matin, ils se reconnaîtront...*

## TABLE DES MATIÈRES

<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES ARTICLES</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLES</b>	<b>14</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	
<b>1. Radicaux libres et stress oxydant</b>	
1.1. L'oxygène, ce poison vital	18
1.2. Radicaux libres	19
1.3. Différentes formes de radicaux libres et leurs dérivés	20
1.4. Sources de radicaux libres	
1.4.1. Sources plurielles	21
1.4.2. Mitochondrie	
1.4.2.1. Rappels sur l'oxydation phosphorylante	21
1.4.2.2. Place du rendement de l'oxydation phosphorylante	22
1.4.2.3. Production d'ERO mitochondriales	23
1.4.2.4. Les modulateurs de production d'ERO mitochondriales	26
1.4.3. Métaux de transition	26
1.4.4. NADPH-oxydase	27
1.4.5. Xanthine oxydase	28
1.4.6. Exposition à des toxiques	28
1.5. Atteintes cellulaires	
1.5.1. Une myriade de cibles	28
1.5.2. Une question de stabilité !	29
1.5.3. Peroxydation lipidique	29
1.5.4. Oxydation des protéines	30
1.5.5. Atteintes de l'ADN	31
1.6. Systèmes de défenses antioxydantes	
1.6.1. Une riposte hautement stratégique	32
1.6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	
1.6.2.1. Principe antioxydant	32
1.6.2.2. Composés exogènes	
1.6.2.2.1. Vitamines A, E et C	33
1.6.2.2.2. Métaux	34
1.6.2.3. Composés endogènes	
1.6.2.3.1. Glutathion	34
1.6.2.3.2. Ubiquinol et cytochrome <i>c</i>	35
1.6.2.3.3. Autres composés endogènes	35
1.6.3. Systèmes antioxydants enzymatiques	
1.6.3.1. Superoxyde dismutase	36
1.6.3.2. Catalase	36
1.6.3.3. Glutathion peroxydase	36
1.6.3.4. Peroxyredoxine	37
1.6.3.5. Glutathion réductase	37

1.6.3.6.	Thioredoxine	37
1.6.3.7.	Glutaredoxine	38
1.6.3.8.	Hème oxygénase	38
1.6.3.9.	Cofacteurs réduits	39
1.6.4.	Bilan sur les stratégies de défense antioxydante	40
1.7.	ERO et signalisation cellulaire	
1.7.1.	Une notion émergente	41
1.7.2.	ERO et signalisation en physiologie et physiopathologie	41
1.7.3.	ERO et <i>sensing</i> métabolique	42
1.7.4.	ERO et adaptation respiratoire	42
1.7.5.	L'induction des gènes de défenses contre le stress oxydant	43
1.7.6.	Adaptation à l'hypoxie	45
1.7.7.	ERO et signalisation inflammatoire	46
1.7.8.	ERO et induction de l'apoptose	46
<b>2.</b>	<b>Le DT2</b>	
2.1.	Définition	49
2.2.	Insulino-résistance, obésité et DT2, de nombreuses corrélations !	49
<b>3.</b>	<b>Stress oxydant et DT2</b>	
3.1.	Marqueurs de stress oxydant dans le DT2	
3.1.1.	Marqueurs circulants	51
3.1.2.	Marqueurs pancréatiques	51
3.2.	L'hyperglycémie chronique, un facteur pro-oxydant	
3.2.1.	Voies de production d'ERO	52
3.2.2.	La théorie "unificatrice"	53
3.2.3.	Cas de la cellule endothéliale, modèle de stress oxydant dans le DT2	54
3.3.	La cellule $\beta$ diabétique, autre victime du stress oxydant	
3.3.1.	Hypothèses de glucotoxicité, lipotoxicité et glucolipotoxicité	55
3.3.2.	Faibles défenses antioxydantes	55
3.3.3.	Effets glucotoxiques :	
3.3.3.1.	sur des gènes clés	56
3.3.3.2.	sur la survie $\beta$ -cellulaire	57
3.3.4.	Voies de mort dans la cellule $\beta$	58
3.3.5.	Voies de survie dans la cellule $\beta$	60
3.3.6.	Effets protecteurs par les antioxydants :	
3.3.6.1.	<i>in vitro</i>	61
3.3.6.2.	<i>in vivo</i> , chez l'animal	62
<b>4.</b>	<b>Stratégies nutritionnelles pour diminuer le stress oxydant dans le DT2</b>	
4.1.	Antioxydants et DT2	63
4.2.	Restriction calorique et fonction mitochondriale	63
4.3.	La restriction calorique contre le stress oxydant	64
<b>5.</b>	<b>Modèles d'étude</b>	
5.1.	Le rat GK/Par, spontanément diabétique	
5.1.1.	Modèle de DT2 humain	66
5.1.2.	Modèle de stress-oxydant ?	66

5.2.	Le rat Lou/C, spontanément restreint en calories	
5.2.1.	Modèle animal <i>anti-obèse</i>	68
5.2.2.	Modèle animal <i>anti-stress oxydant ?</i>	68
<b>BUT DU TRAVAIL</b>		<b>70</b>
<b>RESULTATS</b>		
<b>1. Résistance fonctionnelle au stress oxydant des cellules <math>\beta</math> de rats GK/Par via une adaptation antioxydante</b>		
1.1.	Questions posées	71
1.2.	Résultats principaux	
1.2.1.	Microenvironnement marqué par le stress oxydant	71
1.2.2.	Résistance aux effets délétères des ERO	71
1.2.3.	Défenses antioxydantes accrues	72
1.2.4.	Moindre production d'ERO	72
1.2.5.	Résistance à l'effet "signal" exercé par les ERO à faible dose	72
1.2.6.	Adaptation au diabète	73
1.3.	Manuscrit 1	74
1.4.	Résultats complémentaires	
1.4.1.	Marqueur de stress oxydant de l'ADN	95
1.4.2.	Résistance $\beta$ -cellulaire dans d'autres conditions expérimentales	96
1.5.	Conclusions et points de discussion	98
<b>2. Résistance à l'apoptose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induite des cellules <math>\beta</math> diabétiques de rats GK/Par via une réponse adaptative dépendante de l'AMPc</b>		
2.1.	Questions posées	99
2.2.	Résultats principaux	
2.2.1.	L'apoptose $\beta$ -cellulaire est normale dans les îlots diabétiques GK/Par fraîchement isolés	99
2.2.2.	L'apoptose $\beta$ -cellulaire est activée dans les îlots GK/Par cultivés	99
2.2.3.	Les cellules $\beta$ diabétiques GK/Par sont résistantes à l'induction de l'apoptose par l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100
2.2.4.	L'AMPc protège les cellules $\beta$ diabétiques GK/Par de la mort cellulaire	100
2.2.5.	Adaptation au diabète	100
2.3.	Manuscrit 2	101
2.4.	Résultats complémentaires	
2.4.1.	Autres gènes liés à la l'apoptose après 48h de culture	123
2.4.2.	Effets anti-apoptotiques d'un antioxydant (NAC)	124
2.4.3.	Évolution de l'inflammation insulaire <i>in vitro</i>	
2.4.3.1.	Expression des gènes pro-inflammatoires	125
2.4.3.2.	Immunolocalisation de l'inflammation <i>in vitro</i>	126
2.4.4.	Évolution de l'activation endothéliale insulaire <i>in vitro</i>	
2.4.4.1.	Expression des gènes de l'endothélium	128
2.4.4.2.	Immunolocalisation de l'activation endothéliale <i>in vitro</i>	129
2.4.5.	Effets d'un antioxydant sur l'induction des gènes de stress	130
2.5.	Conclusions et points de discussion	132
<b>3. Microenvironnement favorable au stress oxydant dans l'îlot GK/Par. Rôle de l'IL-1</b>		
3.1.	Questions posées	133



3.2.	Résultats principaux	
3.2.1.	Paramètres périphériques du stress oxydant	133
3.2.2.	Présence de marqueurs de l'inflammation et activation endothéliale	133
3.2.3.	Antagonisme de l'IL-1 sur l'inflammation, la dysfonction endothéliale, le stress oxydant et la fibrose	134
3.2.4.	Rôle de l'IL-1 dans l'insulino-résistance	134
3.3.	Manuscrit 3	135
3.4.	Manuscrit 4	163
3.5.	Résultats complémentaires	
3.5.1.	Effets transcriptionnels de l'IL-1Ra à faible dose dans l'îlot GK/Par	184
3.5.2.	Effets de l'IL-1Ra sur l'apoptose	185
3.5.3.	Expression des gènes de l'inflammation et de l'activation endothéliale dans les îlots GK/Par avant l'installation du diabète	186
3.6.	Conclusions et points de discussion	187
<b>4.</b>	<b>Étude du stress oxydant dans des tissus extrapancréatiques cibles de l'insuline chez le rat <i>anti-obèse</i> Lou/C et chez le rat diabétique GK/Par</b>	
4.1.	Questions posées	188
4.2.	Résultats principaux dans les mitochondries de foie de rat Lou/C	
4.2.1.	Production mitochondriale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> accrue	188
4.2.2.	Capacités oxydatives accrues	188
4.2.3.	Découplage intrinsèque de la chaîne respiratoire	189
4.3.	Manuscrit 5	190
4.4.	Résultats complémentaires chez le rat Lou/C	200
4.5.	Résultats complémentaires chez le rat GK/Par	200
4.5.1.	Foie	
4.5.1.1.	Production mitochondriale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> accrue	200
4.5.1.2.	Capacités oxydatives accrues	201
4.5.1.3.	Capacité de rétention calcique mitochondriale	202
4.5.1.4.	Défenses antioxydantes	203
4.5.2.	Muscle squelettique	
4.5.2.1.	Production mitochondriale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204
4.5.2.2.	Oxydation phosphorylante	204
4.5.2.3.	Capacités de rétention calcique mitochondriale	205
4.6.	Conclusions et points de discussion	205
<b>DISCUSSION</b>		
<b>1.</b>	<b>La réponse adaptative à l'environnement diabétique</b>	
1.1.	La cellule β diabétique, victime passive du stress oxydant ?	206
1.2.	La cellule β diabétique, source de stress oxydant ?	207
1.3.	Découplage mitochondrial de la cellule β diabétique	208
1.4.	Adaptations antioxydantes dans la défense contre l'apoptose dans l'îlot et le foie diabétique	208
1.5.	Contraste entre résistance au stress oxydant <i>in vitro</i> et fragilité β-cellulaire détectée <i>ex vivo</i> chez le rat diabétique	210
1.6.	Le stress oxydant, cause ou conséquence des anomalies mitochondriales dans l'insulino-résistance ?	211

<b>2. Origine(s) des adaptations défensives à l'environnement diabétique chez le rat GK/Par</b>	
2.1. Glucotoxicité et production d'ERO	212
2.2. Inflammation péri-insulaire et production d'ERO	212
2.3. Exposition aux ERO et induction des défenses insulaires chez le rat diabétique	214
2.4. Exposition aux ERO et induction du découplage mitochondrial dans l'îlot et le foie diabétique	215
<b>3. "Adaptation" et "dés-adaptation" <math>\beta</math>-cellulaire, deux faces d'une même pièce</b>	218
<b>4. Dysfonction vasculaire, inflammation et auto-entretien du stress oxydant local insulaire</b>	219
<b>5. Et avant l'installation du DT2 ?</b>	220
<b>6. Le stress oxydant et ses paradoxes</b>	
6.1. Exposition aux ERO en prélude au DT2 ?	222
6.2. Ambivalence des ERO dans leurs effets sur la fonction $\beta$ -cellulaire	223
6.3. Hormèse et protection naturelle contre le stress oxydant	224
6.4. La supplémentation en antioxydants lors du DT2, quelle pertinence ?	225
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	227
1. <i>La cellule <math>\beta</math> est-elle aussi résistante in vivo au stress oxydant ?</i>	
2. <i>Comment moduler la résistance au stress oxydant (défenses antioxydantes) ?</i>	
3. <i>Le rôle de l'environnement foetal GK/Par : une empreinte par le stress oxydant intra-utérin ?</i>	
4. <i>La résistance des cellules <math>\beta</math> GK/Par au stress oxydant persiste-t-elle au cours du vieillissement ?</i>	
5. <i>Existe-t-il diverses manières "d'entraîner" la cellule <math>\beta</math> à développer une résistance au stress oxydant ?</i>	
6. <i>Spécificité cellulaire dans l'îlot</i>	
7. <i>Application hormétique à la transplantation insulaire</i>	
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	230
<b>ANNEXES</b>	266
Portha B, <u>Lacraz G</u> , Dolz M, Giroix MH, Homo-Delarche F, Movassat J (2007). Defective functional $\beta$ -cell mass and type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model. <i>Expert Rev Endocrinol Metab</i> 2, 785–795.	
Portha B, <u>Lacraz G</u> , Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix M-H, Bailbé D, Gangnerau M-N, Dolz M, Turrel-Cuzin C, Movassat J. The GK rat $\beta$ -cell: a prototype for diseased human beta cell in type 2 diabetes? <i>Mol Cell Endocrinol</i> (sous presse).	
Taleux N, De Potter I, Deransart C, <u>Lacraz G</u> , Favier R, Leverve XM, Hue L, Guigas B (2008). Lack of starvation-induced activation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of the Lou/C rats resistant to obesity. <i>Int J Obes (Lond)</i> 32, 639–647.	

## ABRÉVIATIONS

A20	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (TNFAIP3)
AA	antimycine A
AC	adenylate cyclase
ACE1	angiotensin-converting enzyme 1
ACh	acétylcholine
AGE	advanced glycation products
AGNE	acides gras non-estérifiés
AGT	angiotensinogen
AGTR1a	angiotensin receptor 1a
AMPc	AMP cyclique
AP-1	activator protein-1
APAF-1	facteur activateur de protéase
Asc	ascorbate
BAX	BCL2-associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BSO	buthionine sulfoximine
C-MYC	c-myc protein
Casp	caspase
CAT	catalase
CCL2	monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)
CCL3	macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ )
CE	cellule endothéliale
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CM-H2DCFDA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
Coll	collagène
COX	cyclo oxygenase
CREB	cAMP response element-binding
CsA	cyclosporine A
CTE	chaîne de transport des électrons
CVML	cellule vasculaire musculaire lisse
CXCL1	chemokine GRO1/KC (rodent analog of IL-8)
DAG	diacylglycérol ;
DAO	défenses antioxydantes
DHAP	dihydroxyacétone-phosphate
EDN1	endothelin 1 (ET-1)
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EPAC	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor (cAMP-GEF)
EPHX2	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
Eq GSH	équivalent GSH
ERO	espèces réactives de l'oxygène
ERA	espèces réactives de l'azote
Fas	TNF receptor superfamily member 6 (Tnfrsf6)
Faslg	Fas ligand
FCCP	carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
G6P	glucose-6-phosphate
G6pc	glucose-6-phosphatase
G6pdx	glucose-6-phosphate dehydrogenase
Gaolf	guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, olfactory type
Gas	guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GCLC	$\gamma$ -glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
GK/Par	Goto-Kakizaki/Paris
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GMS	glutamate/malate/succinate
GPX	glutathione peroxidase
GRX	glutaredoxin
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion S-transférase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-induced factor-1, alpha subunit
Hk1	hexokinase 1
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO	heme oxygenase
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
ldh1	isocitrate dehydrogenase-1
IGF	insulin-like growth factor
IL	interleukin
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonist
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRS-2	insulin receptor substrate-2
ISSG	insulino-sécrétion stimulée par le glucose
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase
JO <sub>2</sub>	consommation d'oxygène
KRB	Krebs–Ringer bicarbonate
Ldha	lactate-déshydrogénase A
LDL	low density lipoproteins
12-LOX	arachidonate 12-lipoxygénase
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mct1	transporteur de monocarboxylate 1
Me1	malic enzyme-1
MMP	perméabilité membranaire mitochondriale
MyD88	myeloid differentiation primary response protein
NAC	N-acetyl-L-cysteine,
NF- $\kappa$ B	nuclear receptor-kappa B (Rela)
Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NO	monoxyde d'azote
NOX-2	NADPH oxidase 2
NRF-2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoxyde
octa	octanoyl-carnitine
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
p53	tumor protein p53
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1 (Serpine1)
palm	palmitoyl-carnitine
PARP	poly-ADP-ribose polymérase
PDE	phosphodiesterase
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)
PI3K	phosphoinositide-3 kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PON-1	paraoxonase-1

PTP	pore de transition de perméabilité
Pxd	peroxiredoxin
PGE2	prostaglandin E2
PGI2	prostacyclin
PGIS	prostacyclin synthase
SELE	E-selectin (CD62)
SOD	superoxide dismutase
STZ	streptozotocine
n-STZ	neonataly streptozotocin-treated rat
tBH	tert-butylhydroperoxide
TG	triglycérides
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
TLR	toll-like receptor
TMPD	N,N,N' N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
Trx	thioredoxin
Ub	ubiquinone
UbH <sub>2</sub>	ubiquinol
UCP	uncoupling protein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (CD106)
VEGF $\alpha$	vascular endothelial growth factor A
VWF	facteur de Von Willebrand
ZDF	Zucker diabetic fatty
$\Delta\Psi_m$	potentiel de membrane mitochondrial

## LISTE DES ARTICLES

### Résultats :

1. Lacraz G, Figeac F, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Leloup C, Bailbe D, Homo-Delarche F, Portha B. Diabetic GK/par rat  $\beta$ -cells achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive upregulation of their antioxidant defenses. *JBC*, *soumis*.
2. Lacraz G, Figeac F, Kassis N, Portha B. Diabetic GK/Par rat  $\beta$ -cells are spontaneously protected against oxidative stress induced-apoptosis. A cAMP-dependent adaptive response. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *en révision*.
3. Lacraz G, Giroix M-H, Kassis N, Coulaud J, Ehses JA, Galinier A, Noll C, Cornut M, Schmidlin F, Janel N, Irminger J-C, Kergoat M, Portha B, Donath M, Homo-Delarche F. Islet endothelial dysfunction and oxidative stress is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS ONE*, *soumis*.
4. Ehses JA, Giroix M-H\*, Lacraz G\*, Schmidlin F, Coulaud J, Kassis N, Irminger J-C, Kergoat M, Portha B, Homo-Delarche F, Donath MY. IL-1Ra antagonism reduces hyperglycemia in the type 2 diabetic GK rat by reduction in islet and peripheral tissue inflammation. *PNAS*, *soumis*.
5. Lacraz G, Couturier K, Taleux N, Servais S, Sibille B, Letexier D, Guigas B, Dubouchaud H, Leverve X, Favier R (2008). Liver mitochondrial properties from the obesity-resistant Lou/C rat. *Int J Obes (Lond)* 32, 629–638.

### Annexes :

6. Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix M-H, Bailbé D, Gangnerau M-N, Dolz M, Turrel-Cuzin C, Movassat J (2009). The GK rat  $\beta$ -cell: a prototype for diseased human beta cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol* 297, 73–85.
7. Portha B, Lacraz G, Dolz M, Giroix MH, Homo-Delarche F, Movassat J (2007). Defective functional  $\beta$ -cell mass and type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2, 785–795.
8. Taleux N, De Potter I, Deransart C, Lacraz G, Favier R, Leverve XM, Hue L, Guigas B (2008). Lack of starvation-induced activation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of the Lou/C rats resistant to obesity. *Int J Obes (Lond)* 32, 639–647.

## LISTE DES FIGURES ET TABLES

### Introduction :

- Fig. I1.** L'inflation du nombre de publications relevant du champ de la diabétologie et portant sur le stress oxydant.
- Fig. I2.** La mitochondrie : centrale énergétique de la cellule.
- Fig. I3.** Règle de l'octet.
- Fig. I4.** L'oxygène radicalaire.
- Fig. I5.** L'oxydation phosphorylante et son rendement.
- Fig. I6.** Sites de production des ERO et sites d'action des inhibiteurs classiques utilisés.
- Fig. I7.** La production de superoxyde par la boucle des quinones.
- Fig. I8.** Distribution des antioxydants dans la cellule.
- Fig. I9.** Cycles réactionnels de régénération des antioxydants.
- Fig. I10.** Interaction entre les systèmes des thioredoxines, des glutaredoxines et du glutathion.
- Fig. I11.** Rôles anti-stress des hèmes oxygénases (HO).
- Fig. I12.** Stratégies antioxydantes.
- Fig. I13.** Modèle hiérarchique de signalisation induite par le stress oxydant.
- Fig. I14.** Exemple de modulations transcriptionnelles du gène de la hème oxygénase-1 (Hmox1) en réponse au stress oxydant.
- Fig. I15.** Évènements intrinsèques et extrinsèques couplés au phénomène d'apoptose.
- Fig. I16.** Les six voies de production d'ERO par le glucose.
- Fig. I17.** La théorie "unificatrice".
- Fig. I18.** Voies de survie et de mort de la cellule  $\beta$ .
- Fig. I19.** Chronologie d'apparition et d'évolution du diabète spontané du rat GK/Par.

**Table I1.** Les principales ERO radicalaires et non-radicalaires.

### Résultats :

- Fig. R1.** Présence de marqueur de stress oxydant de l'ADN en bordure des îlots diabétiques GK/Par.
- Fig. R2.** Marqueurs circulants de stress oxydant en fonction de l'âge chez les rats Wistar et GK/Par.
- Fig. R3.** Effets du *tert*-butylhydroperoxide (tBH) sur la sécrétion de l'insuline par les îlots Wistar et GK/Par.
- Fig. R4.** Augmentation de l'apoptose des cellules  $\beta$  GK/Par après 48h de culture.
- Fig. R5.** Effets préventifs d'un antioxydant (NAC) sur l'apoptose  $\beta$ -cellulaire induite par l' $H_2O_2$  après 24h de culture dans les îlots Wistar et GK/Par.
- Fig. R6.** Effets des conditions de culture sur l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les îlots Wistar et GK/Par.
- Fig. R7.** Effets des conditions de 24h de culture sur l'induction de marqueurs inflammatoires dans les îlots Wistar et GK/Par.
- Fig. R8.** Effets des conditions de 24h de culture sur l'expression des gènes de l'activation endothéliale dans les îlots Wistar et GK/Par.

- Fig. R9.** Effets des conditions de 24h de culture sur l'induction de marqueurs vasculaires dans les îlots Wistar et GK/Par.
- Fig. R10.** Surexpression des gènes impliqués dans la dé-différenciation  $\beta$ -cellulaire dans les îlots GK/Par.
- Fig. R11.** Effets préventifs d'un traitement par l'IL-1Ra, chez le rat GK/Par, sur l'activation insulaire des gènes codant pour des cytokines/chimiokines, des récepteurs et molécules de signalisation associés aux cytokines (A) ; des marqueurs de cellules myéloïdes et de fibrose (B) ; des molécules anti-fibrinolytiques, de l'adhésion cellulaire, du système rénine-angiotensine (RAS), du stress oxydant, de l'angiogenèse et du tonus vasculaire (C) ; et antioxydantes (D).
- Fig. R12.** Effets d'un traitement *in vitro* ou *in vivo* par l'IL-1Ra sur l'apoptose après 24h de culture dans les îlots GK/Par.
- Fig. R13.** Absence d'induction insulaire des gènes de l'inflammation et de l'activation endothéliale avant l'installation du diabète chez le rat GK/Par.
- Fig. R14.** Rapport entre la production mitochondriale d' $H_2O_2$  et la consommation d'oxygène ( $JO_2$ ) par les mitochondries de foie de rats Wistar et Lou/C.
- Fig. R15.** Production mitochondriale d' $H_2O_2$  en valeur absolue (A), ou rapportée par unité de consommation d'oxygène ( $JO_2$ ) (B), par les mitochondries de foie de rats Wistar et GK/Par.
- Fig. R16.** Capacité de rétention calcique des mitochondries de foie de rats Wistar et GK/Par.
- Fig. R17.** Expression des gènes antioxydants et de découplage dans le foie de rats Wistar et GK/Par.
- Fig. R18.** Production mitochondriale d' $H_2O_2$  par les mitochondries de muscles squelettiques de rats Wistar et GK/Par.
- Fig. R19.** Capacité de rétention calcique des mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et GK/Par.
- Table. R1.** Effets de la streptozotocine (STZ) sur la sécrétion de l'insuline par les îlots Wistar et GK/Par.
- Table R2.** Modulation de l'apoptose  $\beta$ -cellulaire par des agents pro- ( $H_2O_2$ ) et/ou anti-oxydants (NAC) dans les îlots Wistar et GK/Par cultivés 24h ou 48h.
- Table R3.** Effets préventifs d'un antioxydant sur l'activation de gènes de stress en réponse à l' $H_2O_2$  après 24h de culture dans les îlots Wistar et GK/Par.
- Table R4.** Consommation d'oxygène par les mitochondries de foie de rats Wistar et GK/Par.
- Table R5.** Consommation d'oxygène par les mitochondries de muscles squelettiques de rats Wistar et GK/Par.

Discussion :

- Fig. D1.** Modèle hypothétique d'adaptation chronique contre les ERO dans la cellule  $\beta$  GK/Par.
- Fig. D2.** Modèle de microenvironnement insulaire associé au stress oxydant chez le rat GK/Par.
- Fig. D3.** Proposition d'évolution du stress oxydant dans l'îlot GK/Par avec l'âge.



## AVANT-PROPOS

Depuis la découverte des radicaux libres et de leurs espèces dérivées, par les chimistes du caoutchouc du début des années 1940, l'existence de ces entités dans l'organisme vivant a amené la biologie à prendre en compte leurs rôles. Très tôt (*Harman, 1956*), et pendant longtemps, leur ont été assujetti des rôles essentiellement délétères, et à juste titre car les radicaux libres sont des espèces chimiques à très forte réactivité, capables d'oxyder une très grande variété de biomolécules dans l'organisme. Cette faculté à oxyder la plupart des éléments de la cellule raisonne avec l'implication grandissante des radicaux libres comme médiateurs de toxicité dans presque toutes les grandes pathologies de notre siècle (cancer, diabète, maladies cardio-vasculaires, etc.) (*Gutteridge, 1993*). Ils constituent également les principaux protagonistes des théories actuelles du vieillissement. Toutefois, bien que certaines zones d'ombres demeurent quant à leurs fonctions, de nombreux faisceaux de preuve s'accordent sur leurs rôles essentiels dans les processus de signalisation cellulaire, en tant que médiateurs intra ou extracellulaires.

Ainsi, la complexité de ces espèces tient essentiellement à l'ambivalence de leurs fonctions, à leur dualité. Bien qu'indispensables à la vie, les radicaux libres, produits en continue dans les conditions physiologiques, sont dangereux lorsque présents en excès. Selon l'intensité du stress oxydant et le type cellulaire, les conséquences biologiques du stress oxydant sont donc extrêmement variables : tandis que de légers stress augmentent la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens facilitent l'apoptose, et les stress massifs provoquent la nécrose voire la lyse cellulaire. Les anomalies biologiques engendrées par le stress oxydant se manifestent sous des formes très variées : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression, etc.

Heureusement, l'organisme est doté de défenses intrinsèques dites "antioxydantes" — complétées par l'apport alimentaire —, en charges de détruire les radicaux libres, car pas moins de 2 kg/an d'anion superoxyde (radical mitochondrial) sont générés chez l'individu sain (*Halliwell et Gutteridge, 1999*). On parle de "stress oxydant" lorsque la cellule ne parvient plus à gérer ces entités, c'est à dire lorsque le niveau de production de radicaux libres est excessif par rapport aux défenses, ou que les défenses sont insuffisantes par rapport à la quantité de radicaux. Cependant, l'organisme devant à la fois contenir une propagation trop abondante de radicaux libres pour se protéger des attaques, sans pour autant les éradiquer totalement du fait de leurs rôles importants au plan physiologique, un équilibre subtil entre les systèmes pro- et anti-oxydants représente un impératif cellulaire majeur. Notamment, les radicaux libres étant potentiellement dangereux pour la cellule, ils lui serviront d'indicateurs pour la prémunir de ce danger. De ce fait, la mise en jeu de régulations redox et transcriptionnelles extrêmement fines est plus que jamais nécessaire pour assurer cet équilibre complexe. Cette conception est à garder en vue dans la mise en place de stratégies thérapeutiques, comme nous l'enseigne les effets toxiques paradoxaux observés dans les suppléments antioxydants.

Aujourd'hui, on ne compte plus les études de maladies faisant référence au stress oxydant dans leur physiopathologie. Les maladies métaboliques (obésité, insulino-résistance, syndrome métabolique), le diabète en particulier (Fig. I1), n'y échappent pas, pas

plus d'ailleurs que les pathologies de carence énergétique. Partant de ce constat, l'idée originale de mon travail de thèse était de comparer le stress oxydant dans deux modèles animaux : le rat Goto-Kakizaki (GK/Par), modèle spontané de diabète de type 2, et le rat Lou/C, spontanément restreint en calories et résistant à l'obésité. L'étude comparative devait s'intéresser aux niveaux de stress oxydant dans les principaux tissus intervenant dans le métabolisme de l'insuline : le pancréas (cellule  $\beta$ ) pour la synthèse, mais aussi le foie et le muscle squelettique, en tant que cibles premières de l'insuline.

Le travail expérimental s'est articulé autour d'axes de recherche différents et complémentaires, propres aux techniques et aux modèles expérimentaux employés dans chacun de mes deux laboratoires d'accueil. Dans le Laboratoire de Physiologie et de Physiopathologie de la Nutrition (Paris) je me suis tout spécialement penché sur le stress oxydant, dans la cellule  $\beta$  diabétique, et à ses événements associés (inflammation). Cette étude constitue l'essentiel de cette thèse et, à travers deux approches, l'une portant sur la fonction, l'autre sur la survie (apoptose), l'originalité du travail a été d'étudier la sensibilité  $\beta$ -cellulaire aux effets du stress oxydant chez l'animal diabétique. Dans le Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (Grenoble) je me suis intéressé aux aspects bioénergétiques du stress oxydant dans les mitochondries isolées de foie et de muscle squelettique, avec l'accent mis sur la voie de production mitochondriale de radicaux libres en relation avec la synthèse d'ATP et l'ouverture du pore de transition de perméabilité, impliqué dans l'apoptose. Ces derniers aspects ont été étudiés dans les modèles Lou/C et GK/Par.

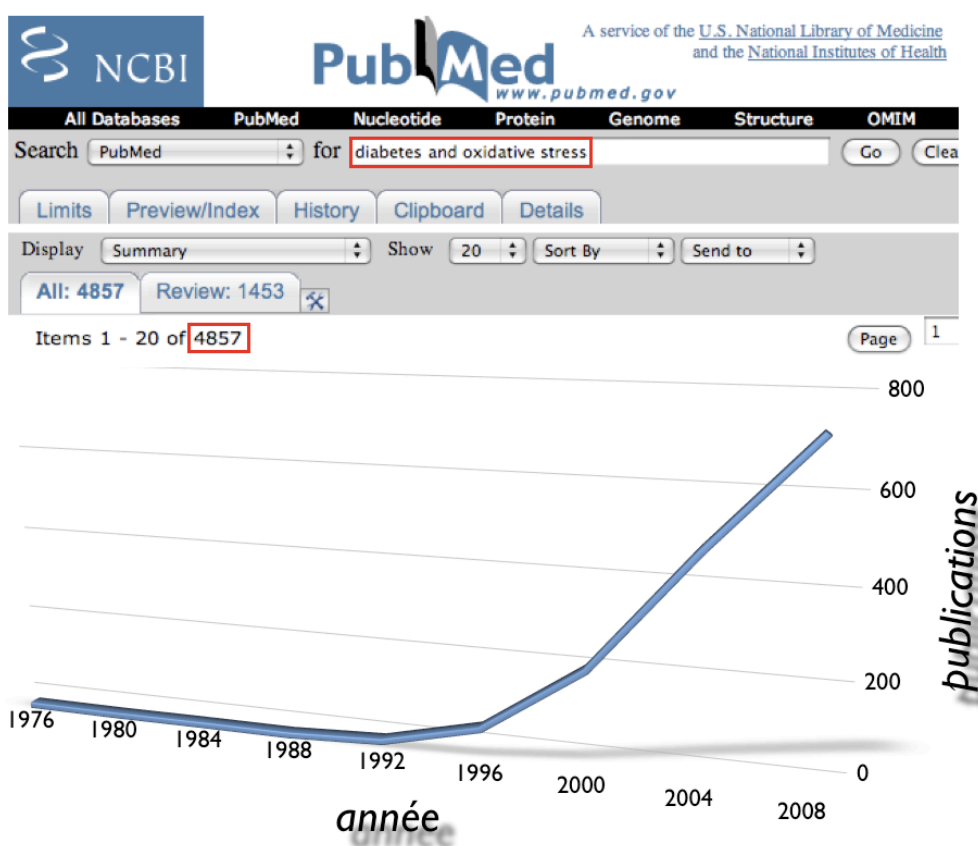


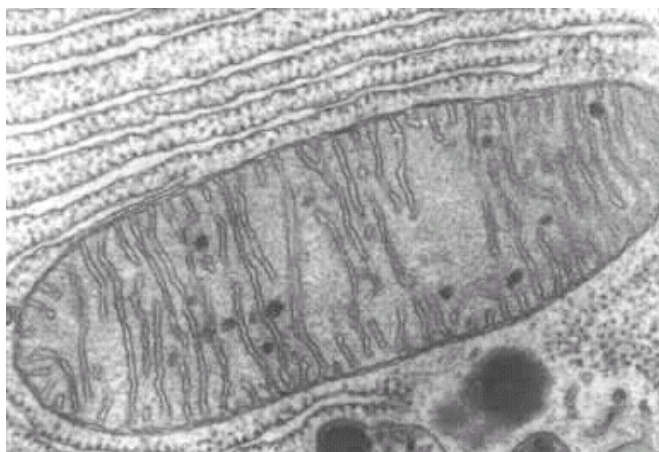
Fig. I1. L'inflation du nombre de publications relevant du champ de la diabétologie et portant sur le stress oxydant (Référence PubMed 2008).

## INTRODUCTION GENERALE

### 1. Radicaux libres et stress oxydant

#### 1.1. L'oxygène, ce poison vital

De très nombreuses fonctions physiologiques génèrent des radicaux libres (production d'énergie, défenses immunitaires, etc.), mais toutes utilisent la molécule d'oxygène, l'un des oxydants les plus puissants qui soit dans la nature. Par bien des aspects, l'oxygène peut être considéré comme un poison vital. Ce sont les mêmes propriétés oxydantes de l'oxygène qui font de lui le meilleur accepteur final d'électrons au sein de la chaîne respiratoire, étape nécessaire à une synthèse d'ATP suffisamment élevée. Historiquement, cette contradiction pour les organismes aérobies trouve son origine dans les temps primitifs, ère dans laquelle la vie se passait d'oxygène jusqu'à ce que 95% des espèces disparaissent au cours de "l'holocauste par l'oxygène", en résultat du succès évolutif des organismes à photosynthèse (*de Duve, 1995*). L'espèce humaine, à l'instar des autres organismes aérobies, serait la digne héritière des 5% survivantes, et l'une des stratégies qu'elle aurait adopté pour se prémunir de la toxicité de l'oxygène aurait été de se munir d'un système "antioxydant". Ce système antioxydant originel repose sur un mécanisme permettant de transformer l'oxygène en eau, tout en produisant de l'énergie (inverse de la photosynthèse) ; il constitue probablement l'ancêtre de la chaîne respiratoire (Fig. I2). L'obtention d'un compromis subtil entre les stratégies pro- et anti-oxydantes constitue en cela un pré-requis à la vie (*Barja, 1993*).



**Fig. I2. La mitochondrie : centrale énergétique de la cellule.** *La vie implique l'interaction entre la structure et l'énergie. C'est ce même principe cosmique qui engendra, il y a 2 milliards d'années, la symbiose entre une cellule glycolytique et une bactérie qui évoluèrent respectivement en noyau et mitochondrie (Lang et al., 1997 ; Gray et al., 1999). Plus d'un milliard d'années auront été nécessaires pour que les différents arrangements et réorganisations génomiques expérimentés par les descendants unicellulaires de la symbiose originelle, conduisent in fine à un design dans lequel la mitochondrie devint spécialisée dans la production d'énergie, et le noyau dans la structure. C'est ce même phénomène qui donna l'impulsion au développement de la multicellularité, et à l'évolution des plantes et des animaux (Wallace, 2007).*

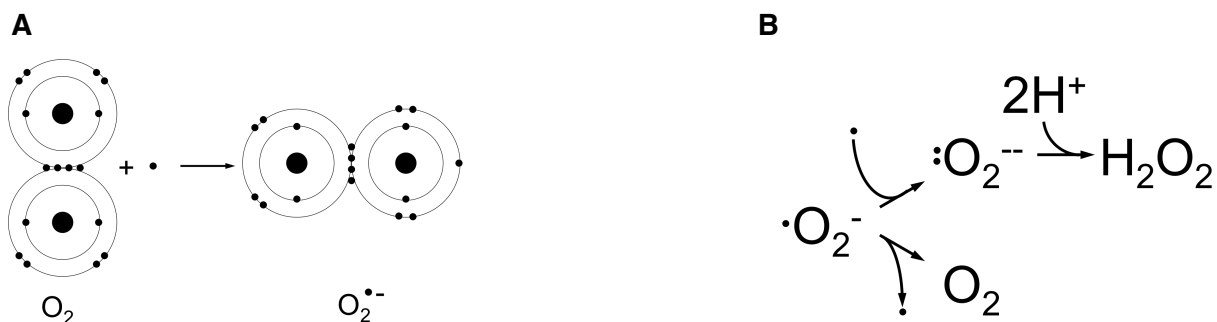
## 1.2. Radicaux libres

*Stricto sensu*, un radical libre est une espèce chimique (atome, molécule, ion) possédant temporairement un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche de valence. La présence d'un électron célibataire confère une grande instabilité, du fait que la molécule ou l'atome ne respecte pas la règle de l'octet (Fig. I3). Cette règle décrit, en effet, le comportement des atomes dans une configuration stable, c'est à dire possédant 8 électrons sur leur couche de valence. L'oxygène est sujet au non-respect de cette règle (Fig. I4).

La génération des radicaux procède généralement d'une rupture de liaison(s) chimique(s). Une liaison chimique peut se couper de façon à ce que les deux électrons de la liaison A—B soient répartis équitablement pour donner deux radicaux :  $A-B \rightarrow A\cdot + \cdot B$ . On parle dans ce cas de coupure homolytique, par opposition à une coupure hétérolytique lorsque les deux électrons de la liaison sont captés par un des atomes (donne naissance à des ions).



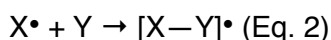
**Fig. I3. Règle de l'octet.** Les liaisons chimiques du  $CO_2$ , molécule dans laquelle 8 électrons avoisinent chacun des atomes.



**Fig. I4. L'oxygène radicalaire.** Avec deux électrons non appariés présents sur la couche externe de chacun de ses deux atomes d'oxygène, l' $O_2$  est une molécule bi-radicalaire (A). Cette caractéristique confère à l' $O_2$  une susceptibilité à capter 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en superoxyde ( $O_2\cdot^-$ ) puis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (B).

Pour se stabiliser, les radicaux vont réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques. Dans certains cas, le radical accepte un électron (rôle d'oxydant), dans d'autres, il le cède (rôle de réducteur). Et de la stabilité du radical, dépend l'orientation vers l'une ou l'autre de ces possibilités : plus le radical est stable, plus il a tendance à accepter un électron. Il représente, dans ce cas, un simple acteur d'une réaction d'oxydo-réduction classique. Inversement, plus l'instabilité est grande, plus le radical transfère son électron vers des molécules non spécifiques (c'est à dire non prévues à cet effet), mais très réactives vis à vis de l'oxygène. Néanmoins, bien que le radical initiant la réaction se soit stabilisé, l'attribut radicalaire se déplace, de façon irréversible, sur d'autres molécules (Eq. 1 ou Eq. 2) dans des réactions en chaîne destructrices, comme dans le cas de la peroxydation lipidique (traitée plus loin). Parfois, il arrive aussi que deux radicaux libres se stabilisent par leur interaction mutuelle, bien que cela génère d'autres espèces réactives. C'est ce qui se produit lorsqu'un superoxyde rencontre un deuxième superoxyde ou du

monoxyde d'azote (NO). Les radicaux libres endossent donc des rôles d'initiateur et de propagateur de réactions en chaîne.



### 1.3. Différentes formes de radicaux libres et leurs dérivés

On appelle "espèces réactives de l'oxygène" (ERO) les espèces décrivant à la fois les radicaux libres de l'oxygène eux-mêmes, mais également leurs dérivés réactifs dont la toxicité est importante (Table I1) (Evans et Halliwell, 1999). Par exemple : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), à l'instar du peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ), n'a pas de caractère radicalaire, et ne peut être considéré comme un radical au sens strictement chimique. Aussi est-il possible de proposer une classification, parmi toutes ces espèces, dans laquelle se rangent (i) les espèces primaires à caractère radicalaire comme le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyl ( $\bullet OH$ ), et le NO ; et (ii) les espèces secondaires, dérivées des primaires, tels que l' $H_2O_2$  ou le peroxyde d'azote présentant aussi des niveaux de réactivité et de cytotoxicité importants, et pouvant servir de précurseurs de radicaux comme le très dangereux hydroxyl ( $\bullet OH$ ) (Eq. 3) (Kaur et al., 1997). Les ERO majeurs produits *in vivo* sont le superoxyde et l' $H_2O_2$  (Halliwell et Gutteridge, 1999). L' $H_2O_2$  est généré soit spontanément, soit *via* des réactions non enzymatiques ou enzymatiques par dismutation du superoxyde (Halliwell et Gutteridge, 1999).



ERO	
radical	non-radical
radical superoxyde, $O_2^{\bullet-}$	peroxyde d'hydrogène, $H_2O_2$
radical hydroxyle, $\bullet OH$	ion hypochlorite, HOCl
peroxyde, $RO_2\bullet$	ozone, $O_3$
alkoxyde, $RO\bullet$	oxygène singulet, $^1O_2$
hydroperoxyde, $HO_2\bullet$	peroxyde d'azote*, $ONOO^-$

**Table I1. Les principales ERO radicalaires et non-radicalaires (d'après Evans et Halliwell, 1999).** Les ERO décrivent à la fois les radicaux oxygénés et des entités non-radicalaires, au pouvoir oxydant et/ou facilement converties en radicaux.  $\bullet OH$  réagit avec toutes les molécules.  $H_2O_2$  et  $O_2^{\bullet-}$  réagissent rapidement avec quelques molécules.  $RO_2\bullet$ ,  $RO\bullet$ , HOCl,  $ONOO^-$ , et  $^1O_2$  ont des réactivités intermédiaires. Cette table ne présente pas les espèces réactives de l'azote (ERA). Les deux ERA dérivent de l'oxyde nitrique (NO) et du dioxyde nitrique ( $NO_2$ ). Le  $^*ONOO^-$ , produit de l'association du NO et de l' $O_2^{\bullet-}$ , est considéré à la fois comme une ERO et une ERA. ERO, espèces réactives de l'oxygène.

## 1.4. Sources de radicaux libres

### 1.4.1. Sources plurielles

Toute réaction biochimique faisant intervenir l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production de radicaux libres. En tant que résidus de réactions énergétiques ou de défenses immunes, les radicaux libres sont naturellement présents dans l'organisme, et sont générés essentiellement par des mécanismes physiologiques. Ces mécanismes sont soit enzymatiques soit non enzymatiques. Les sources enzymatiques sont liées aux processus de phagocytose ou de détoxification au niveau du réticulum endoplasmique, des peroxysomes ou de la membrane plasmique. Elles incluent les NADPH oxydases (NOX), localisées à la membrane des polynucléaires, des macrophages et des cellules endothéliales (*Vignais, 2002*), et les oxygénases cellulaires dépendantes du cytochrome P<sub>450</sub> (*Coon et al., 1992*). La conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase constitue une autre source enzymatique de superoxyde et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; elle a été impliquée dans divers processus délétères *in vivo* (*Yokoyama et al., 1990*). La voie des lipoxygénases (LOX) et des cyclooxygénases (COX) génère également des ERO (*Kuehl et Egan, 1980*). La COX fait partie d'un complexe d'enzymes qui convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), précurseur des prostanoides. Le complexe consiste en une isoenzyme COX et une peroxydase. Constitutive de l'organisme, la COX-1 est présente dans une majorité de cellules ; elle participe indirectement à la formation de thromboxane. La COX-2 est essentiellement présente dans les cellules endothéliales, où elle participe, après induction par de multiples facteurs pro-inflammatoires (cytokines), au processus inflammatoire.

Les sources non enzymatiques de superoxyde sont représentées par la respiration mitochondriale et les réactions d'oxydo-réduction (fer, cuivre). Ces réactions procèdent d'un transfert direct d'électron sur l'oxygène par des coenzymes réduits ou des groupements prosthétiques, ou encore des xénobiotiques.

### 1.4.2. Mitochondrie

#### 1.4.2.1. Rappels sur l'oxydation phosphorylante

La production de radicaux par la mitochondrie est étroitement liée au mécanisme de l'oxydation phosphorylante et à son rendement, points que nous nous devons d'introduire en premier lieu.

L'énergie dans la cellule provient de l'oxydation des nutriments. Elle s'exprime sous la forme d'un potentiel de phosphorylation (potentiel phosphate : ATP/ADP.P<sub>i</sub>), maintenu par le processus de synthèse d'ATP. Il existe deux voies de synthèse d'ATP : la phosphorylation de substrat et la phosphorylation oxydative. Cette dernière, de loin la plus fertile en ATP, siège dans la mitochondrie. La phosphorylation oxydative illustre le processus chimiosmotique de couplage entre oxydation et phosphorylation. Pour rappel, l'énergie redox contenue dans les nutriments (glucose, acides gras, acides aminés) aboutit, *via* les cycles de Krebs et de Lynen ( $\beta$ -oxydation), à la formation d'équivalents réduits NADH et FADH<sub>2</sub>. Ces entités fournissent des électrons à la chaîne respiratoire (respectivement aux complexes I et II). Le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire est couplé au transfert de protons, de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, et génère un gradient de protons (ou potentiel transmembranaire, noté  $\Delta\Psi_m$ ) utilisé par l'ATP synthase pour transformer l'ADP et le phosphate inorganique (P<sub>i</sub>) en ATP (*Mitchell, 1977*). L'accepteur final des électrons est

l'oxygène qui, au niveau du complexe IV, est entièrement réduit en eau grâce à la cytochrome oxydase. Lorsque l'ADP ou les équivalents viennent à manquer, la chaîne respiratoire devient plus réduite et le flux d'électrons ralentit (*état 4* de la respiration, par opposition à l'*état 3*, dans lequel la chaîne respiratoire est très active).

La mitochondrie n'est pas une "simple machine" à synthétiser de l'ATP ; elle connaît, en réalité, quatre grandes fonctions intriquées mutuellement : (i) l'oxydation des coenzymes réduits ; (ii) la diminution de la concentration cellulaire en oxygène (principal facteur oxydant) ; (iii) le maintien de la force proton-motrice ; et (iv) la production d'ERO (pour revue : *Leverve, 2007*). Nous reviendrons sur ce dernier point plus en détails par la suite.

#### 1.4.2.2. Place du rendement de l'oxydation phosphorylante

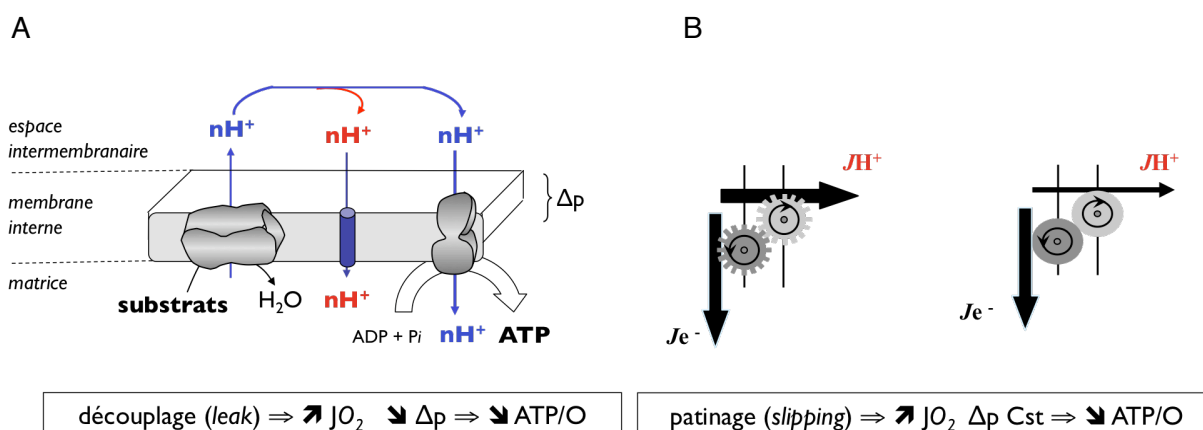
Parce que la demande cellulaire en ATP n'est pas unie stœchiométriquement à la réoxydation de nouveaux équivalents réduits, phosphorylation et oxydation sont finement régulées de manière indépendante. Il en résulte une modulation du rapport ATP/O, avec une augmentation du rendement (efficacité) lorsque ce rapport augmente, et *vice versa*. Trois mécanismes physiologiques ajustent ce rapport : (i) la stœchiométrie intrinsèque des pompes à proton, ou *slipping* ; (ii) la conductance de la membrane interne aux protons, ou *leak* ; et (iii) le site d'entrée des électrons au sein de la chaîne respiratoire (*Rigoulet et al., 1998 ; Nogueira et al., 2001*).

(i) Le processus de *slipping* siège au niveau de la cytochrome oxydase (Fig. I5A). N'affectant pas le gradient de protons, il est sans conséquence sur la synthèse d'ATP.

(ii) Contrairement au découplage contrôlé par la cytochrome oxydase, le découplage, par fuite passive de protons au travers de la membrane interne, engendre une dissipation du gradient de protons sous forme de chaleur (Fig. I5B). Cette fuite de protons est catalysée par des transporteurs de protons (protéines découplantes pour *uncoupling proteins* [UCP]). Elle dépend de la force proton-motrice, de la nature de la membrane mitochondriale (liée au type cellulaire) et de la quantité d'UCP activées. En dissociant l'oxydation des équivalents réduits à la synthèse d'ATP, ce type de découplage gaspille de l'énergie (elle entraîne une diminution du  $\Delta\Psi_m$ ). La découverte de la présence d'une forme singulière d'UCP, UCP1, a permis la compréhension du rôle physiologique du tissu adipeux brun (production significative de chaleur) chez certains mammifères (*Ricquier, 2005*), et a provoqué un intérêt grandissant pour les nouvelles protéines de cette famille, même si leur fonction découplante mérite d'être nuancée. Aujourd'hui, on sait qu'un grand nombre de tissus comme le tissu adipeux blanc, le muscle, la rate, les macrophages, le foie (cellules de Küpffer), le pancréas, etc. expriment ces protéines (*Ricquier et al., 2000 ; Bouillaud et al., 2001*).

(iii) Les électrons entrent dans la chaîne respiratoire en amont (NADH) ou en aval (FADH<sub>2</sub>) du complexe I (Fig. I6). Les électrons provenant du NADH ou du FADH<sub>2</sub> sont transférés *via* trois (complexes I, III et IV) ou deux (complexes III et IV) sites de couplages séquentiels. Le FADH<sub>2</sub> est donc moins rentable au plan énergétique, puisque la force proton-motrice résultante (pour chaque atome d'oxygène consommé) est inférieure. Les substrats cellulaires potentiellement plus riches en FADH<sub>2</sub> qu'en NADH (les lipides par opposition aux glucides), vont donc affecter la stœchiométrie de l'oxydation phosphorylante, provoquant un découplage partiel et relatif. Ainsi, selon la nature des substrats fournis, les conséquences du découplage sont différentes. En présence d'hydrates de carbones, les conséquences d'un découplage sont une diminution du gradient de proton et une baisse des rapports ATP/ADP

cytosoliques et mitochondriaux, sans changement de la consommation d'oxygène. En présence d'acides gras, en revanche, on assiste à une augmentation de la respiration, tandis que les autres paramètres restent inchangés (Leverve, 2007). Les conséquences d'un découplage étant différentes selon l'orientation métabolique préférentielle de la cellule, ce phénomène s'observe d'autant plus que les cellules concernées présentent un métabolisme lipidique important comme dans le cas du tissu adipeux brun, où le découplage est commandé par UCP1, dont l'activation requiert la présence d'acides gras (Nicholls, 2006). Dans un type cellulaire faiblement équipé pour oxyder les lipides (cellule de Küpffer), on peut s'attendre à une baisse du  $\Delta\Psi_m$  et du ratio ATP/ADP, plutôt qu'à des effets significatifs sur la respiration ou la production de chaleur.



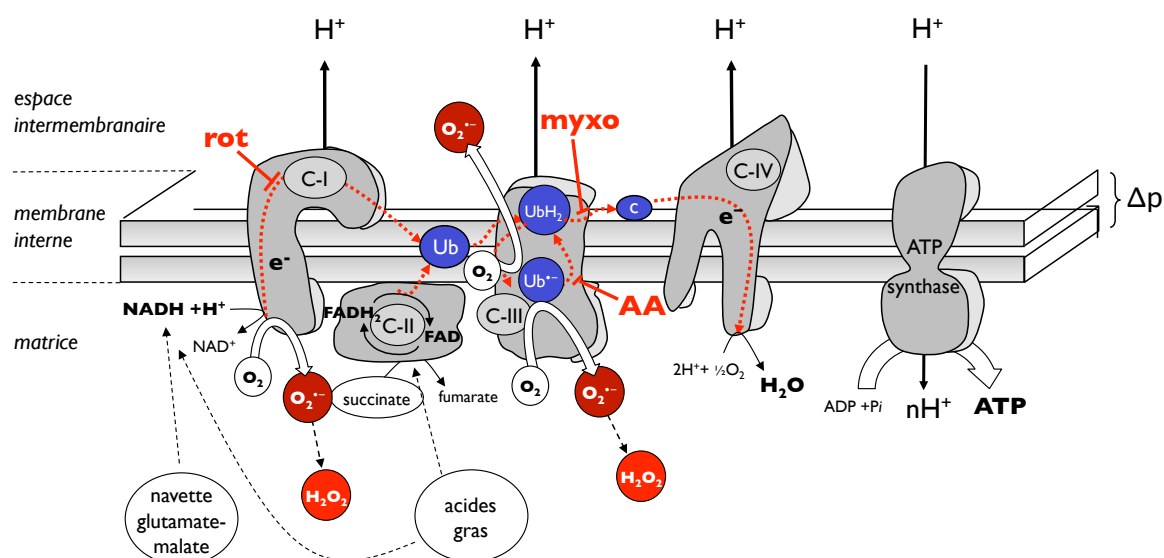
**Fig. 15. L'oxydation phosphorylante et son rendement.** Si l'oxydation phosphorylante est efficace dans la transformation des calories en ATP, elle est dite "bien couplée". Par contre, si la mitochondrie est moins efficace dans la production d'ATP, on dira qu'elle est "partiellement découplée", et alors plus de calories devront être brûlées pour générer une même quantité d'ATP. La différence énergétique est dissipée sous forme de chaleur. Nous pouvons mentionner au moins deux mécanismes altérant le rendement de l'oxydation phosphorylante. Le premier est le proton leak (A), dans lequel la perméabilité membranaire est augmentée (pores) ; il en résulte que les protons regagnent la matrice sans générer d'ATP. Le deuxième mécanisme est le redox slipping (B), dans lequel les pompes à protons patinent, causant un découplage partiel entre le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire est l'expulsion de protons (panel gauche vs. droit).  $JO_2$ , consommation d'oxygène.

#### 1.4.2.3. Production d'ERO mitochondriales

Dans les cellules eucaryotes, la réduction de l'oxygène en eau demeure incomplète et aboutit à la production mitochondriale d'anion superoxyde, faisant de l'organite la source première de radicaux (pour revues : Casteilla, 2001 ; Turrens, 2003) (Fig. 16). Ainsi, le superoxyde peut être considéré comme un sous-produit du transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire au travers des différents complexes. Par cette voie, la production radicalaire se conçoit donc comme un phénomène physiologique naturel, strictement lié à la vie aérobie, permanent et ubiquitaire, excepté dans les cellules exemptes de mitochondries (globules rouges). Dans des situations expérimentales de mitochondries isolées, on estime entre 2 à 6%, la quantité d'oxygène aboutissant à la production de superoxyde (Chance, 1979). Signalons, néanmoins, que cette production basale de radicaux de l'oxygène reste



surestimée du fait que les concentrations en substrats et en oxygène, fournis à la chaîne respiratoire, dépassent nettement celles de la réalité physiologique. Une production mitochondriale *in situ* s'élevant à moins de 1% est plus vraisemblable (Hansford *et al.*, 1997). Dans les conditions basales, la concentration intermembranaire d'anion superoxyde est contrôlée par trois mécanismes distincts : (i) l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale (Beyer *et al.*, 1991) ; (ii) les cytochromes *c* (Butler *et al.*, 1975) ; et (iii) le pH : plus il est faible, plus le superoxyde dismute spontanément (Fridovich, 1978 ; Guidot *et al.*, 1995). Le superoxyde est produit au niveau de la membrane mitochondriale externe, dans la matrice, et sur les deux faces de la membrane mitochondriale interne (pour revue : Turrens, 2003). Une fois produit, ce superoxyde est converti en  $H_2O_2$ , à la fois dans la matrice, où il est rapidement dismuté, et dans l'espace intermembranaire, à partir duquel il peut rejoindre le cytoplasme *via* des canaux voltages-dépendants (Han *et al.*, 2003). À l'équilibre avec les défenses antioxydantes opérant dans la mitochondrie, on estime entre  $10^{-10}$  et  $10^{-9}$  mol/l les concentrations respectives en superoxyde et  $H_2O_2$  (Forman *et Azzi*, 1997 ; Cadenas *et Davies*, 2000).

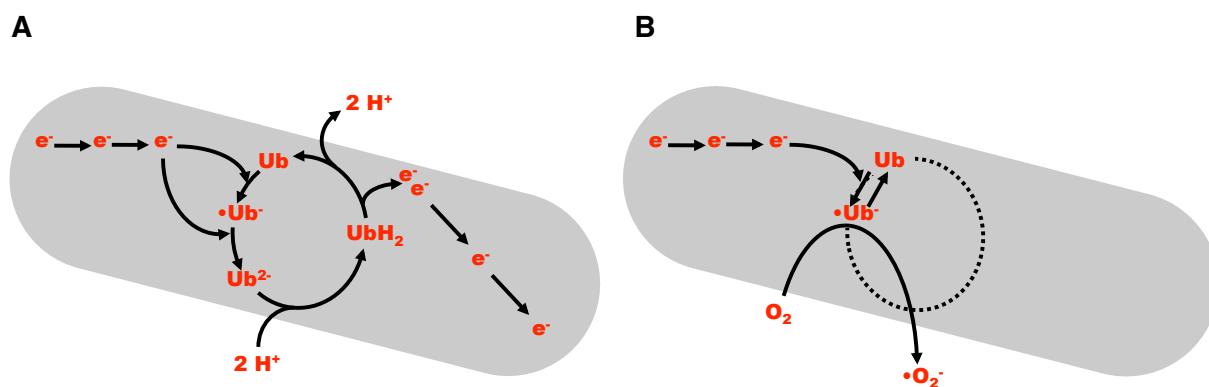


**Fig. I6. Sites de production des ERO et sites d'action des inhibiteurs classiques utilisés.** Dans le processus d'oxydation phosphorylante, les équivalents réduits ( $NADH$  et  $FADH_2$ ), dérivés de la dégradation des nutriments, sont transférés en direction d'une série de complexes d'enzymes redox localisées dans la membrane interne mitochondriale. Les électrons entrent aux niveaux des complexes (C-) I et II et sont transférés via le pool d'ubiquinone ( $Ub$ ) au C-III, puis au cytochrome *c* sur le C-IV et finalement à l'oxygène pour générer de l'eau. L'énergie libérée lorsque les électrons traversent les C-I, -III et -IV, est utilisée pour pomper les protons à l'extérieure de la matrice. Il en résulte un gradient électrochimique, l'équivalent biologique d'un "condensateur". Cette capacitance est utilisée comme source d'énergie potentielle pour générer de l'ATP via l'ATP-synthase. L'élévation de ce gradient (hyperpolarisation) — lors d'une inhibition de la chaîne respiratoire — entraîne une augmentation de la production d'ERO, dont le superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Les inhibiteurs spécifiques des complexes impliqués dans la production d'ERO, respectivement la roténone (*rot*) pour le C-I, et l'antimycine A (*AA*) ou le myxothiazol (*myxo*) pour le C-III, permettent de mettre en évidence cette production spécifiquement à leurs niveaux. ERO, espèces réactives de l'oxygène.

Au cours des 40 dernières années, différentes sources mitochondriales de superoxyde ont été identifiées, qu'il s'agisse de complexes respiratoires ou d'enzymes. Parmi les nombreuses composantes respiratoires capables de générer thermodynamiquement du superoxyde, citons les flavoprotéines, la semi-ubiquinone ou les groupements fer-soufre. Les études montrent que la production d'anion superoxyde peut se manifester sur deux sites mitochondriaux : le complexe I (au niveau de la matrice mitochondriale) et le complexe III (aux niveaux de la matrice et de l'espace intermembranaire *via* l'ubiquinone) (Fig. 16) (Boveris et Chance, 1973 ; St-Pierre et al., 2002 ; Kudin et al., 2004). La mise en évidence de leur implication est rendue possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire : la roténone (complexe I), et l'antimycine ou le myxothiazol (complexe III) (pour revue : Dröge, 2002).

Plusieurs données récentes démontrent, par ailleurs, que le complexe I est le site majeur de production de radicaux mitochondriaux (St-Pierre et al., 2002 ; Barja, 2002), alors que l'on a longtemps pensé que c'était le complexe III qui en était le siège (Boveris et Chance, 1973 ; Turrens et al., 1985). Bien que sa relevance physiologique soit discutée, et que les mécanismes lui étant sous-jacents restent encore flous, un flux reverse d'électrons en direction du complexe I a été décrit (Kudin et al., 2004 ; Grivennikova et Vinogradov, 2006). Trois structures précises, intriquées mutuellement, se disputent le centre de production de superoxyde au niveau du complexe I : (i) le pool de quinones (Cadenas et al., 1977) ; (ii) le groupe des flavines mononucléotides (FMN) (Liu et al., 2002) ; et (iii) le groupe fer-soufre [Fe/S] (Genova et al., 2001).

Au niveau du complexe III, la production de superoxyde est liée à la configuration électronique de l'ubiquinone (ou coenzyme Q<sub>10</sub>) (Fig. 17). Les quinones peuvent emprunter trois états d'oxydo-réduction distincts : une forme réduite (ubiquinol, UbH<sub>2</sub>), une forme semi-réduite (semi-ubiquinone, UbH•), ou une forme oxydée (ubiquinone, Ub). L'une de ces formes, la semi-réduite, est hautement instable, et interagit beaucoup plus facilement avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde (Turrens et al., 1985).



**Fig. 17. La production de superoxyde par la boucle des quinones.** Deux électrons sont nécessaires pour réduire l'ubiquinone (Ub) en ubiquinol (UbH<sub>2</sub>) (A). Si la semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène, le transfert monoélectronique sur cette dernière entraîne la production de superoxyde (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) (B).

#### 1.4.2.4. Les modulateurs de production d'ERO mitochondriales

La production mitochondriale de superoxide étant une réaction non enzymatique, son taux de production, au niveau de la boucle des quinones, se résume à une fonction entre le radical semi-ubiquinone et la concentration en oxygène (Eq. 4) (Turrens, 1997 ; Turrens, 2003). Tout facteur modulant ces paramètres jouera *in fine* sur la production de radicaux.

$$d[O_2]/dt = k [O_2] [UbH\bullet] \text{ (Eq. 4)}$$

Le redox de la chaîne respiratoire (dont la semi-ubiquinone) subit un contrôle thermocinétique. Les forces lui étant associées, que sont le potentiel redox (NAD<sup>+</sup>/NADH) et la force proton-motrice, représentent donc des régulateurs importants de la production de radicaux. Typiquement, l'augmentation de la production de superoxyde est la conséquence de l'accroissement du  $\Delta\Psi_m$ . On parle, dans ce cas, d'état d'hyperpolarisation. Il s'en suit alors un ralentissement du transport des électrons, leur accumulation au niveau des centres redox, et l'augmentation de la demie-vie de la semi-ubiquinone, d'où l'augmentation de la probabilité pour l'oxygène de rencontrer un seul électron (Korshunov *et al.*, 1997).

Différentes situations métaboliques convergent vers cet état. Ce sera le cas en situation d'hypoxie (Boveris et Chance, 1973 ; Cadenas et Boveris, 1980), ou si l'ADP vient à manquer (Boveris *et al.*, 1972). Au niveau du complexe III, la déplétion en cytochrome *c* ou la présence d'inhibiteurs spécifiques (cyanure, myxothiazol) inhibe également le flux d'électrons, accroissant *de facto* la production d'ERO (Turrens *et al.*, 1982). Dans une situation opposée, lors d'un apport excessif en oxygène (hyperoxie), la probabilité d'une réduction partielle de l'ubiquinone augmente également (Boveris et Chance, 1973), tout comme dans les situations dans lesquelles les apports en substrats sont supérieurs à la demande énergétique (Du *et al.*, 2001), ou encore lors d'effort physique (Agarwal et Sohal, 1994). *A contrario*, cette production s'abaisse avec la diminution des forces et des contraintes cinétiques exercées sur la chaîne respiratoire, lorsque la pression partielle en oxygène diminue (Cino et Del Maestro, 1989), ou en présence de substrats en concentrations non saturantes (Hansford *et al.*, 1997), ou encore lors de découplage modéré (Skulachev, 1998).

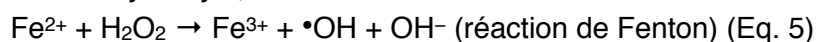
Un autre aspect intéressant, et pour le moins curieux, dans le métabolisme des ERO est le type de substrat consommé par la chaîne respiratoire (pour revue : Leverage et Fontaine, 2001). En effet, outre la quantité, la qualité du substrat est aussi un facteur de modulation de production mitochondriale de radicaux (Taylor *et al.*, 1995 ; St-Pierre *et al.*, JBC 2002), et l'on pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle les différents types de substrats (glucides vs. lipides) sont gérés par des populations mitochondriales différentes (différence de distribution en complexes de la chaîne respiratoire).

#### 1.4.3. Métaux de transition

Bien qu'indispensables à l'état de traces, le cuivre et le fer, en excès ou lorsqu'ils ne sont pas liés aux protéines, deviennent de remarquables promoteurs de stress oxydant (Halliwell et Gutteridge, 1984), à l'instar des métaux toxiques (chrome, vanadium, etc.), en potentialisant la toxicité du superoxyde et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Beauchamp et Fridovich, 1970). *In vitro*, les hydroperoxydes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROOH) peuvent se décomposer en radicaux libres extrêmement oxydants ( $\bullet$ OH ou RO $\bullet$ ) en présence de complexes de métaux réducteurs, mécanisme

illustré par la réaction de Fenton (Eq. 5). Dans cette réaction, en présence d'ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), l' $\text{H}_2\text{O}_2$  se décompose en  $\bullet\text{OH}$  et en ion  $\text{OH}^-$  (Imlay et al., 1988). Cette réaction s'estompe spontanément par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde qui régénère  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  selon la réaction d'Haber-Weiss (Eq. 6). Le superoxyde contribue encore à la présence de métaux libres en favorisant leur libération à partir de protéines comme l'aconitase (Flint et al., 1993) et la ferritine (Halliwell et Gutteridge, 1999). Ainsi, la présence simultanée d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , d'anion superoxyde et de fer favorise le maintien de la production de radical hydroxyle. Les métaux libres contribuent en outre au stress oxydant en convertissant l'acide ascorbique en sa forme radicalaire (Eq. 7) (Herbert et al., 1996).

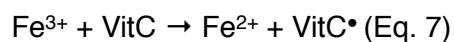
*Les métaux de transition comme le fer ou le cuivre catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle, hautement réactif :*



*Le superoxyde favorise le renouvellement du  $\text{Fe}^{2+}$  en se conjuguant au  $\text{Fe}^{3+}$  :*



*En présence d'ions métalliques comme  $\text{Fe}^{3+}$ , la vitamine C devient pro-oxydante :*

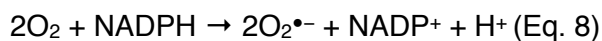


Dans les conditions physiologiques, la séquestration de fer et de cuivre par des protéines spécifiques (ferritine, lactoferrine, transferrine), non-enclines aux réactions de type Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1990), joue le rôle d'antioxydant primaire et prévient du stress oxydant. On assistera, néanmoins, à un stress oxydant induit par une libération de ces métaux lors de lyses cellulaires (hémolyse, cytolysse hépatique, etc.) à l'encontre des cellules avoisinantes (Halliwell, 1992). Ce sera aussi le cas lorsque l' $\text{H}_2\text{O}_2$  réagit avec l'hémoglobine et la myoglobine pour initier le processus de peroxydation lipidique (Puppo et Halliwell, 1988).

#### 1.4.4. NADPH-oxydase

À un niveau physiologique, la production de radicaux libres de l'oxygène et de l'azote, par les cellules phagocytaires activées (macrophages, polynucléaires), assure un rôle anti-infectieux majeur. Au cours d'un *burst oxydatif* (explosion respiratoire), l'activation du complexe de la NADPH oxydase (NOX) permet l'utilisation de l'oxygène pour produire, au niveau de la membrane cellulaire, de grandes quantités d'anions superoxydes à partir de NADPH et favoriser la phagocytose des produits étrangers et des composants bactériens (Eq. 8). Cette production de superoxyde est à l'origine d'autres espèces extrêmement réactives, envers le matériel phagocyté, comme l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (via les SOD) et l'acide hypochlorique (HOCl), générateur d'anion hydroxyle (Eq. 9) (Candeias et al., 1993). La réactivité de ce cocktail est amplifiée par la production concomitante de NO, à partir d'oxygène et d'arginine dans une réaction catalysée par la famille des NO synthases (NOS), dépendantes du NADPH (Moncada et Higgs, 1993). Effectivement, outre sa fonction physiologique dans le tonus vasculaire (facteur vasodilatateur), le NO devient fortement corrosif lorsque d'autres radicaux lui sont associés. Sous l'action des cytokines et des endotoxines, l'isoforme inductible de la NOS (iNOS) est activée au niveau des cellules immunitaires, et produit de

grandes quantités de NO, lequel interagit avec l'anion superoxyde pour former du peroxy-nitrite, et secondairement d'autres radicaux (NO<sub>2</sub>, •OH). Notons que cette voie de production d'ERO est fortement sollicitée dans le stress oxydatif accompagnant les complications liées à l'inflammation. Ajoutons enfin que les fonctions de la NOX ne sont pas restreintes au simple système immunitaire, et certaines isoformes représentent des acteurs clés au sein d'autres types cellulaires, en tant que composantes redox de mécanismes de signalisation (*Rhee, 2006* ; pour revues : *Newsholme, 2007*).



#### 1.4.5. Xanthine oxydase

En situation ischémique (et hypoxique), le déficit relatif en oxygène et en ATP entraîne la formation d'hypoxanthine. La xanthine deshydrogénase, est alors oxydée en xanthine oxydase et entraîne la formation d'acide urique et de superoxyde ou de peroxydes (Eq. 10). L'apport supplémentaire en oxygène (situation d'ischémie-reperfusion) favorise la production de superoxyde et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, propageant les dommages tissulaires ; la présence d'ions métalliques, fréquemment libérés à partir de tissus hypoxiques enclins à la nécrose, donnera aussi lieu à la production d'anion hydroxyle (*Evans et al., 1996*).



#### 1.4.6. Exposition à des toxiques

Brièvement, pour finir, la production de radicaux libres peut également résulter de phénomènes toxiques liés au catabolisme de molécules spécifiques dans l'organisme. L'intoxication à ces molécules endogènes (dégradation de la dopamine) ou exogènes (intoxication à l'amiante, aux herbicides, aux pesticides) relève de la production d'ERO (*Halliwell et Gutteridge, 1999*). Il en va de même avec les radiations (UVA) qui sont également des sources importantes de radicaux libres (hydroxyle) en clivant la molécule d'eau. L'exposition à des xénobiotiques pro-oxydants favorise la production de radicaux libres, par voie mitochondriale, en interagissant avec la chaîne respiratoire. Alors que certains peuvent agir en bloquant le transport électronique de la chaîne respiratoire, d'autres (doxorubicine, anthracyclines) pourront y entrer et participer à des cycles redox (accepteur d'électron), et stimuler la formation de superoxyde. Enfin, certaines drogues (paracétamol) peuvent aussi dépléter un tissu en antioxydants après activation de la cytochrome P<sub>450</sub>.

### 1.5. Atteintes cellulaires

#### 1.5.1. Une myriade de cibles

Bien qu'inoffensives à doses physiologiques, les ERO, lorsque leur production est excessive trop longtemps et/ou qu'elle n'est plus compensée par l'action des antioxydants, engendrent un déséquilibre chronique de la balance pro-/anti-oxydants conduisant à un stress oxydant toxique pour la cellule (*Sies, 1991*). Les dégâts cellulaires résultant d'un manque de contrôle des niveaux d'ERO recouvrent des atteintes directes sur l'ensemble des macromolécules du vivant (membranes cellulaires, protéines, ADN). Ces atteintes vont de la

peroxydation lipidique (*Rubbo et al., 1994*) à l'oxydation des protéines (*Stadtman et Levine, 2000*), ou des polysaccharides (*Kaur et Halliwell, 1994*), en passant par des mutations de l'ADN (*Richter et al., 1988*). Les caractères mutagènes et cytotoxiques des métabolites associés à ces réactions peuvent, à leur tour, engendrer d'autres lésions. Ce stress occasionne généralement des phénomènes inflammatoires, dont parfois la production d'auto-anticorps. *In fine*, les conséquences de ces dommages oxydatifs aboutissent à des modifications de structure et de fonction, voire à la mort par suicide cellulaire (ou mort cellulaire programmée : apoptose).

### 1.5.2. Une question de stabilité !

La réactivité des ERO est extrêmement variable selon la nature du radical considéré. Elle dépend de sa demi-vie et de son lieu de production. En effet, plus l'électron est instable, plus la demi-vie du radical est courte, moins il diffuse, et plus il risque d'attaquer les molécules voisines. Alors que certains radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le NO sont peu réactifs — aussi en raison de leur rôles physiologiques en tant que médiateurs — ils représentent des précurseurs d'autres espèces beaucoup plus nocives, telles que les radicaux peroxydes, l'hydroxyle ou le peroxyde d'azote. Ainsi, la toxicité des ERO est liée à la fois à leur toxicité intrinsèque et à leur capacité à générer d'autres entités réactives. Par exemple : la formation simultanée de superoxyde et de NO produit du peroxyde d'azote, un puissant oxydant des centres métalliques, des thiols et des antioxydants. Ce dérivé est également capable de modifier certaines protéines, les bases de l'ADN, et d'affecter l'intégrité mitochondriale (*Beckman et Koppenol, 1996*). Autre exemple : en milieux aqueux, le superoxyde dismute ; il entraîne alors la formation d' $H_2O_2$ , molécule amphiphile, capable de traverser les milieux hydrophiles et lipophiles (donc tous les milieux du vivant !). Au cours de sa diffusion cellulaire, l' $H_2O_2$  constitue un précurseur de la formation de radical hydroxyle (comme nous l'avons vu avec la réaction de Fenton) extrêmement réactif et référencé comme le plus cytotoxique (*Fridovich, 1978 ; Chance, 1979 ; Halliwell, 1984 ; Gutteridge & Halliwell, 1993*).

### 1.5.3. Peroxydation lipidique

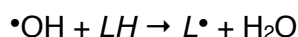
Le degré élevé d'insaturation des acides gras polyinsaturés leur confère une grande sensibilité à l'égard du processus d'oxydation (*Pamplona et al., 2000 ; Hulbertl, 2005*). Ce phénomène, nommé "peroxydation lipidique", repose sur un mécanisme de dégradation en chaîne des lipides conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, qui eux-même engendrent d'autres produits terminaux hautement réactifs. Lors des attaques radicalaires, les acides gras voient l'un de leurs atomes d'hydrogène — situé sur les carbones placés entre deux doubles liaisons — arraché par le radical, aboutissant à la formation d'un radical diène conjugué (*Esterbauer et al., 1992*). À moins d'être neutralisés par un système antioxydant (vitamine E, ubiquinol, glutathion peroxydase), les hydroperoxydes instables nouvellement formés continuent à s'oxyder et à se fragmenter en radicaux alkoxydes et en peroxydes, aux durées de vie beaucoup plus longues. Ces radicaux réagissent extrêmement rapidement avec les molécules lipidiques adjacentes, propageant ainsi le phénomène d'oxydation. Au sein d'une membrane biologique, des dizaines d'étapes de propagation peuvent avoir lieu avant qu'une réaction de terminaison n'intervienne.

Au cours de ces réactions en chaîne, les sous-produits électrophiles des radicaux libres produits sont délétères pour les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Il s'agit principalement d'aldéhydes et d'époxydes. Parmi les plus fréquents, notons l'isoprostane (métabolite de l'acide arachidonique), les alcénals, le 4-hydroxynonanal (HNE), le dialdéhyde malonique (MDA), ou encore les acides thiobarbituriques (TBARS) (Morrow et al., 1995). Certains forment des liaisons covalentes assez stables (thioéthers et bases de Schiff) avec les groupements nucléophiles des protéines, des phospholipides et des acides nucléiques.

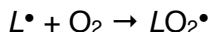
Une augmentation transitoire ou prolongée des taux d'hydroperoxydes lipidiques membranaires peut avoir de nombreux effets négatifs dans les compartiments lipidiques, mais les conséquences de la peroxydation lipidique varient suivant les types de lipides affectés. Lorsque les phospholipides membranaires sont touchés, la peroxydation est responsable d'altérations physiques (diminution de la fluidité, création de pores hydrophiles) et fonctionnelles au niveau des récepteurs ou des transporteurs à la membrane (y compris la membrane mitochondriale interne) et de la transduction des signaux cellulaires (Hong et al., 2004). L'oxydation des lipides circulants, et plus particulièrement des LDL (lipoprotéines de faible densité), participe à la formation de la plaque d'athérome.

#### Processus de peroxydation lipidique

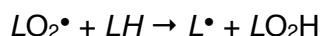
Un radical initiateur ( $\bullet\text{OH}$ ) retire un atome d'hydrogène à partir d'un lipide polyinsaturé membranaire (LH) :



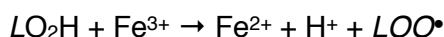
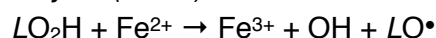
Le lipide radicalaire produit réagit rapidement avec l'oxygène :



Le radical peroxyde formé peut attaquer les chaînes lipidiques adjacentes et propager la réaction de peroxydation. La réaction en chaîne génère des lipides hydroperoxydes ( $\text{LO}_2\text{H}$ ) qui, en s'accumulant dans la membrane, la déstabilisent et génèrent des macropores, provoquant une fuite d'ions :



Les ions métalliques catalysent la réaction en chaîne en décomposant les peroxydes en radicaux peroxydes ( $\text{LO}\bullet$ ) et alkoxydes ( $\text{LOO}\bullet$ ) :



#### 1.5.4. Oxydation des protéines

Les protéines, au même titre que les lipides, sont également sensibles aux attaques radicalaires. Les plus à risque portent un groupement sulfhydryle (ou thiol : SH) et sont largement répandues dans les familles enzymatiques. L'oxydation induit l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (Peng et al., 2000 ; Levine, 2002). Modulées par la présence de métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) et, selon l'intensité du stress oxydant, les réactions oxydatives peuvent engendrer des modifications des chaînes protéiques de deux types : des coupures de liaisons peptidiques et des ajouts de sous-produits réactionnels d'oxydation (peroxydation lipidique). Associées au stress oxydant, les nitrosylations sont des phénomènes répandus, et une ERO de type peroxy-nitrite est capable de convertir la tyrosine

en 3-nitrotyrosine, et d'agir au niveau des résidus tyrosine contenus dans les protéines (*Van der Vliet et al., 1996*).

Lors d'atteintes oxydatives, les altérations structurales occasionnées sur les protéines engendrent leur inactivation et affectent leurs propriétés biologiques. Les protéines peuvent également subir des phénomènes de réticulations, dans lesquels elles tendent à s'agglutiner anormalement au sein des cellules ou à leur périphérie, en raison de leur forte hydrophobie. Notons, enfin, que les protéines oxydées, y compris les enzymes antioxydantes (*Pigeolet et Remacle J, 1991*) sont beaucoup plus vite dégradées, car plus sensibles aux actions des protéases et du protéasome (*Dean et al., 1997*). Cytoprotectrices et pouvant intervenir en fonction support aux défenses antioxydantes lors de stress oxydant, les protéines de stress de type Hsp70 (Heat Shock Protein) aident justement, de part leur rôle de protéines chaperonnes, à la prise en charge des protéines ayant subi des dommages oxydatifs (*Welsh, 1992 ; Essig et Nosek, 1997*).

#### 1.5.5. Atteintes de l'ADN

Avec ses quelques  $4.10^9$  paires de bases, l'acide désoxyribonucléique ou ADN, bien que matrice de la composition biochimique de la cellule, est hautement sensible aux ERO ( $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , dérivés d' $\text{HOCl}$ ). En effet, parmi les milliers d'attaques quotidiennes sur l'ADN, de nombreuses proviennent des radicaux libres (environ  $10^4$ ) qui engendrent de multiples altérations génomiques, réparties en au moins cinq grandes classes. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaire, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (*Cadet et al., 2002*). Toutes les bases de l'ADN peuvent être endommagées par l'attaque des ERO, mais la plus étudiée est la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), formée à partir de l'attaque de l'hydroxyle sur la déoxyguanosine. L'attaque radicalaire peut être directe au niveau des bases, selon deux mécanismes : (i) dirigée contre le sucre lui-même, responsable de coupure de chaîne simple brin ; ou (ii) dirigée contre les liaisons base/désoxyribose, générant un site abasique. L'attaque radicalaire peut aussi procéder de manière indirecte lorsqu'elle met en jeu des dérivés de peroxydation lipidique tels que les aldéhydes mutagènes, responsables de bases MDA-guanine ou éthéno-dérivées sur l'ADN. Notons que les attaques radicalaires sur les nombreuses protéines en contact avec l'ADN, en charge des processus de lecture (enzymes/facteurs de réplication ou de transcription) ou de défense (histones), entraînent des pontages des protéines ou des adduits sur des bases.

Il est intéressant de se focaliser sur l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cadre du stress oxydant. En effet, moins équipé en systèmes de réparation (absence d'histone) que ne l'est l'ADN nucléaire, et à proximité directe des sites de production radicalaire, l'ADNmt est un matériel bien exposé au stress oxydant, comme l'atteste la présence 10 à 20 fois plus élevée de marqueurs mutagènes (*McCord et Fridovich, 1988*). Même si 95% des protéines mitochondriales sont encodées par l'ADN nucléaire, l'ADNmt code pour des protéines de première importance au plan du métabolisme (complexe I, cytochrome oxydase, cytochrome b) ou des réparations mitochondriales. Dans une cellule, on compte des centaines de mitochondries et des milliers d'ADNmt ; ainsi, des altérations du génome mitochondrial auront des répercussions dramatiques au plan de la fonction et de l'intégrité tissulaire (*Wallace et al., 2008*).



Heureusement, le jeu de processus de réparation assure la conservation des séquences respectives des ADN nucléaire et mitochondrial (Turrens, 2003 ; Evans et al., 2004), bien que ces systèmes soient limités en cas de stress oxydant trop important. Dans le cas de dommages irréversibles de l'ADN, on assiste à des perturbations dans les mécanismes de réplication capables de retentir en terme d'erreurs sur la lecture et la synthèse de l'ADN et avec pour conséquences : des mutations génomiques spontanées (de type transversion GC vers TA). Dans les cas d'impossibilité complète de réplication de l'ADN, il y aura initiation de l'apoptose. En conclusion, on admet que les dommages de l'ADN reflètent essentiellement une saturation des systèmes de défenses antioxydantes endogènes et des systèmes de réparation spécifique (Hutter et al., 2007 ; Maiese et al., 2007 ; Rachek et al., 2007).

## 1.6. Systèmes de défenses antioxydantes

### 1.6.1. Une riposte hautement stratégique

On appelle antioxydant : toute molécule ayant la faculté de diminuer ou d'empêcher l'oxydation d'autres substances. Dans cette définition fonctionnelle, on admet, par ailleurs, que la concentration de l'antioxydant est inférieure proportionnellement au substrat oxydable. Les systèmes antioxydants assurent une double ligne de défense et l'on peut schématiquement les scinder en deux grandes familles, selon qu'ils (i) préviennent directement la formation radicalaire (antioxydants primaires) ; ou (ii) épurent les ERO (antioxydants secondaires).

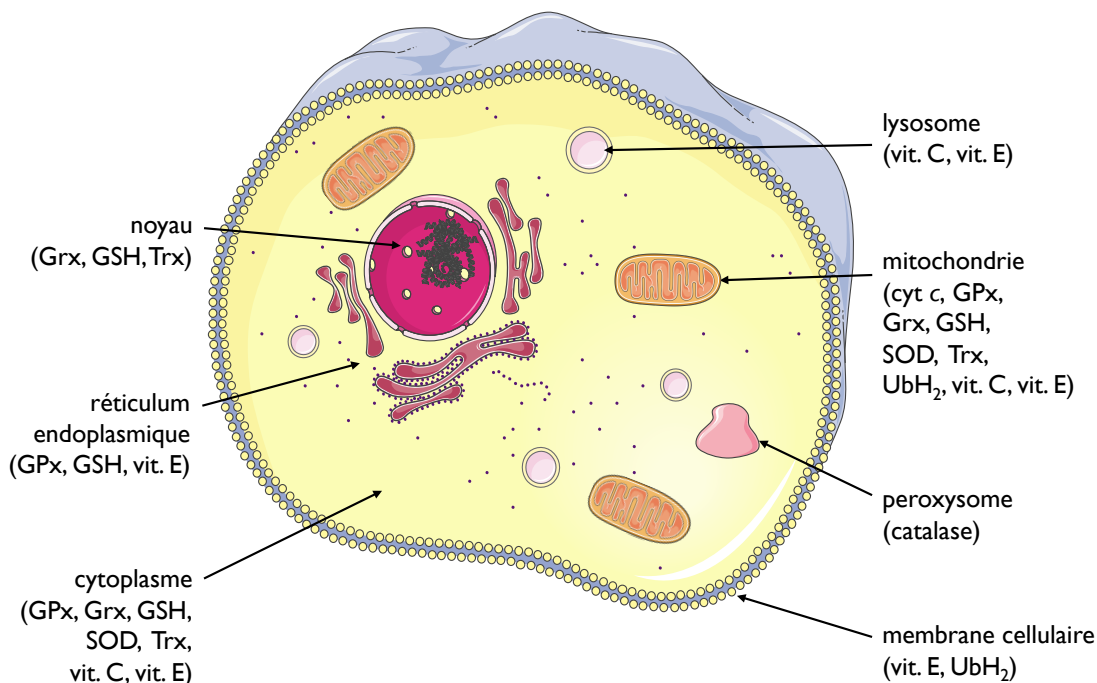
Dans les conditions physiologiques normales, la production de radicaux libres est parfaitement contrôlée par une riposte antioxydante fine et polymorphe (à l'image de la diversité des formes et des lieux de production d'ERO), autorisant une adaptation subtile aux niveaux de radicaux générés (Halliwell et al., 1994). Ainsi, un équilibre permanent de la balance pro-/anti-oxydants est assuré. Les stratégies antioxydantes sont nombreuses et mettent en jeu des systèmes d'une remarquable variété physico-chimique, à la fois enzymatiques et non enzymatiques, dans tous les compartiments organiques (intra/extracellulaires, mitochondriaux, membranaires) (Fig. I8). Le recours séquentiel à ces différents systèmes assure des défenses tout à la fois redondantes, complémentaires et synergiques, dans la prise en charge des ERO. Les composés antioxydants non enzymatiques regroupent des petites molécules hydro et liposolubles chargées de piéger les espèces radicalaires, alors que les enzymes antioxydantes dégradent les superoxydes et les peroxydes.

### 1.6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

#### 1.6.2.1. Principe antioxydant

Le principe antioxydant des systèmes non enzymatiques est le suivant : l'antioxydant fournit un électron au radical, lui faisant alors perdre son caractère radicalaire. La molécule antioxydante, nouvellement radicalaire, devrait théoriquement entraîner des réactions d'oxydation en chaîne. Cependant, la particularité de ces piègeurs repose sur leur redoutable stabilité, leur conférant le temps nécessaire pour (i) compléter la réaction d'oxydoréduction ; (ii) se régénérer (par l'acquisition d'un électron supplémentaire) ; ou (iii) s'oxyder (par la perte d'un deuxième électron). On donne le nom "éboueurs" (*scavenger* dans la littérature anglosaxonne) aux acteurs de ce mécanisme antioxydant. Il en existe deux types : les liposolubles et les hydrosolubles. Les scavengers liposolubles (vitamine E,

caroténoïdes, ubiquinol) sont essentiellement membranaires (cellule, mitochondrie), notamment en raison de leur capacité à neutraliser le phénomène de peroxydation lipidique en s'oxydant puis en se stabilisant (Ham et Liebler, 1995). Les scavengers hydrosolubles (vitamine C, glutathion, acide urique, bilirubine, albumine) assurent, quand à eux, la détoxification contre les ERO dans les compartiments hydrophiles.



**Fig. 18. Distribution des antioxydants dans la cellule.** Les systèmes antioxydants intègrent l'ensemble de l'espace cellulaire. GPx, glutathion peroxydase ; Grx, glutaredoxine ; GSH, glutathion réduit ; SOD, superoxyde dismutase ; Trx, thioredoxine ; vit., vitamine.

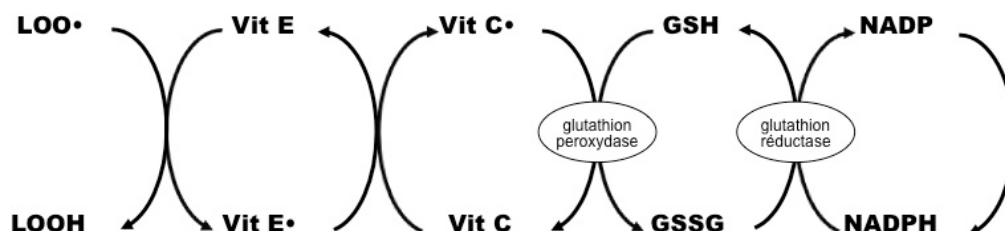
#### 1.6.2.2. Composés exogènes

##### 1.6.2.2.1. Vitamines A, E, et C

Nombre de composés antioxydants contenus dans les aliments ont pour caractéristique de piéger les ERO. Ainsi la vitamine E (ou  $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), l'ubiquinol, les caroténoïdes ( $\beta$ -carotènes, pro-vitamine A), les polyphénols, les alcaloïdes et les phytates stabilisent les radicaux en captant leur électron célibataire (Kinsky, 1989 ; Bors et al., 1990). Parmi les ERO inactivés pris en charge par la vitamine C, mentionnons :  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $^1O_2$ ,  $HO_2$ ,  $HOCl$ ,  $ONOO^-$ ,  $RO\bullet$ ,  $RO_2\bullet$  (Halliwell, 1996). Malgré son rôle pro-oxydant, en présence d'ions métalliques libres, la vitamine C possède une action antioxydante prédominante dans les conditions basales (Halliwell, 1990). La vitamine E est un antioxydant intra et extracellulaire, localisé dans les membranes et les lipoprotéines. Elle élimine les radicaux peroxydes intermédiaires, dérivés de la peroxydation lipidique (Mukai, 1993).

Une fois activées, ces "molécules piègeuses" sont dégradées ou réutilisées comme substrats dans des cycles réactionnels de régénération. Cette dernière option cellulaire assure un réapprovisionnement de *scavenger* après destruction des molécules radicalaires, et offre une véritable synergie de défense. Par exemple, la vitamine C et l'ubiquinol recyclent

— par réaction de réduction — la vitamine E radicalaire ( $\alpha$ -tocophéryl) en vitamine E active ( $\alpha$ -tocophérol) (Packer, 1991). La vitamine C radicalaire (radical ascorbyl ou acide ascorbique semi-réduit) est quand à elle régénérée de façon purement enzymatique par du glutathion sous sa forme réduite (GSH), lui même régénéré à l'aide de NADPH et de l'enzyme glutathion réductase (GSH-R) (Fig. I9).



**Fig. I9. Cycles réactionnels de régénération des antioxydants.** *GSH*, glutathion réduit ; *GSSG*, glutathion oxydé ; *LOO•*, radical peroxyde lipidique ; *LOOH*, hydroperoxyde lipidique ; *vit*, vitamine.

#### 1.6.2.2.2. Métaux

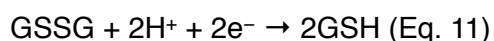
Malgré leur potentiel pro-oxydant, sous leur forme libre, les métaux se comportent indirectement comme des antioxydants en vertu de leurs propriétés au sein des métallo-enzymes, c'est à dire des enzymes possédant dans leur structure, ou fixant sur certains de leurs sites actifs, des ions métalliques. Par exemple : le sélénium est un cofacteur enzymatique essentiel de deux systèmes redox de la cellule, à savoir le glutathion et les thioredoxines (Ganther, 1999), d'où l'importance d'une couverture nutritionnelle suffisante en ces éléments pour maintenir l'activité enzymatique.

#### 1.6.2.3. Composés endogènes

##### 1.6.2.3.1. Glutathion

D'autres composés de petits poids moléculaires, non fournis exclusivement par l'alimentation mais aussi synthétisés par l'organisme, assurent un rôle antioxydant. L'un des plus important est le glutathion. La cystéine, (acide aminé limitant), ainsi que le glutamate et la glycine sont mobilisés par la sous unité catalytique de la glutamylcystéine ligase (GCLC) et la glutathione synthétase, les deux enzymes limitantes dans la biosynthèse *de novo* de GSH (Soltaninassab et al., 2000).

Les principales propriétés biochimiques du GSH lui sont conférées par sa fonction thiol (Del Corso et al., 2002). Couplé à sa forme disulfure/oxydée GSSG, le GSH représente le tampon redox le plus important de la cellule, et son équilibre redox (ratio  $GSSG/2GSH$ ) (Eq. 11) constitue le meilleur indicateur de l'environnement redox de la cellule (Ostergaard et al., 2004). Ce ratio est déterminé par les enzymes glutathion peroxydase (GPx) et GSH-R.



Le potentiel antioxydant du glutathion lui vient de sa capacité à protéger les cellules de presque toutes les ERO ( $OH\bullet$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $ONOO^-$ ,  $RO\bullet$ ,  $RO_2\bullet$ ), en les réduisant

directement, ou indirectement en tant que substrat de la réaction couplée à la GPx (Evans, 1999 ; Griffith et Mulcahy, 1999). Outre sa capacité à prévenir la propagation des ERO, le GSH peut réparer les attaques oxydatives sur les groupements thiol de la cystéine (Dalle-Donne, 2003).

Dans les conditions physiologiques, l'état redox intracellulaire des thiols est très réduit. La concentration intracellulaire de GSSG avoisine les 1% du pool de glutathion total. En augmentant transitoirement ce ratio, des élévations éphémères d'ERO pourraient jouer sur la signalisation cellulaire (reflétant ainsi un rôle indirect des ERO dans cette fonction) ; des modulations importantes de GSSG seront quand à elles davantage symptomatiques d'état de stress oxydant avéré, plus que des facteurs de signalisation redox physiologiques (Bunnell et Pacht, 1993). En dysrégulant l'homéostasie du glutathion (augmentation excessive du rapport GSSG/GSH), diverses sources de stress oxydant modulent, d'ailleurs, les voies de signalisation connectées au statut redox (Haddad, 2000). Le glutathion occupe donc une place de pivot cellulaire dans la mise en jeu de voies adaptatives et de défenses, point que nous allons approfondir plus loin.

#### 1.6.2.3.2. Ubiquinol et cytochrome *c*

À l'instar du cytochrome *c*, l'ubiquinone (ou coenzyme Q<sub>10</sub>), outre son rôle de transporteur électronique, joue le rôle d'antioxydant dans sa forme totalement réduite (ubiquinol) (Beyer, 1990 ; Ernster et Dallner, 1995) ; elle est présente dans toutes les membranes cellulaires (essentiellement dans l'appareil de Golgi et les membranes lysosomales) (Pobezhimova et Voinikov, 2000). Cette petite molécule, mobile au niveau de la membrane lipidique, est située dans la région hydrophile de la couche des phospholipides, où elle contribue à l'élimination des peroxydes lipidiques en les inactivant ou en régénérant la vitamine E (Bindoli et al., 1982 ; Eto et al., 1992). Le contenu en ubiquinol dans la membrane interne est très élevé, il excède largement celui des autres transporteurs (d'où la notion de pool d'ubiquinone). Bien que présent dans l'alimentation, l'ubiquinol est lui aussi biosynthétisé par l'organisme.

Le cytochrome *c* est présent dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il y assure un rôle de *scavenger* en convertissant le superoxyde en oxygène (l'action inverse de la semi-ubiquinone) (Pereverzev, 2003). L'électron capté par le cytochrome *c* nouvellement réduit est transféré à l'oxygène *via* la cytochrome oxydase (complexe IV) pour former de l'eau.

#### 1.6.2.3.3. Autres composés endogènes

Les métallothionéines sont des dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre : la thionéine. Ces protéines régulent les concentrations intracellulaires en métaux (cuivre, zinc, cadmium, mercure) en les séquestrant, prévenant ainsi leur circulation sous leur forme libre pro-oxydante. Induites lors d'intoxications aux métaux notamment, les métallothionéines préviennent donc la mise en place de processus oxydatifs.

Nettement moins connu, l'acide lipoïque est pourtant un coenzyme liposoluble ubiquitaire aux puissantes propriétés antioxydantes (Petersen et al., 2008). Il est à la fois capable de neutraliser diverses entités radicalaires (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, HOCl, ONOO<sup>-</sup>), de chélater les métaux, de régénérer plusieurs types d'antioxydants (vitamines E et C, GSH et ubiquinol), mais aussi de protéger/réparer l'ADN des atteintes oxydatives. Enfin, notons l'acide urique capable d'éliminer un grand nombre d'ERO (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, •OH, HOCl, O<sub>3</sub>, ONOO<sup>-</sup>, ROO•).

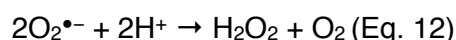
### 1.6.3. Systèmes antioxydants enzymatiques

#### 1.6.3.1. Superoxyde dismutase

Les SOD sont des métalloenzymes dont la structure de base, en forme de puit dans lequel se glisse l'anion superoxyde, s'est fortement conservée au cours de l'évolution (*Zelko et al., 2002*). Il existe plusieurs isoformes de superoxyde dismutase (*Fridovich, 1995*), mais toutes les SOD ont une finalité commune : dismuter l'anion superoxyde (Eq. 12).

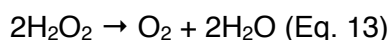
Au cœur du site actif de l'enzyme, siège un métal au rôle catalyseur et dont la nature permet de discriminer spécifiquement les isoformes de l'enzyme. Ces isoformes sont propres à un ou plusieurs compartiments cellulaires ou tissulaires. La cupro-zinc SOD (cCu-ZnSOD ou SOD-1) est présente dans le cytosol et l'espace intermembranaire (*Okado-Matsumoto et Fridovich, 2002*), tandis que la SOD à manganèse (MnSOD ou SOD-2 ; 10 à 15% des SOD totales) siège uniquement dans la matrice mitochondriale. La SOD-1 s'exprime également au niveau de la face externe des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou circule dans le plasma (pCu-ZnSOD). Bien que la SOD-2 soit moins abondante que son homologue SOD-1, elle est davantage inductible (*Shull et al., 1991*).

Il est vital pour la cellule de maintenir une concentration basale de superoxyde la plus basse possible par les SOD car, comme nous l'avons vu précédemment, le superoxyde réduit les métaux et aboutit à la formation d'hydroxyle (lorsqu'il réagit avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou de peroxyde d'azote (en réagissant spontanément avec du NO•). Une partie des superoxydes peut échapper à la SOD-2, mais il sera séquentiellement inactivé par des entités extramitochondriales (SOD-1, catalase peroxysomale, GPx) (*Nohl et Hegner, 1978*).



#### 1.6.3.2. Catalase

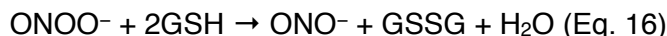
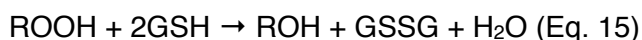
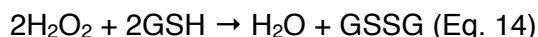
La catalase est une enzyme ubiquiste majeure dans la réduction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène (Eq. 13) (*Putnam et al., 2000*). Avec le fer comme cofacteur, la catalase est essentiellement présente dans les peroxysomes hépatiques, mais aussi dans les hématies et les mitochondries de cellules cardiaques.



#### 1.6.3.3. Glutathion peroxydase

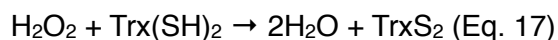
Les peroxydases, à l'instar de la GPx, sont des enzymes capables de neutraliser l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sous forme d'eau (Eq 14). Elles assurent, en outre, la dégradation des hydroperoxydes comme l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou les hydroperoxydes organiques (ROOH), dérivés des composés lipidiques (oxydation des acides gras et du cholestérol) (Eq 15), et du très nocif peroxyde d'azote (Eq 16), ce qui leur confère une place de choix dans la ligne de défense antioxydante. La GPx, principale enzyme à sélénium (*Rotruck et al., 1973*), utilise le GSH à titre de cofacteur. Il en existe plusieurs isoformes (*Ursini et al., 1995*). Elles sont présentes dans le cytosol et la matrice mitochondriale (GPx-1), ou uniquement dans le cytosol (GPx-2), avec toutefois moins d'affinité pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez cette dernière, la seule dépourvue de sélénium (*Mullenbach et al., 1988*). D'autres isoformes peuvent être extracellulaires (GPx-3), ou spécifiques de la membrane cellulaire (GPx-4) (*Takahashi et al., 1987*). La GPx-4 est

impliquée spécifiquement dans la réduction des peroxydes lipidiques (*Ursini et al., 1999*). Il existe aussi une isoforme spécifique des cellules digestives (GIGPx).



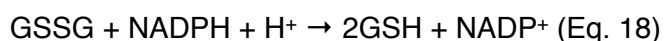
#### 1.6.3.4. Peroxyredoxine

Les peroxyredoxines (Prx) constituent une autre famille de peroxydases constituée de six membres, dont cinq (Prx I-V) possèdent deux sites catalytiques à base de cystéines (*Rhee, 2005*). Non-séléniques, ces peroxydases réduisent un grand nombre de molécules comme l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et utilisent la thioredoxine (Trx) comme réducteur (Eq 17) (Fig. I10). Ces enzymes réduisent également les petites alkyl hydroperoxydes, le peroxydite et les hydroperoxydes dérivés de phospholipides ou d'acides gras. Leurs rôles physiologiques incluent à la fois des fonctions dans la lutte antioxydante et dans la signalisation intracellulaire.



#### 1.6.3.5. Glutathion réductase

La capacité à régénérer le GSH est cruciale dans le processus de défense antioxydante, elle permet de prévenir une déplétion trop importante en composés thiols dans la cellule (*Heffner et Repine, 1989*). La GSH-R est dotée de cette fonction, elle catalyse la réduction de la forme oxydée/disulfure du glutathion (GSSG) (Eq. 18). Après avoir été converti en GSSG, le GSH est recyclé en retour par la GSH-R en 2GSH, aux dépens du NADPH.



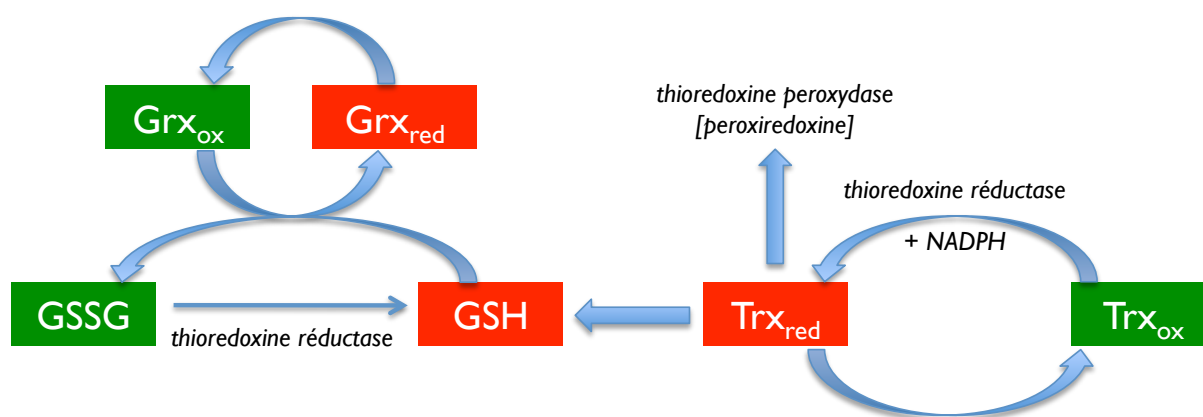
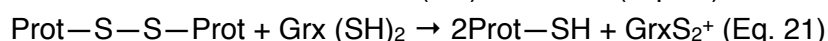
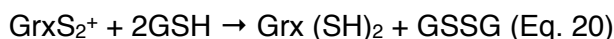
#### 1.6.3.6. Thioredoxine

Le système thioredoxine comprend la Trx, la Trx réductase (Trx-R) et le NADPH (Fig. I10) (pour revue : *Watson, 2004*). Les Trx sont des dithiols $[(\text{SH})_2]$ -disulfides oxydoréductases catalysant la réduction des disulfures en leurs formes sulfhydryles correspondantes (Eq 19). La Trx-R est une sélénoenzyme ubiquiste participant au maintien de l'état réduit de la Trx et des autres protéines disulfures. Les Trx interviennent dans bon nombre de phénomènes cellulaires comme la prolifération, l'échange thiol-dithiol entre les résidus cystéine de certains facteurs de transcription clés. La Trx-1 est spécifique du noyau et du cytosol, alors que la Trx-2 est présente dans la mitochondrie. En faible concentration dans la cellule, comparativement aux autres antioxydants, la Trx exerce probablement ses effets en intervenant comme molécule de signalisation (plutôt que comme agent de détoxification), notamment dans des modulations transcriptionnelles. Les Trx de mammifères sont fonctionnellement associées à la GSH-R, et des interactions Trx-GSH ont récemment été décrites, comme la formation de ponts disulfures entre les deux molécules (*Casagrande et al., 2000*), mécanisme probablement pivot dans la signalisation cellulaire au cours du stress oxydant (*Cummings, 2004*).



#### 1.6.3.7. Glutaredoxine

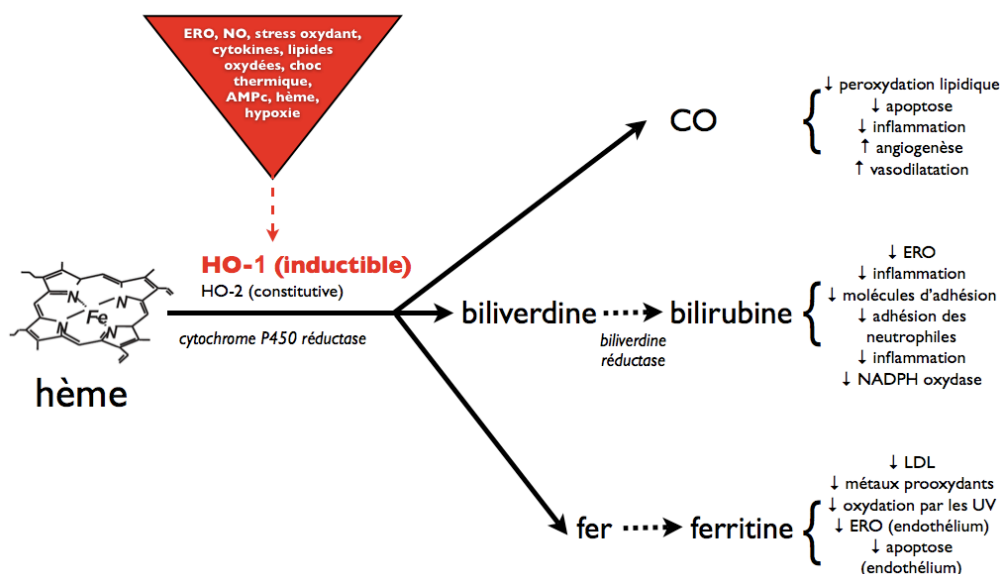
Les glutaredoxines (Grx) sont aussi des dithiols[(SH)<sub>2</sub>]-disulfides oxydoréductases dont les fonctions catalytiques requièrent la présence de GSH (Fig. I10). Elles catalysent la réduction des protéines disulfures en leurs formes sulfhydryles respectives (Eq. 20). La forme oxydée de la Grx est alors re-réduite grâce aux équivalents réduits du GSH (Eq 21). La Grx-1 est spécifique du noyau et du cytosol, alors que la Grx-2 est présente dans la mitochondrie.



**Fig. I10. Interaction entre les systèmes des thioredoxines, des glutaredoxines et du glutathion.** Les thioredoxines (Trx) représentent des régulateurs redox majeurs dans la cellule, pas seulement grâce à leurs propriétés peroxydases (peroxyredoxines), mais aussi en raison du réseau antioxydant qu'elles entretiennent avec le glutathion et les glutaredoxines (Grx). En effet, les thioredoxines favorisent l'état réduit du glutathion (GSH), qui lui-même participe à l'état réduit des glutaredoxines. Grx<sub>ox</sub>, glutaredoxine oxydée, Grx<sub>red</sub>, glutaredoxine réduite ; GSSG, glutathion oxydé ; Trx<sub>ox</sub>, thioredoxine oxydée ; Trx<sub>red</sub>, thioredoxine réduite.

#### 1.6.3.8. Hème oxygénase

Protéines redox de petits poids moléculaires, les hèmes oxygénases (HO) sont des membres de la famille des protéines de stress heat shock (HSP, HO-1 est d'ailleurs anciennement appelée heat shock protein 32) (Ryter, 2006 ; Abraham, 2008). Trois isoformes d'HO ont été caractérisées (HO-1, -2, et -3), seule l'isoforme 1 est inductible, les isoformes 2 et 3 étant constitutives. L'HO-1 est fortement activée dans la rate et les autres tissus qui dégradent les globules rouges sénescents. Les HO catalysent la dégradation de la molécule d'hème, potentiellement oxydante, en biliverdine, dans une réaction générant du fer et du monoxyde de carbone (CO) (Fig. I11). La biliverdine est alors réduite en bilirubine aux propriétés antioxydantes en tant que *scavenger* d'ERO. Le CO est quand à lui un vasodilatateur dont les propriétés anti-inflammatoires ont été rapportées récemment.



**Fig. I11. Rôles anti-stress des hèmes oxygénases (HO-1).** Les HO dégradent l'hème en quantité équimolaires de monoxyde de carbone (CO), de biliverdine et de fer. La HO-1 est inducible (par des agents pro-oxydants), tandis que la HO-2 est constitutive. La biliverdine est convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. Le fer est instantanément séquestré par la ferritine. Le CO et la bilirubine sont des molécules bioactives anti-stress, alors que la production de fer joue un rôle protecteur indirect via l'augmentation de la ferritine. AMPc, AMP cyclique ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; NO, monoxyde d'azote.

Cytoprotectrices (Ferris *et al.*, 1999), les HO jouent donc un rôle protecteur contre une grande variété de stress impliquant le stress oxydant induit par les ERO, les modulateurs des niveaux de glutathion intracellulaire (Keyse *et Tyrrell*, 1989 ; Applegate *et al.*, 1991 ; Lautier *et al.*, 1992), les lipoprotéines oxydées (Ishikawa *et al.*, 1997), l'inflammation (Willis *et al.*, 1996) et les cytokines (Hibbs *et al.*, 1992 ; Terry *et al.*, 1998), l'hypoxie (Minamino *et al.*, 2001), le NO, les métaux lourds, et les UV (Ryter, 2006 ; Abraham, 2008), ainsi que l'hyperglycémie (Jonas *et al.*, 2003). Ce large éventail de modulateurs suggère une régulation fine des niveaux d'HO-1 dans la cellule, et reflète la multitude de facteurs de transcription sensibles aux séquences promotrices du gène (Hmox1) (cf. section 1.7.5. et Fig. I14).

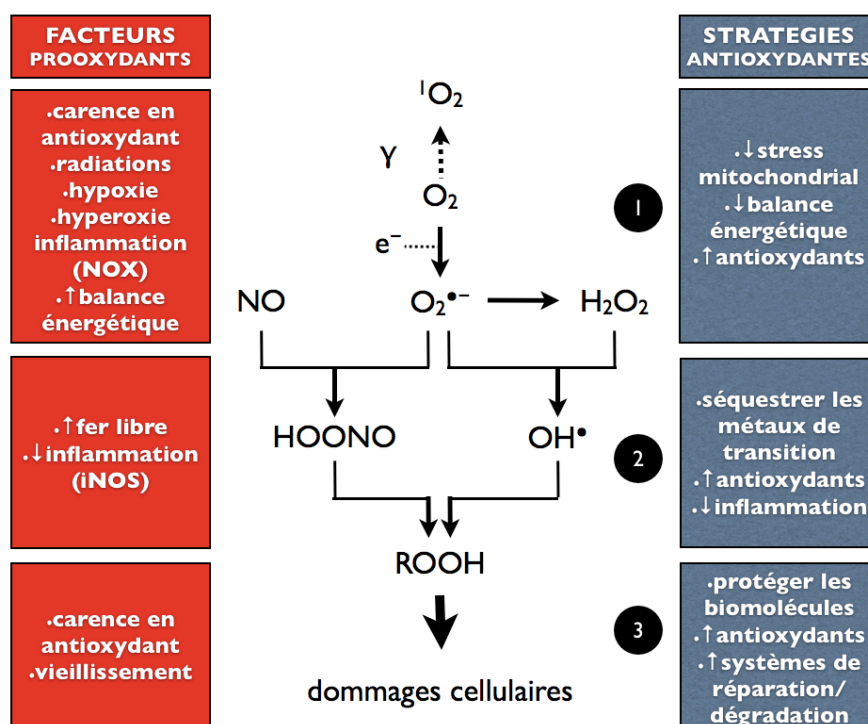
#### 1.6.3.9. Cofacteurs réduits

Au travers des systèmes antioxydants décrits ci-dessus (recyclage du GSH et des Trx), nous avons vu que l'équivalent réducteur NADPH occupe une place de choix comme cofacteur des réactions ; il constitue donc un substrat enzymatique extrêmement important dans la lutte antioxydante (Leverve, 2003). Le niveau de NADPH est maintenu par la coopération de quatre systèmes enzymatiques, dont deux dans la matrice mitochondriale : l'isocitrate déshydrogénase NAD<sup>+</sup>-dépendante et une pyridine nucléotide transhydrogénase ; et trois dans le cytosol : l'enzyme malique, l'isocitrate déshydrogénase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase.



## 1.6.4. Bilan sur les stratégies de défense antioxydante (voir aussi Fig. I12)

En quantité importante, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  inhibe l'activité des SOD, alors que le superoxyde inhibe celle des GPx. Il est donc vital pour la cellule de modérer ces effets inhibiteurs. Par un mécanisme de feedback, la GPx et la catalase vont assurer le maintien de l'activité des SOD en éliminant  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; en retour, les SOD, en réduisant le superoxyde, entretiennent la catalase et la GPx (Ceballos et al., 1988). On peut également illustrer la synergie de protection antioxydante par le poids relatif des SOD dans la balance antioxydante cellulaire globale. En effet, lorsqu'elles fonctionnent seules — le flux de superoxyde ne dérivant pas vers la formation d'eau (sans l'action des catalases et GPx) —, ces enzymes antioxydantes peuvent se montrer paradoxalement cytotoxiques (Richard et al., 1992). Un moyen fréquent d'exprimer le potentiel défensif d'une cellule comme la cytotoxicité des SOD revient aussi à mesurer le ratio SOD/GPx ou SOD/catalase intracellulaire. Le maintien de l'intégrité et de la fonction cellulaire passe donc aussi par l'équilibre de ces balances (Galinier et al., 2006).



**Fig. I12. Stratégies antioxydantes.** Situées à toutes les étapes des processus préventifs et curatifs du stress oxydant, les antioxydants occupent une place centrale en terme de stratégie. Mais pour être complètes, les stratégies antioxydantes doivent favoriser les mécanismes capables d'agir sur les facteurs pro-oxydants. Il s'agira d'inhiber directement une production anormale d'ERO, de limiter leur propagation ou de les détruire. Pour ce faire, il conviendra à la fois de prémunir l'activation des cellules et des réactions faisant intervenir l'oxygène (hypoxie, inflammation, radiations ( $\gamma$ )) donnant lieu à la formation de superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (1), et de prévenir leur évolution en espèces plus dangereuses ou de les détruire (2) avant qu'elles ne causent des dommages trop sévères sur les biomolécules (3). En dernier recours, sont sollicités les mécanismes de réparation et de dégradation. ERO, espèces réactives de l'oxygène ; HOONO, peroxydinitrite ;  $\text{OH}^\bullet$ , anion hydroxyle ; ROOH, peroxyde.

## 1.7. ERO et signalisation cellulaire

### 1.7.1. Une notion émergente

L'étude des fonctions signalétiques associées au stress oxydant, et aux ERO en particulier, est récente (*Hensley et al., 2000*). En tant que sous-produits de l'existence aérobie, les ERO ont longtemps été considérées comme des entités nocives, bien qu'inévitables, suggérant l'idée selon laquelle plus leur élimination est rapide, meilleure se porte la cellule. Cependant, et comme mis en évidence récemment (Redox Signalling in Human Disease and Ageing, Catholic University, Rome, Italy, 2006 (EMBO Conference Series 2006)), les ERO représentent des actrices importantes dans certaines réponses physiologiques en fournissant des signaux au noyau de la cellule (*Hansen et al., 2006*). Transductions de signaux, différenciation/migration cellulaire, régulation des gènes sous l'influence des cytokines, de facteurs de croissance ou d'hormones, transport ionique, et apoptose sont autant de fonctions impliquant un rôle des ERO (*Sundaresan et al., 1995 ; Lander, 2005*).

Cette conception rénovée du rôle des ERO vient d'une meilleure compréhension des liens entre les mécanismes redox (oxydation-réduction) et la signalisation cellulaire. La signalisation redox prend alors tout son sens, tant dans les phénomènes relevant de la physiologie que de la pathologie, incluant le stress oxydant. Les effets des ERO sur la transduction du signal sont d'ailleurs aujourd'hui largement admis dans les domaines de la nutrition, du diabète ou de l'immunologie (*Dröge, 2002*). Et l'un des enjeux de la recherche, actuellement, s'attarde sur les façons dont la cellule canalise ces espèces, l' $H_2O_2$  notamment, dans des voies de signalisation bien précises et selon un schéma spatio-temporel bien établi.

Par ailleurs, le rôle des ERO, comme seconds messagers, pose naturellement la question des effets antagonistes alloués aux antioxydants. Dans les conditions physiologiques, un pré-requis à la signalisation est le déséquilibre transitoire de la balance pro-/anti-oxydants, induit par une concentration minimale et nécessaire d'ERO. Bien que des mécanismes aient été prévus pour protéger cette signalisation dans le cytosol, *via* notamment l'inactivation des Prx par oxydation de leur résidu cystéine (*Rhee et al., 2005*), l'atteinte du seuil d'activation par les ERO risque d'être difficile en présence d'une réponse antioxydante excessive, qu'elle soit induite par l'environnement (suppléments nutritionnels) ou liée à des anomalies génétiques.

### 1.7.2. ERO et signalisation en physiologie et physiopathologie

Le rôle de second messenger des ERO s'exprime en particulier à travers leur faculté à moduler de manière réversible l'activité de protéines de signalisation clés. Parmi les protéines régulées, citons les médiateurs et facteurs transcriptionnels régulés par le statut redox (p53, AP-1, JNK, Fos, NRF-2, NF- $\kappa$ B, etc.), dont certains sont transloqués du cytoplasme au noyau en réponse au stress oxydant. Par exemple, NF- $\kappa$ B se déplace du cytoplasme au noyau après phosphorylation en tyrosine de sa sous-unité p65 et d'I $\kappa$ B $\alpha$  (*Takada et al., 2003*). De même, les Trx, protéines régulatrices de l'activité d'NF- $\kappa$ B, sont transloquées au noyau en réponse au stress oxydant (*Watson et al., 2004*).

Une modulation de l'activité d'une enzyme ou d'un facteur de transcription par les ERO est rendue possible par la configuration redox requise pour leur activité maximale. Un contexte de stress oxydant perturbera l'activité d'une protéine dont l'activité maximale existe

lorsqu'elle est dans son état le plus réduit. Ce mécanisme opère notamment grâce à la présence de cystéines. Acide  $\alpha$ -aminé largement répandu dans les protéines organiques, comme les tyrosines phosphatases (Tonks, 2005 ; Kamata, 2005), la cystéine est une cible extrêmement importante du stress oxydant car elle possède un groupement SH. Son oxydation survient lors d'une modification du potentiel redox. Cette oxydation est réversible et la cystéine peut être régénérée à partir de GSH ou de Trx réduite (Fig. I10). Des apports cystéiques, notamment sous forme de *N*-acetyl-L-cystéine (NAC), un antioxydant reconnu, ont aussi montré leur efficacité (Haber et al., 2003). Comme nous le verrons un peu plus loin, les conséquences du stress oxydant se déploient, par le jeu de différents processus de signalisation cellulaire, sur tout un *continuum* allant de la simple réaction de défense antioxydante (*via* des ajustements respiratoires et/ou transcriptionnels), à la mort cellulaire en passant par la réponse inflammatoire (Fig. I13).

### 1.7.3. ERO et *sensing* métabolique

Les ERO mitochondriales constituent un système de signalisation vital entre la mitochondrie et le noyau de la cellule (Hansen et al., 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, les ERO sont essentiellement produites par la mitochondrie et leurs niveaux varient en fonction des contraintes en substrats ( $O_2$  et équivalents réduits) fournis à la chaîne respiratoire. Naturellement, les niveaux de production d'ERO informeront la cellule sur ces paramètres, de même que sur les niveaux en ATP, et par conséquent sur les orientations que devra prendre la cellule en terme de métabolisme ou de survie.

Les relations entre la signalisation des ERO et le métabolisme oxydatif du glucose s'avèrent donc très étroites. Le métabolisme du pyruvate active la c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) selon un mécanisme dépendant des radicaux mitochondriaux, avec pour conséquence : une inhibition de l'oxydation des substrats en faveur du stockage sous forme de glycogène (Nemoto et al., 2000). Il est probable qu'un excès de substrat (glucose, acides gras) donné à la chaîne respiratoire induise une augmentation des ERO vers le cytosol, activant ainsi les voies de stockage à ce niveau.

Les ERO constitueraient ainsi des médiateurs importants dans l'orientation des flux métaboliques, notamment lors d'une forte pression métabolique en substrats fournis à la chaîne respiratoire. Ceci permettrait de diminuer la pression exercée sur la mitochondrie (et *a fortiori* la production d'ERO), tout en entretenant l'homéostasie énergétique, par une régulation fine de la balance entre stockage et oxydation. Composantes moléculaires essentielles du *sensing* métabolique, les ERO mitochondriales serviraient ainsi de relais intracellulaire entre la mitochondrie et le cytosol. Enfin, le rôle des ERO dans les adaptations métaboliques à des changements environnementaux peut aussi s'expliquer par leur effets sur le taux de mutation mitochondriale (Wallace, 2007). Par cette voie, les ERO induisent la mise en place de nouvelles solutions énergétiques *de novo* à chaque génération mitochondriale.

### 1.7.4. ERO et adaptation respiratoire

En modulant directement le potentiel de membrane mitochondrial et/ou la respiration, les protéines découplantes et la cytochrome oxydase vont nécessairement influencer la production d'ERO. Le but de ces adaptations vise à abaisser la concentration en oxygène et/ou le potentiel de membrane afin de se prémunir des dommages oxydatifs. Les 3 formes

d'UCP présentent une forte affinité aux nucléotides en présence d'ubiquinone (*Echtay et al., 2000 ; Echtay et al., 2001*), et l'interaction ubiquinone et UCP permettrait d'ajuster finement le pool de quinones aux besoins métaboliques. De ce point de vue, les UCP moduleraient le *sensing* métabolique et les événements biologiques associés (*Nishikawa et al., 2000 ; Yamagishi et al., 2001a ; Negre-Salvayre et al., 2002*). De même, le double effet des UCP, à savoir augmentation de la consommation d'oxygène et l'abaissement du potentiel de membrane, influence négativement la production de superoxyde.

Bien que le rôle découplant d'UCP2 soit encore controversé et mérite d'être approfondie, l'augmentation de l'expression d'UCP2 après un stress oxydant (*Lee et al., 1999 ; Pecqueur et al., 2001 ; Krauss et al., 2005*) pourrait exprimer indirectement la mise en jeu d'un système de prévention contre les ERO. En faveur de cette hypothèse, l'absence d'UCP2 dans les macrophages activés est associée à une augmentation de leur production d'ERO (*Arsenijevic et al., 2000*). Néanmoins, des modulations indirectes sur la production d'ERO *via* des modifications du redox ne sont pas non plus à exclure car la production d'ERO dérive essentiellement de l'activité NOX dans ce type cellulaire (*Babior, 1999*). En ce qui concerne UCP3, la délétion du gène provoque une augmentation du couplage mitochondrial, concomitamment à une augmentation de l'activité aconitase, index qui pourrait refléter une moindre production d'ERO (*Vidal-Puig et al., 2000*). Outre son activation par les acides gras (*Echtay et al., 2002*), UCP3 dans le muscle pourrait également être induite par un mécanisme dépendant de la présence de superoxyde (*Talbot et al., 2004 ; Talbot et Brand, 2005*).

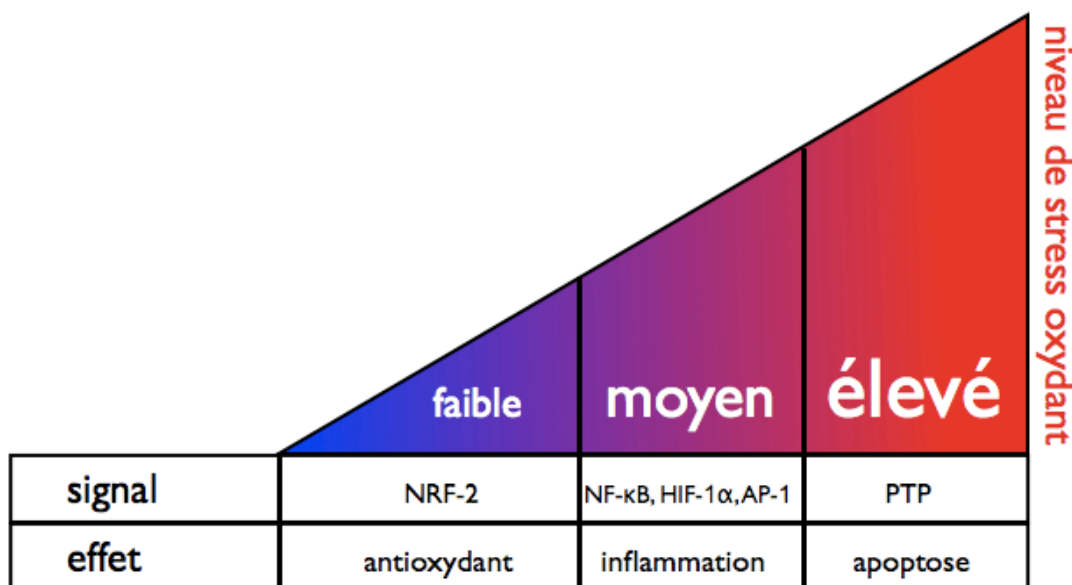
Au niveau de la chaîne respiratoire, il y a une compétition entre la formation d'eau et de superoxyde. Ainsi, l'extrême affinité de la cytochrome oxydase pour l'oxygène définit sa forte capacité à limiter la formation de superoxyde. L'activité respiratoire de la chaîne constitue donc un rempart contre la production d'ERO, en diminuant la pression en oxygène intracellulaire. De ce point de vue, la signification biologique de la cytochrome oxydase, notamment dans des conditions où le potentiel de membrane est élevé, pourrait s'assimiler à un rôle d'antioxydant (*Capitanio et al., 1996 ; Korshunov et al., 1997*). Les processus d'adaptation à des conditions physiologiques ou pathologiques telles que l'hyperthyroïdie, la carence en acides gras polyinsaturés et l'alcoolisation (*Piquet et al., 1996 ; Piquet et al., 2000*), entraînent des modulations du rendement de la phosphorylation oxydative (matérialisé par le ratio ATP/O) parallèlement à des changements dans la proportion en cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire (*Nogueira et al., 2001*).

#### 1.7.5. L'induction des gènes de défenses contre le stress oxydant

La production d'ERO exerce aussi un rôle de signal en induisant, à un niveau transcriptionnel, la réponse cellulaire au stress oxydant afin d'organiser, en réaction, un système de défense endogène et cohérent. Il s'agit là d'un premier niveau de réponse mis en scène par le jeu de facteurs redox-sensibles (Fig. I13). Un stress moyen induit par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Pi et al., 2003*), notamment, est susceptible d'induire NRF-2. Ce facteur transcriptionnel est capable d'interagir avec un élément de réponse antioxydant (ARE) sur les régions promotrices de gènes de défenses antioxydantes et de détoxification (*Wasserman et Fahl, 1997*). L'activité de NRF-2 induit la transactivation de gènes codant notamment pour les enzymes de la biosynthèse du glutathion (GCLC, GSH-R et glutathion S-transférase) et du NADPH, des Trx, Trx-R et Prx, de même que HO-1 (*Alam et al., 1999 ; Kwak et al., 2003*).

(Fig. I14). Cette cascade transcriptionnelle va permettre d'établir une forme de pré-conditionnement cellulaire au stress oxydant. Avec l'adaptation aux ERO, ces mécanismes transcriptionnels adaptatifs confèrent aux organismes vivants une résistance significative à des niveaux de stress oxydant important, voire létaux pour la cellule, secondairement à des stimuli plus légers (Halliwell, 1994). Le ratio GSSG/2GSH constituant la principale balance redox de la cellule, les déséquilibres à son niveau, occasionnés par un stress oxydant ou par une déplétion en glutathion, interviendront nécessairement comme messenger primaire dans l'activation de facteurs sensibles au redox comme NRF-2 (d'où le contrôle par ce dernier des gènes régulant la biosynthèse du glutathion) (Li et al., 1997). D'autres gènes codant pour des enzymes antioxydantes comme la GPx, catalase et les SOD sont également induites en réponse au stress oxydant (Shull et al., 1991).

On retrouve également ce mécanisme adaptatif en réponse à l'hyperoxie (Clerch et al., 1993), qui résulterait également de l'activation de NRF-2 (Cho et al., 2002) ou de NF-κB (Tahepold et al., 2003) pour contrer la mort cellulaire (Barazzone et al., 1998). Par exemple, chez la drosophile, alors qu'une exposition prolongée à l'oxygène pure diminue dramatiquement l'espérance de vie, de courtes expositions par intermittence l'augmente significativement (Sohal et al., 1993).

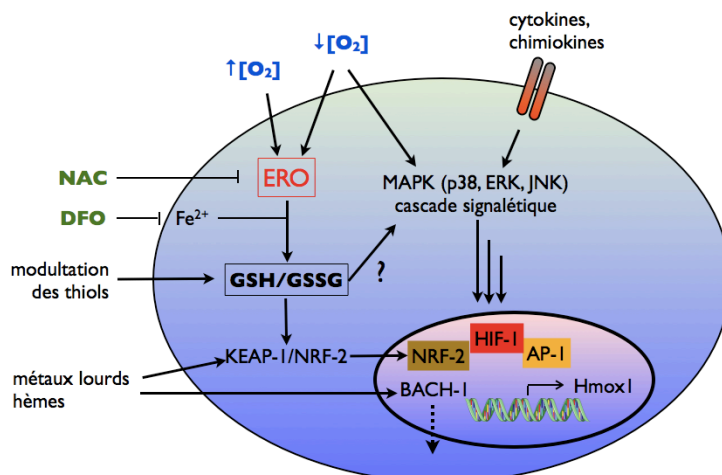


**Fig. I13. Modèle hiérarchique de signalisation induite par le stress oxydant.** De faibles quantités d'espèces réactives de l'oxygène induisent le facteur de transcription NRF-2, impliqué dans la transactivation de gènes antioxydants. Des niveaux moyens d'ERO engendrent quand à eux une réponse inflammatoire et/ou hypoxique via l'activation d'autres facteurs : NF-κB, AP-1 et HIF-1α. Des niveaux importants de stress oxydant perturbent le pore de transition de perméabilité (PTP) et provoquent la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. AP-1, activator protein-1 ; HIF-1α, hypoxia-inducing factor-1α ; NF-κB, nuclear factor-κB ; NRF-2, NF-E2 related factor-2.

## 1.7.6. Adaptation à l'hypoxie

Les conséquences de l'hypoxie peuvent être dramatiques puisqu'elle conduit *in fine* à l'apoptose. Il est donc dans l'intérêt de la cellule de développer des stratégies adaptatives pour se prémunir des effets toxiques de l'hypoxie, et les ERO jouent un rôle fondamental en ce sens. En effet, de très faibles pressions en oxygène augmentent la production d'ERO dans les mitochondries fonctionnelles (Chandel *et al.*, 2001) et les ERO agissent aussi comme médiateurs du préconditionnement cellulaire dans la cellule cardiaque, en réponse à l'hypoxie (Vanden Hoek *et al.*, 1998).

L'un des mécanismes suggérés repose sur l'activation, par les ERO, de facteurs hypoxiques comme HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Chandel *et al.*, 2001) et AP-1 qui régulent l'expression de groupes de gènes impliqués dans l'adaptation au stress hypoxique et au stress oxydant (Meyer *et al.*, 1993). En présence d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  est naturellement dégradé (Semenza, 2002), alors que sa stabilisation en condition d'hypoxie requiert la formation de radicaux issus de chaînes respiratoires fonctionnelles (Schroedl *et al.*, 2003). Ces phénomènes adaptatifs illustrent magnifiquement comme les systèmes antioxydants sont ajustés en permanence selon les signaux de stress, signaux relayés par les ERO (Sharma *et al.*, 2006).



**Fig. I14. Exemple de modulations transcriptionnelles du gène de la hème oxygénase-1 (Hmox1) en réponse au stress oxydant (d'après Ryter, 2006).** L'augmentation des ERO intracellulaires entraîne le déséquilibre des thiols intracellulaires, conduisant à la réduction du ratio glutathion réduit (GSH)/glutathion oxydé (GSSG) et à l'activation de KEAP-1/NRF-2. L'activation de Hmox1 est également conditionnée par la transduction des signaux initiés par les cytokines et les facteurs de croissance, éventuellement relayés par la voie des MAPK. Le contenu en hèmes et en métaux lourds déclenche la translocation de NRF-2 et l'exclusion du répresseur transcriptionnel BACH-1 dans le noyau. D'autres facteurs nucléaires comme le facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1) et AP-1 (hypoxie) peuvent entrer en jeu. Les antioxydants (N-acetyl-L-cystéine, NAC) et chélateurs de métaux (desferrioxamine, DFO) freinent l'activation d'Hmox1 parallèlement à leurs effets contre le stress oxydant. AP-1, activator protein-1 ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé ; Hmox1, hème oxygénase-1 ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; NRF-2, NF-E2 related factor-2 ; [O<sub>2</sub>], pression partielle en oxygène.

### 1.7.7. ERO et signalisation inflammatoire

Les ERO et/ou leurs sous-produits de réaction constituent des médiateurs des atteintes inflammatoires, et les thérapies antioxydantes préviennent *in vivo* des dommages tissulaires au cours d'épisodes inflammatoires (*Cuzzocrea et al., 2004*). Cependant, le lien entre stress oxydant et inflammation est double car d'une part, le stress oxydant induit des facteurs pro-inflammatoires et, d'autre part, les facteurs pro-inflammatoires engendrent la production d'ERO en retour. C'est ce deuxième point qui nous intéressera particulièrement dans cette section.

NF- $\kappa$ B, un facteur redox-sensible des plus cruciaux, répond directement au stress oxydant. Depuis bientôt 20 ans, on sait que les ERO activent ce facteur (*Schreck et al., 1991*) par la voie classique dépendante de I $\kappa$ B kinase (IKK) (*Gloire, 2006*). NF- $\kappa$ B constitue un homo ou un hétérodimère regroupant cinq protéines (p50, p52, p65/RelA, c-Rel et RelB). Associé aux protéines I $\kappa$ B, il est séquestré dans le cytoplasme. Lors d'une stimulation, I $\kappa$ B est rapidement phosphorylée et dégradée par le protéasome, tandis que NF- $\kappa$ B, se retrouvant ainsi sous sa forme libre, transloque dans le noyau et y régule divers transcrits de gènes cibles codant pour des cytokines, des chimiokines, des molécules de l'adhésion et des facteurs pro-/anti-apoptotiques. L'activation de NF- $\kappa$ B et les phénomènes inflammatoires et immunitaires qui en découlent résultent généralement d'un stress oxydant intermédiaire (Fig. I13). L'activation classique *via* IKK de NF- $\kappa$ B est initiée par les ERO, ainsi que différents médiateurs de l'immunité comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) (*Devin et al., 2000 ; Martin et al., 2002*) et l'activation des toll-like récepteurs (TLR) (*O'Neill, 2006*) notamment. Tous ces activateurs convergent vers l'activation d'un même complexe, I $\kappa$ B-kinase (IKK) incluant NEMO, et les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ . Une fois activée par phosphorylation, IKK phosphoryle en retour I $\kappa$ B $\alpha$  qui est dégradée par le protéasome. L'activation de NF- $\kappa$ B par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est hautement spécifique de la cellule et implique différents mécanismes (*Li et Karin, 1999*). Des données récentes ont également mis en évidence un rôle médiateur des ERO dans l'activation de NF- $\kappa$ B par les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (pour revue : *Gloire, 2006*).

### 1.7.8. ERO et induction de l'apoptose

Autre fonction physiologique d'importance assurée par les ERO, la régulation des fonctions cellulaires létales. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme utilisé par les êtres vivants destiné à éliminer les cellules endommagées ou redondantes (*Kroemer et al., 1998*). Elle se traduit essentiellement par une réduction de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, un clivage des chromosomes, une rupture de la membrane plasmique et une transformation des organites cellulaires en vésicules appelées corps apoptotiques. Il existe deux modes d'induction de l'apoptose. L'une, dite "extrinsèque", est programmée par les récepteurs membranaires au TNF- $\alpha$  (TNF-R1, TRAIL) et au Fas ligand (CD95/Fas). L'autre, "dite intrinsèque" (également appelée "voie mitochondriale") résulte d'un déséquilibre de l'homéostasie intracellulaire plus ou moins directement lié aux ERO (stress oxydant, dommages de l'ADN, stress du réticulum endoplasmique, hypoxie, déprivation nutritionnelle) (Fig. I15). Ces deux voies induisent *in fine* l'activation des caspases activatrices (caspase-8 — aussi appelée "FLICE" — et caspase-9 pour les voies intrinsèques et extrinsèques, respectivement) qui à leur tour clivent les caspases effectrices (caspases-3, -6, -7) pour mener à l'apoptose.

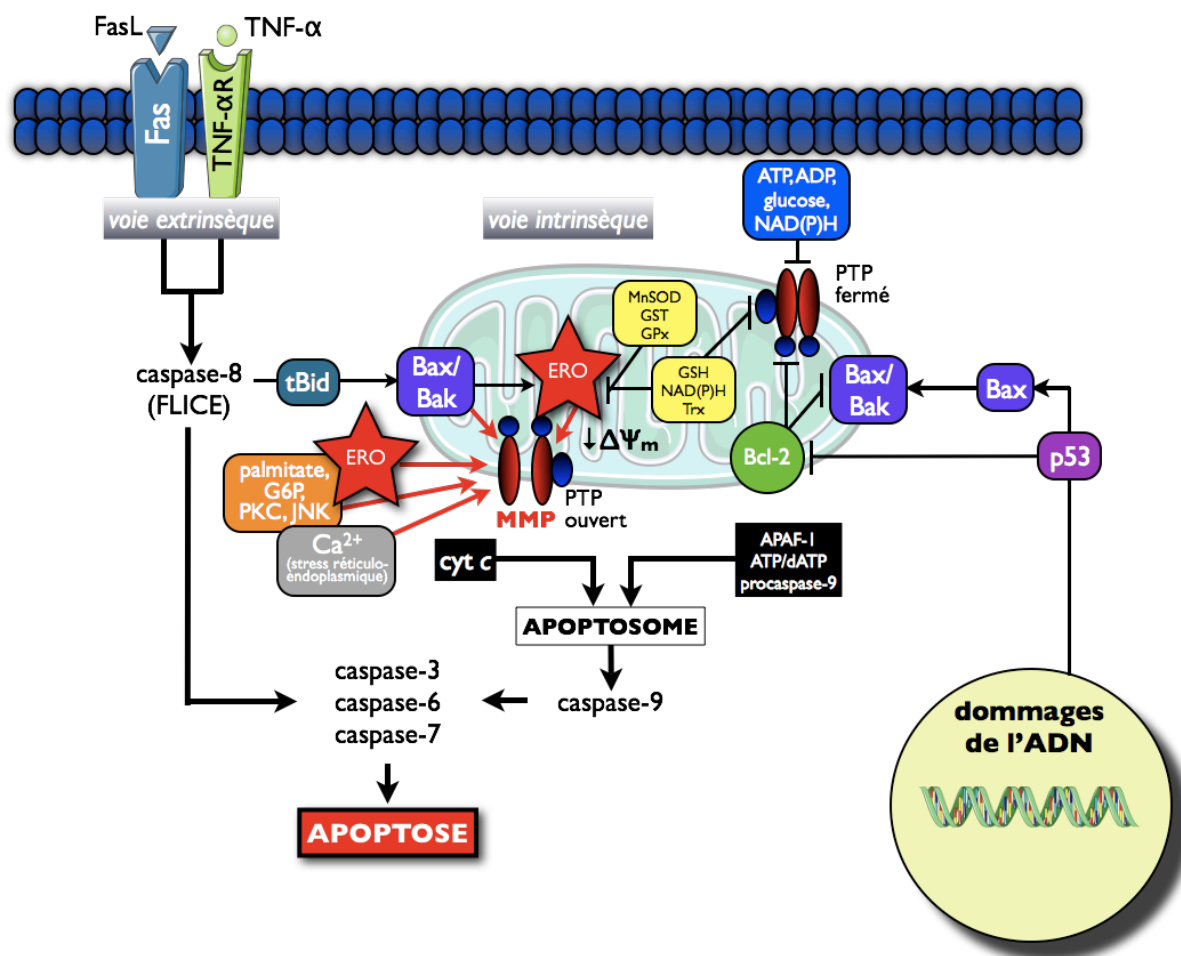
Quelle que soit la voie de mort choisie par la cellule, la perméabilisation membranaire mitochondriale (MMP) constitue généralement l'événement décisif délimitant la frontière entre la vie et la mort cellulaire (pour revue : *Kroemer, 2007*). L'inhibition spécifique de la MMP prévient d'ailleurs l'apoptose (*Irwin et al., 2003*). Divers acteurs influent sur la propension à la MMP. Ces acteurs incluent les molécules pro- (Bim, Bid, Bad, Bax, et Bak) et anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-XL) issues de la famille Bcl-2, les diverses composantes protéiques du complexe formant le pore de transition de perméabilité (PTP), et d'autres partenaires interagissant avec la structure mitochondriale. De plus, la caspase-8 peut activer Bid, un promoteur de la MMP, qui illustre le lien entre les voies intrinsèques et extrinsèques menant à l'apoptose.

Alors qu'une ouverture transitoire du PTP joue un rôle dans le métabolisme (notamment lors d'une demande en ATP forte *via* une libération de calcium) (*Bernardi et Petronilli, 1996*), une ouverture prolongée du PTP conduit à la MMP. La MMP s'associe à l'effondrement du  $\Delta\Psi_m$  et du potentiel phosphate, ainsi qu'à la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytoplasme (*Petronilli et al., 2001*). Ce mécanisme a été décrit il y a une dizaine d'années et procède d'une translocation du cytochrome *c*, de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme de la cellule (*Liu et al., 1996*), où il se complexe avec un autre facteur, APAF-1, pour former l'apoptosome en présence d'ATP. L'apoptosome active alors la voie des caspases. Cette cascade protéolytique active les DNases pour mener *in fine* à la mort cellulaire (*Li et al., 1997*). Dans les conditions normales, des facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, accolés à la membrane (Bcl-2, Bcl-xL), préviennent la création de macropores et la MMP, ce qui permet au cytochrome *c* de s'échapper vers le cytosol *via* le PTP. Cette action protectrice est néanmoins abolie par la présence de Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 qui, une fois transloqué vers la mitochondrie, initie la cascade apoptotique (*Finucane et al., 1999*).

Les ERO mitochondriales constituent des messagers intracellulaires clés par leur action sur la MMP. L'implication du superoxyde dans l'ouverture du PTP est démontrée par la résistance mitochondriale à ce phénomène lorsque le gène *Sod2* est invalidé (*Silva et al., 2005*). Ce phénomène survient aussi lors de stress oxydant engendré par oxydation du glutathion intracellulaire (*Chernyak, 1997*).

Les ERO constituent aussi des messagers avals de la MMP. En effet, le déclenchement de la mort cellulaire entraîne, en retour, la production mitochondriale de radicaux du fait de la perte graduelle de cytochrome *c*, *scavenger* de superoxyde, ce qui entraîne un ralentissement du flux d'électrons entre les complexes III et IV (*Cai et Jones, 1998*). L'un des mécanismes suggérés pour pallier une augmentation trop importante d'ERO, après le phénomène de MMP, repose sur une inhibition du complexe I (*Leverve, 2001*), connu pour réguler le PTP (*Fontaine et al., 1998 ; Chauvin et al., 2001*).





**Fig. I15. Évènements intrinsèques et extrinsèques couplés au phénomène d'apoptose.** Dans la voie intrinsèque (à gauche), l'activation des récepteurs de mort (Fas et TNF- $\alpha$ R), par leurs ligands respectifs (FasL et TNF- $\alpha$ ) active la caspase-8 capable de cliver en retour les caspases effectrices (caspase-3, -6, et -7) et tBid, ce dernier favorisant la perméabilité membranaire mitochondriale (MMP) via l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), et constituant le dénominateur commun entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie intrinsèque (à droite) regroupe divers signaux intracellulaires, provenant notamment des dommages de l'ADN et du stress réticulo-endoplasmique. Ces événements, et d'autres, sont sources de stimuli pro-apoptotiques via certains membres de la famille Bcl-2 (Bax, Bak, tBid), le calcium (Ca<sup>2+</sup>), le palmitate, le glucose-6-phosphate (G6P), des kinases (PKC et JNK), et les ERO. Le facteur p53 contrôle partiellement la réponse aux dommages cellulaires et participe à la MMP en induisant son expression ou en interagissant directement avec lui et d'autres membres de sa famille moléculaire (Bak, Bax, Bcl-2, et Bcl-X<sub>L</sub>). Tous ces signaux convergent vers la mitochondrie pour induire la MMP et la dissipation du potentiel de membrane ( $\Delta\Psi_m$ ), couplée à une production d'ERO supplémentaire, et à la libération de facteurs pro-apoptotiques à partir de l'espace intermembranaire. Parmi ces facteurs, le cytochrome c (cyt c) induit le facteur activateur de protéase (APAF-1) et ATP/dATP pour former l'apoptosome, une plate-forme moléculaire activatrice de la procaspase-9, elle-même inductrice des caspases activatrices en aval conduisant in fine à l'apoptose. La présence d'antioxydants (GPx, GSH, GST, MnSOD, Trx) permet la riposte contre l'offensive des ERO et prévient la MMP. ERO, espèces réactives de l'oxygène ; GPx, glutathion peroxydase ; GSH, glutathion réduit ; GST, glutathion S-transférase ; PKC, protéine kinase C ; JNK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase ; MnSOD, superoxyde dismutase mitochondriale à manganèse ; Trx, thioredoxine.

## 2. Le DT2

### 2.1. Définition

Le DT2 (ou diabète non insulino-dépendant) est une maladie hétérogène qui se traduit par une hyperglycémie chronique résultante d'une interaction dynamique entre des anomalies de la sécrétion et de l'action biologique de l'insuline (*DeFronzo, 1999*). Les patients DT2 présentent donc un syndrome essentiellement bipolaire, associé à terme à de nombreuses complications en raison des effets délétères des niveaux élevés et chroniques de glucose sur l'ensemble des tissus. La pathogenèse du DT2 conjugue des forces d'origine génétiques et environnementales.

Alors que la dysfonction  $\beta$ -cellulaire est rapide dans le DT1 — après la destruction autoimmune de plus de la moitié de la masse  $\beta$ -cellulaire (*Souza et al., 2006*) — cette perte fonctionnelle est graduelle chez les patients DT2. Trois scénarios sont proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier est l'incapacité de la cellule  $\beta$  à s'ajuster fonctionnellement à la demande en insuline, imposée par l'insulino-résistance (*Kahn, 2001*). Le deuxième scénario est assujéti à la dysfonction des cellules  $\beta$  résiduelles ; plusieurs mécanismes sont suggérés : des anomalies du *sensing* au glucose, une déplétion du contenu insulaire en insuline (dégranulation) et/ou une activation continue conduisant *in fine* à la détérioration de la réponse au glucose (*Robertson et al., 1992 ; Ling et Pipeleers, 1996 ; Marshak et al., 1999 ; Weir et Bonner-Weir, 2004*). La troisième scénario est lié à la réduction du nombre de cellules  $\beta$  par apoptose (*Donath et Halban, 2004 ; Donath et al., 2005 ; Rhodes, 2005*), mécanisme pouvant être déterminant dans l'évolution de l'état prédiabétique insulino-résistant à l'état diabétique (*Pick et al., 1998 ; Finegood et al., 2001*).

De vastes études ont permis d'identifier plusieurs *loci* à risque sur des gènes contrôlant le développement ou la fonction  $\beta$ -cellulaire, et soutiennent l'idée selon laquelle la vulnérabilité génétique des cellules  $\beta$  détermine le risque de développer la maladie (*Saxena et al., 2007 ; Scott et al., 2007 ; Sladek et al., 2007 ; Steinthorsdottir et al., 2007 ; Zegini et al., 2007*). En effet, outre les formes simples et monogéniques de DT2 affectant les fonctions sécrétoires des cellules  $\beta$  (*maturity onset diabetes of the young*), un bon moyen d'illustrer le déterminisme génétique dans la physiopathologie du DT2 revient à étudier l'occurrence du DT2 dans les couples de jumeaux monozygotes. Bien qu'il ne soit pas de 100%, le taux de concordance est remarquablement élevé. Lorsqu'il y a discordance entre les deux jumeaux, l'obésité devient un fort prédicteur du DT2, ce qui souligne l'importance des stratégies préventives axées sur l'hygiène de vie (activités physiques, alimentation équilibrée) (*Hu et al., 1999*). De même, fortement corrélée à l'obésité (75% des sujets DT2 sont obèses), l'insulino-résistance s'accompagne normalement d'une augmentation de la prolifération  $\beta$ -cellulaire pour faire face à la demande en insuline (normoglycémie au prix d'une hyperinsulinémie), or ce processus est défectueux chez les sujets génétiquement prédisposés au diabète (*Reaven et al., 1988 ; Paolisso et al., 1995 ; Green et al., 2004 ; Houstis et al., 2006*).

### 2.2. Insulino-résistance, obésité et DT2, de nombreuses corrélations !

L'épidémie d'obésité est bien décrite dans les cultures occidentales : dans la population américaine, par exemple, tandis que 66% des individus sont en surpoids, 33% d'entre eux sont atteints d'obésité (*Ogden et al., 2006*). L'inflation de ces taux ces dernières

années s'associe à ceux de la part énergétique (16%) en sucre dans l'alimentation (*Malik et al., 2006*). L'obésité s'accompagne, à terme, de son lot de complications, principalement : hypertension, insulino-résistance et DT2 (*Mokdad et al., 2003 ; Reaven, 2005*).

L'insulino-résistance se définit comme une réponse insulino-sécrétoire inadéquate, de la part des tissus cibles à l'insuline tels que le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux, vis à vis des niveaux circulants en cette hormone. Les signes d'une sensibilité à l'insuline altérée dans ces tissus sont : (i) une moindre captation du glucose stimulée par l'insuline (muscle squelettique) ; (ii) une moindre inhibition de la production hépatique de glucose par l'insuline (foie) ; et (iii) une moindre inhibition de la lipolyse par l'insuline (tissu adipeux).

En précédant le développement de l'hyperglycémie chronique (*Stumvoll et al., 2005*), l'insulino-résistance est un prédicteur déterminant des séquelles métaboliques voire pathologiques représentées par le DT2 (*Facchini et al., 2001*). Par une sécrétion de l'insuline abondante, il est possible de maintenir des niveaux de glucose normaux. Le déterminisme du passage de l'insulino-résistance vers la détérioration de l'homéostasie glucidique évoluant *in fine* en DT2 repose donc sur le maintien de la fonction de la masse  $\beta$ -cellulaire (*Stumvoll et al., 2005*). Elle définit également le syndrome métabolique (ou syndrome X) qui englobe, outre la perte de sensibilité à l'insuline associée à l'obésité, une dyslipidémie, une hypertension, et une hyperinsulinémie (pour ne citer celles) (*Reaven, 2005*). Les causes de l'insulino-résistance sont tout à la fois génétiques et acquises. Les propensions génétiques dans les populations sujettes au DT2 (prédiabétiques) demeurent mal connues au plan mécanistique. L'une des pistes probables est à chercher du côté du métabolisme oxydatif car des anomalies à ce niveau ont récemment été proposées chez des individus prédiabétiques, descendants de parents DT2, notamment dans le muscle squelettique (*Zierath et Wallberg-Henriksson, 2002 ; Petersen et al., 2004 ; Morino et al., 2005*). Ceci suggère, en effet, que des altérations précoces à ce niveau pourraient prédisposer à l'accumulation intramyocellulaire de lipides et à l'insulino-résistance. Reste que le déploiement de ces anomalies potentielles en maladie est toujours fertilisé par un environnement propice, dont les facteurs (sédentarité, obésité, vieillissement) sont polymorphes et interactifs (*Mokdad et al., 2003 ; Reaven, 2005 ; Hamilton et al., 2007*).

### 3. Stress oxydant et DT2

#### 3.1. Marqueurs de stress oxydant dans le DT2

##### 3.1.1. Marqueurs circulants

De nombreuses corrélations cliniques permettent d'associer le stress oxydant et la toxicité de l'hyperglycémie. La fréquence de marqueurs du stress oxydant en est la manifestation dans l'espace cellulaire et extracellulaire. Par exemple, les niveaux circulants de marqueurs qui reflètent l'oxydation des bases de l'ADN (8-OHdG) (*Shin et al., 2001*) et des lipides (TBARS, 8-epi-PGF<sub>2α</sub>) (*Gopaul et al., 1995 ; Turk et al., 2002*) sont accrus, de même que la présence d'ERO, chez les sujets DT2 (*Nourooz-Zadeh et al., 1995 ; Guzik et al., 2002*). Une augmentation des altérations de l'ADN a également été constatée dans les cellules immunitaires de ces patients (*Dandona et al., 1996 ; Rehman et al., 1999*). Par ailleurs, l'oxydation et la nitration des protéines est une autre manifestation de l'hyperglycémie. En effet, la nitrotyrosine est détectée au niveau artériel en réponse à l'hyperglycémie chez le sujet DT2 et l'animal diabétique (*Pennathur et al., 2001 ; Ceriello et al., 2002*). Divers marqueurs de stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et MDA) peuvent néanmoins régresser suite à un traitement intensif de l'hyperglycémie (*Wierusz-Wysocka et al., 1995*).

Concernant les défenses circulantes, elles sont inversement corrélées aux taux d'hémoglobine glyquée (*Maxwell et al., 1997*). De plus, la concentration en GSH, l'activité des enzymes catalase et GCLC, ainsi que le transport des thiols, sont diminués (*Yoshida et al., 1995 ; Thornalley et al., 1996 ; De Mattia et al., 1998 ; Dinçer et al., 2002 ; Turk et al., 2002*). Agent anti-diabétique (*Yoshida et al., 1995*) ou perfusion de GSH (*De Mattia et al., 1998*) sont néanmoins en mesure d'améliorer ces paramètres. Ces déséquilibres s'accompagnent également, au niveau circulant, d'une diminution des taux d'acide urique et d'acide ascorbique (*Sundaram et al., 1996 ; Will et Byers, 1996 ; Maxwell et al., 1997*). L'ensemble de ces anomalies explique vraisemblablement de moindres capacités fonctionnelles de défenses au niveau circulant (*Santini et al., 1997 ; Opara et al., 1999*). Signalons aussi que, dans le cadre des complications secondaires liées au diabète, on associe facilement la genèse de la plaque d'athérome au stress oxydant, puisque les radicaux jouent un rôle clé dans l'oxydation des LDL (*Steinberg et al., 1989*), qui transforment les monocytes en cellules spumeuses.

Les individus DT2 présentent également des taux urinaires en 8-OHdG supérieurs à la normale qui, plus que les niveaux plasmatiques, sont corrélés avec la sévérité des complications associées au diabète (néphropathie, rétinopathie) (*Kanauchi et al., 2002 ; Nishikawa et al., 2003*). Ce marqueur est également présent en quantité anormalement élevée dans les plaques athéromateuses prélevées chez ces patients (*Hayaishi-Okano et al., 2003*). Enfin, certains arguments permettent de penser que le stress oxydant, présent à l'état basal dans les deux formes de diabète (DT1 et DT2), serait plus prononcé dans le DT2 que dans le DT1 (*Dinçer et al., 2002*). Notons tout de même qu'au moment de la déclaration du DT1, les enfants prédiabétiques présentent des niveaux de SOD anormalement élevés (*Seghrouchni et al., 2002*).

##### 3.1.2. Marqueurs pancréatiques

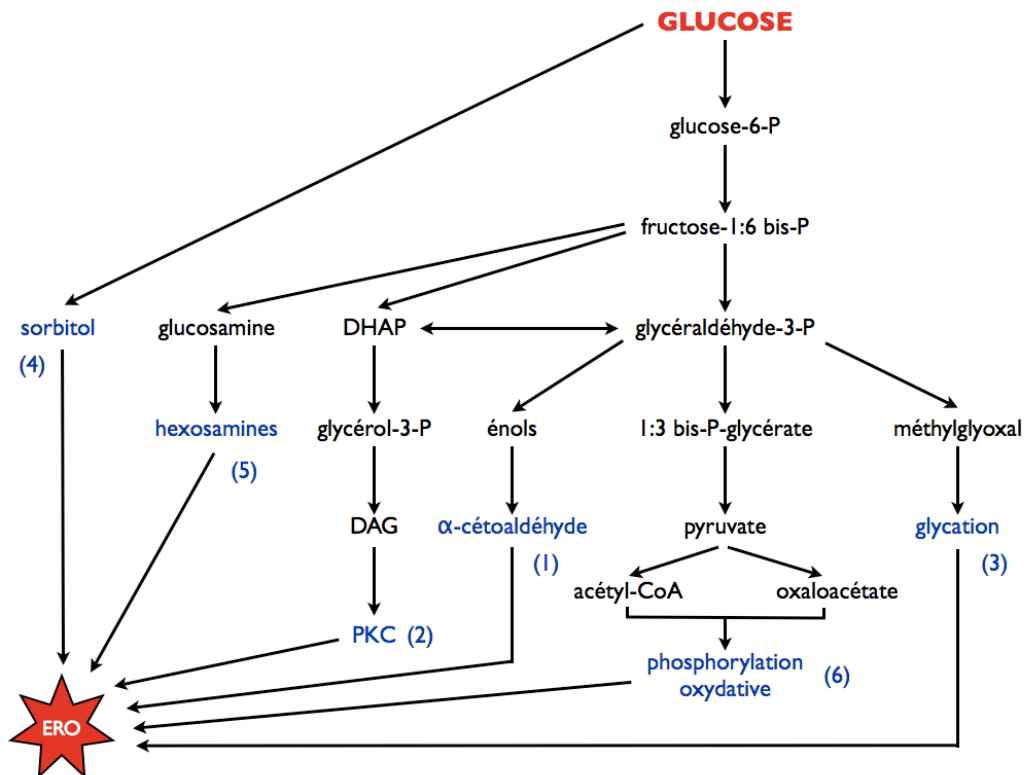
Les données rapportant l'état de stress oxydant sur tissus frais humains sont quasi-inexistantes. Parallèlement à l'existence d'une masse β-cellulaire réduite, quelques

marqueurs de dommages oxydatifs ont néanmoins été rapportés chez les sujets DT2. Notamment, Sakuraba et al. ont montré que le 8-OHdG — corrélé à la faible masse  $\beta$ -cellulaire — et le HNE sont accrus, tandis que la SOD-1 est augmentée (Sakuraba et al., 2002).

### 3.2. L'hyperglycémie chronique, un facteur pro-oxydant

#### 3.2.1. Voies de production d'ERO

Une fois entré dans la cellule, le glucose est d'abord converti en glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, fructose-1,6-diphosphate, glyceraldehyde-3-phosphate, pour être dégradé *in fine* en pyruvate. Le pyruvate rejoint alors la mitochondrie et continue sa dégradation dans le cycle de Krebs pour sustenter le processus d'oxydation phosphorylante et la synthèse d'ATP. Cependant, dans la cellule, principalement lorsque le glucose est excédentaire — par rapport à la demande énergétique — six voies de production d'ERO à partir de ses métabolites sont possibles (pour revue : Robertson, 2004a) (Fig. I16).



**Fig. I16. Les six voies de production d'ERO par le glucose (d'après Robertson, 2004a).** Dans les conditions physiologiques, le glucose est métabolisé par la glycolyse anaérobie puis par la phosphorylation oxydative (6). Dans les conditions pathologiques associées à l'hyperglycémie, le glucose peut dériver de cette voie classique et inhiber le catabolisme du glyceraldehyde, causant une réorientation des flux métaboliques du glucose, du fructose-1,6-bisphosphate et du glyceraldehyde-3-phosphate vers : (1) la formation d'α-cétoaldéhyde ; (2) ; l'activation des PKC ; (3) la formation de composés dycarbonylés et la glycation ; (4) le métabolisme du sorbitol ; (5) le métabolisme des hexosamines ; (6) la phosphorylation oxydative. Toutes ces voies mènent à la production d'ERO. DAG, diacylglycérol ; DHAP, dihydroxyacétone-phosphate ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; PKC, protéines kinases C.

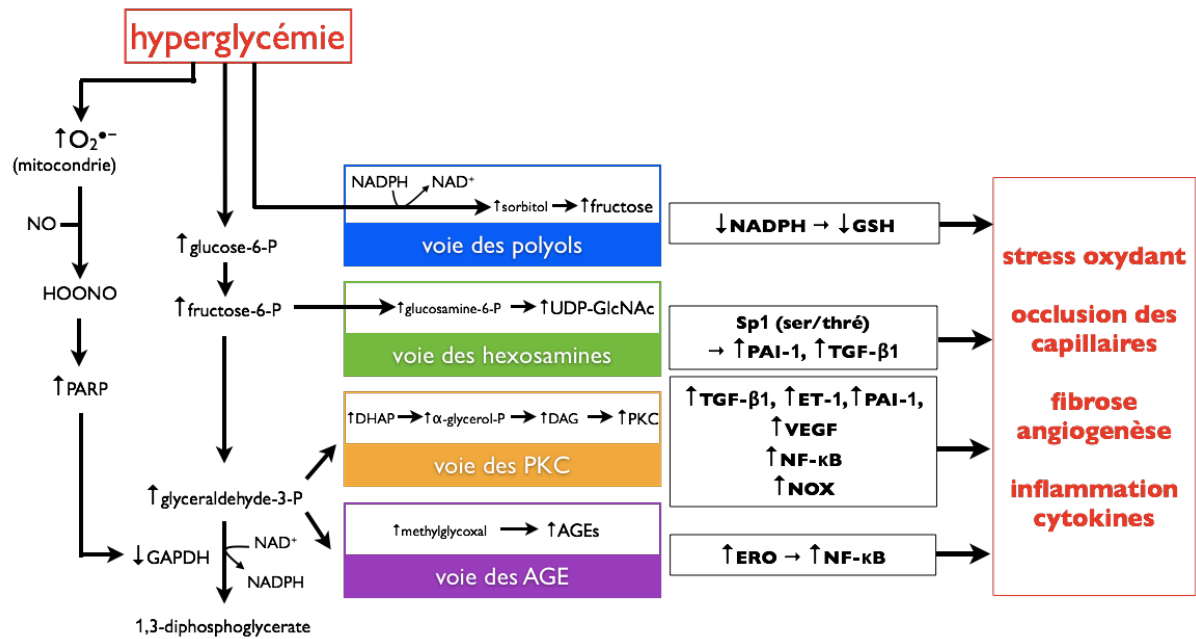
Une première voie alterne à la voie classique du métabolisme du glucose est l'auto-oxydation du glycéraldéhyde (Fig. I16, *voie 1*), susceptible de produire des  $\alpha$ -cétoaldéhydes qui contribuent à la glycosylation des protéines, et à la production d' $H_2O_2$ . Dans une deuxième voie, la dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) (*voie 2*) peut être réduite en glycérol-3-phosphate et ainsi augmenter la synthèse *de novo* de diacylglycérol (DAG), lequel active les protéines kinase C (PKC), sources d'ERO. La troisième voie est celle des réactifs dicarbonylés (méthylglyoxal, glyoxal, 3-deoxyglucosone) (*voie 3*) qui réagissent avec les protéines pour former des protéines glyquées intra et extracellulaires (AGE pour "produits de glycation avancée"), elles-mêmes inductrices d'ERO. La quatrième est liée au métabolisme du sorbitol (*voie 4*), précurseur de méthylglyoxal et de DAG. Outre les phénomènes de glycation, la réaction de Maillard entre les glucides et les protéines est aussi une source intrinsèque d'ERO. Dans une cinquième voie — celle du métabolisme de la glucosamine et de l'hexosamine (*voie 5*) — le fructose-6-phosphate est dévié vers la formation de glucosamine-6-phosphate puis d'UDP-*N*-acétylglucosamine, précurseur de protéoglycanes et de la formation de protéines glyquées. Pour finir, n'oublions pas la voie mitochondriale (*voie 6*), la plus importante voie de production d'ERO dans l'organisme. En résumé, l'environnement diabétique constitue un puissant promoteur de stress oxydant.

### 3.2.2. La théorie "unificatrice"

L'hyperglycémie augmente la production d'ERO dans divers types cellulaires (cellules nerveuses, endothéliales, mésangiales), et il est bien connu que l'hyperglycémie chronique engendre, à terme, rétinopathie, néphropathie et vasculopathie (*Brownlee, 2001*). Après 40 années de recherche intensive dans le domaine des complications associées au diabète (*Gabbay et al., 1966*), de récentes découvertes viennent enrichir la connaissance de la physiopathologie du diabète. Elles nous viennent d'éléments de preuve démontrant que l'anion superoxyde joue un rôle central dans la pathogenèse de ces complications (pour revues : *Brownlee, 2001* ; *Brownlee, 2005*). L'avantage de cette hypothèse est qu'elle fait justement le lien entre la production d'ERO mitochondriales et certaines des voies précisées ci-dessus.

En effet, le superoxyde mitochondrial, à l'origine de cassures simples-brins sur l'ADN nucléaire, active indirectement quatre des voies alternes stimulées par l'excès de glucose et impliquées dans le développement des complications associées au diabète : (i) l'augmentation du flux de la voie des polyols ; (ii) l'augmentation de la formation des AGE ; (iii) l'activation des PKC ; et (iv) l'augmentation du flux de la voie des hexosamines (pour plus de précisions, voir Fig. I17).

Dans cette hypothèse "unificatrice", l'augmentation de la production du superoxyde, en réponse à l'hyperglycémie, représente un facteur pathogénique clé qui pourrait favoriser à la fois l'émergence des complications cardiovasculaires (*Bohlen et Lash, 1993*), l'insulino-résistance, et la dysfonction  $\beta$ -cellulaire, ces phénomènes étant d'une part tous symptomatiques des états diabétiques (*Ceriello et Motz, 2004*), et ayant un état de stress oxydant comme dénominateur commun.



**Fig. I17. La théorie “unificatrice” (adaptation de *Brownlee, 2005*).** Puissant initiateur des coupures simple-brins de l'ADN, le superoxyde (et plus particulièrement son produit de conjugaison avec le NO : le peroxynitrite) induit l'activation de l'enzyme de réparation PARP dans le noyau pour régénérer les liaisons covalentes au niveau de l'ADN. La grande quantité d'ADP-ribose qui en résulte est susceptible d'engendrer des modifications enzymatiques. Dans son hypothèse, *Brownlee* propose que, suite à une modification post-traductionnelle de type ADP-ribosylation, la GAPDH est inhibée et freine le flux glycolytique. Lors de l'hyperglycémie, tous les intermédiaires situés en amont de l'étape catalysée par la GAPDH vont alors s'accumuler et activer les 4 voies métaboliques impliquées dans les complications liées au diabète. 1) La voie des polyols étant une grande consommatrice de NADPH, la limitation de ce cofacteur, essentiel dans la régénération du GSH, risque d'accroître le stress oxydant. La voie des hexosamines altère l'activité de certains facteurs de transcription tel que Sp1, qui va à son tour stimuler l'activité du TGF-β1 et retentir négativement sur la vascularisation. La voie de la DHAP entraîne l'augmentation du DAG qui active les PKC ; il en résulte l'activation du TGF-β1, de l'ET-1, du VEGF et de PAI-1, favorisant la vasoconstriction, l'occlusion et la perméabilité des vaisseaux. Ce phénomène s'accompagne de l'augmentation des NADPH oxydases (NOX) et de NF-κB, et favorise le stress oxydant et l'inflammation. Enfin, la glycation de certaines protéines de la matrice extracellulaire, principalement des protéines circulantes captées par les récepteurs aux AGE, est à l'origine d'un processus pro-inflammatoire et de micro et macroangiopathies. DHAP, dihydroxyacétone-phosphate ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ET-1, l'endothéline-1 ; GAPDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; NF-κB, nuclear factor-κB ; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1 ; PARP, poly-ADP-ribose polymérase ; TGF-β1 ; transforming growth factor-β1 ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

### 3.2.3. Cas de la cellule endothéliale, modèle de stress oxydant dans le DT2

L'hypothèse mécanistique de *Brownlee* est bien démontrée dans la cellule endothéliale. Le mécanisme sous-jacent de la production de superoxyde par l'hyperglycémie, dans la cellule endothéliale, invoque la séquence d'événements suivante : l'excès de glucose stimule son oxydation par la mitochondrie ; elle se solde par une augmentation de l'apport en équivalents réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) à la chaîne respiratoire et du flux électronique y étant associé. Il en résulte un accroissement du potentiel de

membrane mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ), puis un ralentissement du flux d'électrons, lesquels vont alors s'accumuler au niveau des centres redox de la chaîne respiratoire — les complexes I et III — prêts à effectuer une réduction monovalente de l'oxygène (*Du et al., 2001*). Le fait que l'hyperproduction d'ERO et l'activation des quatre voies assujetties aux complications diabétiques, par la GAPDH, soient prévenues par la surexpression des gènes codant pour UCP1 et la MnSOD (*Du et al., 2000 ; Nishikawa et al., 2000 ; Du et al., 2003*), démontre d'une part que la production d'ERO est spécifique au superoxyde et, d'autre part, que ce dernier est bien le facteur causal de ces complications. En outre, les souris *db/db* surexprimant la MnSOD sont protégées contre l'activation de ces voies de complications (*DeRubertis et al., 2004*).

La véritable toxicité due à la production de superoxyde tient au fait qu'elle est un prémisses à d'autres événements délétères pour la cellule endothéliale. Ce radical interagit, en effet, très rapidement avec le NO, modulateur phare de la fonction endothéliale (*Moncada et al., 1991*), pour donner lieu à la formation du très cytotoxique peroxy-nitrite. Il y a deux conséquences à ce processus. Premièrement, le peroxy-nitrite est un puissant initiateur des coupures simple brin de l'ADN, lesquelles vont induire l'activation du système de réparation dépendant de la poly-ADP-ribose polymérase (PARP) et activer trois des quatre voies majeures impliquées dans les dommages associées à l'hyperglycémie (formation d'AGE, activation des PKC et voie des hexosamines) (*Garcia Soriano et al., 2001 ; Du et al., 2003*) (Fig. I17). Deuxièmement, cette interaction entre superoxyde et NO diminue la biodisponibilité du NO dans la cellule (*Giugliano et al., 1997*), affectant en retour le tonus vasculaire (*Bohlen, 1993*).

### 3.3. La cellule $\beta$ diabétique, autre victime du stress oxydant

#### 3.3.1. Hypothèses de glucotoxicité, lipotoxicité et glucolipotoxicité

Dans l'organisme, l'hyperglycémie imprègne toutes les cellules. Pourquoi, alors, la cellule  $\beta$  ferait-elle exception aux dommages causés par de fortes concentrations en glucose ? Le concept selon lequel les effets toxiques du glucose perturbent la fonction de la masse  $\beta$ -cellulaire — une fois les éléments pathogéniques primaires du DT2 en place — est désigné par ce que l'on appelle, dans le champ de la diabétologie, la "glucotoxicité" (*Unger et Grundy 1985 ; Unger, 1995*). Celle-ci traduit les phénomènes secondaires intervenant dans les différentes formes de DT2. Outre l'hyperglycémie chronique, un profil lipidique anormal — incluant l'excès d'acides gras et de triglycérides circulants — est une caractéristique largement répandue chez les sujets DT2, et peut engendrer des altérations morphologiques et fonctionnelles — phénomène appelé "lipotoxicité" (*Unger, 1995 ; Unger et al., 2001 ; Wrede et al., 2002*). La conjonction de ces deux phénomènes se définit par le terme "glucolipotoxicité" (*Prentki et al., 2002*). Très en vogue, ce phénomène est envisagé et concevable pour lier la dysfonction de la masse  $\beta$ -cellulaire au stress oxydant dans la physiopathologie du DT2 (pour revue : *Poitout et Robertson, 2008*). Dans ce contexte, s'ancre aussi, bien évidemment, la théorie "unificatrice" de Brownlee, basée sur la production de superoxyde à l'échelle multicellulaire, ciblant donc cette fois la cellule  $\beta$  (*Brownlee, 2003*).

#### 3.3.2. Faibles défenses antioxydantes

Historiquement, il y a une trentaine d'années, les premières études à s'être intéressées au rôle du stress oxydant dans le diabète se sont focalisées sur la



physiopathologie de la destruction insulaire (*Grankvist et al., 1981a ; Malaisse et al., 1982*). Ces découvertes majeures permirent d'expliquer comment les toxines diabétogènes que sont l'alloxane et la streptozotocine (STZ) attaquent si spécifiquement et féroce­ment la cellule  $\beta$  (*Ammon et al., 1983 ; Oberley, 1988*). Ces agents sont de puissants promoteurs de stress oxydant car ils produisent toutes sortes d'ERO à l'intérieur de la cellule, notamment du superoxyde, de l'hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène (*Grankvist et al., 1979 ; Gandy et al., 1982 ; Gille et al., 2002 ; Friesen et al., 2004*). Les divers travaux qui ont suivi ont permis de mieux illustrer le fait que cette grande susceptibilité est due à un déficit de l'îlot — relatif par rapport aux autres tissus — en antioxydants, comme en témoignent le faible contenu en GSH (*Ammon et al., 1983*), ainsi que la sous-expression des gènes codant pour les enzymes SOD-1 et -2, catalase, et GPx (*Grankvist et al., 1981a ; Welsh et al., 1995 ; Lenzen et al., 1996 ; Tiedge et al., 1997*). Globalement, les niveaux d'expression dans l'îlot couvrent environ 50% ceux du foie, avec plus précisément : 30–40% pour l'expression des SOD, et 15% pour la GPx. La GCLC est quand à elle normalement exprimée, tandis que la catalase est quasiment inexistante dans l'îlot (*Lenzen et al., 1996*).

Le deuxième argument fort, en faveur du rôle vital des défenses antioxydantes dans la protection  $\beta$ -cellulaire, émerge des différences de sensibilité à l'égard des agents promoteurs de stress oxydant. En effet, de la force de ces mécanismes de défense va dépendre la susceptibilité intrinsèque des cellules  $\beta$  aux attaques par la STZ ou l'alloxane, qu'elle soit intra-espèce (*Fischer et Hamburger, 1980 ; Robbins et al., 1980 ; Gandy et al., 1982 ; Mathews et Leiter, 1999a ; Mathews et Leiter, 1999b ; Mathews et al., 2004*), inter-espèce (*Modak et al., 2007*), ou liée au sexe (*Friesen et al., 2004*). Notamment, sur la base de leurs défenses antioxydantes, les premiers modèles de résistance *in vivo* innée au stress oxydant ont été mis en évidence (*Fischer et Hamburger, 1980 ; Robbins et al., 1980 ; Gandy et al., 1982 ; Mathews et Leiter, 1999a ; Mathews et Leiter, 1999b ; Mathews et al., 2004 ; Friesen et al., 2004 ; Modak et al., 2007*). D'autres modèles de tolérance *in vivo* aux drogues diabétogènes ont été générés par transgénèse, dirigée dans les cellules  $\beta$  chez la souris, responsable de la surexpression de la SOD-1 (*Kubisch et al., 1994 ; Kubisch et al., 1997*), de la catalase (*Xu et al., 1999*), ou de la Trx (*Hotta et al., 1998*). Des effets protecteurs synergiques de différents gènes de défenses, ont également été observés chez la souris transgénique, à la fois dans la protection contre le diabète induit par l'alloxane, et dans la survie des îlots isolés de ces souris après traitement par des agents pro-oxydants (*Chen et al., 2005*). Enfin, ce type de phénotype a également été observé après exposition *in vivo* à l'hyperglycémie, chez le rat pancréatectomisé, soulignant le caractère acquis de cette résistance  $\beta$ -cellulaire au stress oxydant (*Laybutt et al., 2002b*).

### 3.3.3. Effets glucotoxiques :

#### 3.3.3.1. sur des gènes clés

Divers parallèles peuvent être faits entre les effets de l'hyperglycémie et ceux du stress oxydant. Des études portant sur les effets délétères du glucose en chronique (3–12 mois) ont été réalisées dans des expérimentations de culture, en présence de glucose à différentes concentrations, avec des lignées  $\beta$ -cellulaires (HIT-T15 et  $\beta$ TC-6). Alors que, dans les conditions de faible glucose, l'ARNm du gène de l'insuline, le contenu insulaire en insuline, et l'insulino-sécrétion stimulée par le glucose (ISSG) sont maintenus, à fort glucose, ces paramètres sont progressivement diminués (11 vs. 0.8 mmol/l de glucose) (*Robertson et*

*al.*, 1992), de même que l'activité du promoteur du gène de l'insuline et l'activité de liaison des facteurs de transcription PDX-1 et/ou MafA à ce promoteur (*Olson et al.*, 1993 ; *Olson et al.*, 1995 ; *Sharma et al.*, 1995 ; *Poitout et al.*, 1996). Dans un autre modèle cellulaire (INS-1), les effets glucotoxiques sont beaucoup plus rapides et réversibles après culture à faible glucose (*Olson et al.*, 1998 ; *Pino et al.*, 2005), et ces effets ne résultent pas seulement d'une désensibilisation au glucose, car des altérations distales de la machinerie exocytotique sont rapportées (*Dubois et al.*, 2007). Des résultats proches ont été observés dans des îlots isolés cultivés à glucose 5.6 ou 16.7 mmol/l : six semaines de culture à fort glucose diminuent de moitié l'expression du gène de l'insuline (*Briaud et al.*, 1999).

### 3.3.3.2. sur la survie $\beta$ -cellulaire

L'idée que la masse de cellules  $\beta$  est diminuée chez les patients DT2 est un vieux sujet de débat (*Maclean et Ogilvie*, 1955 ; *Gepts*, 1957 ; *Saito et al.*, 1979 ; *Stefan et al.*, 1982 ; *Rahier et al.*, 1983 ; *Hellerström*, 1984 ; *Kloppel et al.*, 1985 ; *Clark et al.*, 1988 ; *Sempoux et al.*, 2001). Même si la masse  $\beta$ -cellulaire contribue très certainement à la pathogenèse du DT2, comme cela a été montré chez l'homme et le rongeur (*Hellerström*, 1984 ; *Butler et al.*, 2003 ; *Donath et Halban*, 2004 ; *Leahy*, 2005 ; *Portha*, 2005 ; *Masiello*, 2006 ; *Ritzel et al.*, 2006), il existe encore de nombreuses zones d'ombre quant à savoir si les patients diabétiques (i) ont une faible masse  $\beta$ -cellulaire dès la naissance ; (ii) ne parviennent pas à accroître cette masse pour compenser l'insulino-résistance ; (iii) et/ou perdent progressivement cette masse au cours de leur vie (*Rhodes*, 2005).

Il y a une dizaine d'années, seulement deux publications apportaient des arguments véreux sur l'hyperglycémie comme facteur pro-apoptotique dans la cellule  $\beta$  (*Jansson et al.*, 1995 ; *Maedler et al.*, 2001). Les anomalies de la fonction de la masse  $\beta$ -cellulaire, décrite la première fois par Cerasi et Luft, ont longtemps été considérées comme purement fonctionnelles (*Cerasi et Luft*, 1963). L'idée selon laquelle l'hyperglycémie puisse aussi induire l'apoptose (*Donath et al.*, 1999) fut d'abord considérée comme irrecevable, jusqu'à ce que des découvertes montrent une réduction significative du nombre de cellules  $\beta$  dans le DT2, tant chez l'homme que l'animal (*Hoorens et al.*, 1998 ; *Donath et al.*, 1999 ; *Sakuraba et al.*, 2002 ; *Butler et al.*, 2003 ; *Yoon et al.*, 2003 ; *Butler et al.*, 2004 ; *Masiello et al.*, 2006). Les données cliniques provenant d'études *post-mortem* montrent que dans les tissus pancréatiques de patients DT2, la masse  $\beta$ -cellulaire est réduite d'environ 30–60% comparativement aux sujets sains (*Klöppel et al.*, 1985 ; *Butler et al.*, 2003). De plus, alors que la fréquence de réplication  $\beta$ -cellulaire reste inchangée, celle de l'apoptose est augmentée d'un facteur 3–10 chez ces sujets par rapport aux individus non diabétiques présentant un degré d'insulino-résistance similaire (*Butler et al.*, 2003).

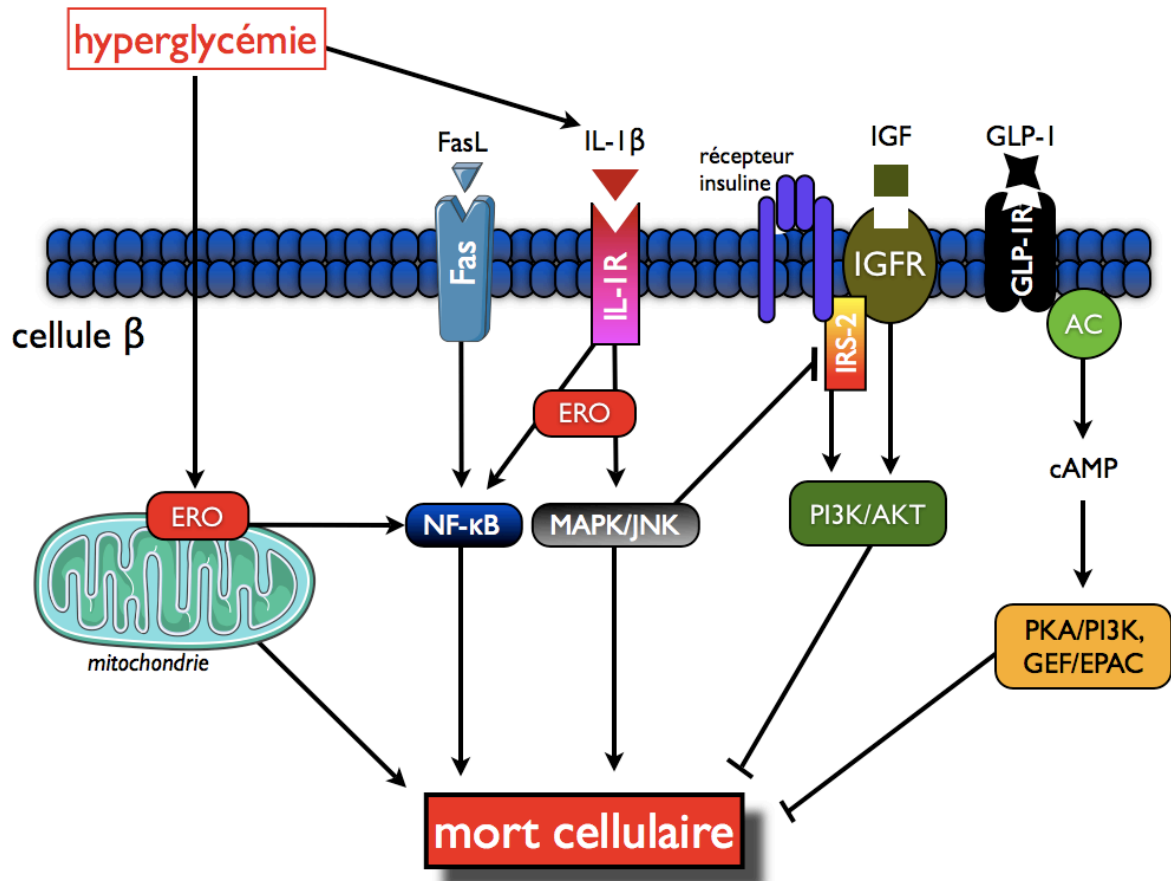
Chez l'animal, plusieurs modèles animaux spontanés de DT2 présentent une réduction de la masse  $\beta$  (*Bernard-Kargar et Ktorza*, 2001), et les études *in vivo* de différents modèles de rats mettent en évidence l'idée selon laquelle : le glucose induit progressivement la mort de la cellule  $\beta$  (*Robertson et al.*, 1992 ; *Jonas et al.*, 1999 ; *Tanaka et al.*, 1999 ; *Weir et al.*, 2001 ; *Laybutt et al.*, 2002a ; *Robertson et al.*, 2004b). Par exemple, chez la gerbille du désert *Psammomys obesus*, le passage d'un régime faible à un régime élevé en calories augmente la glycémie et conduit à une apoptose  $\beta$ -cellulaire massive, phénomène également reproduit *in vitro* dans des cultures primaires d'îlots de ces animaux (*Donath et al.*, 1999).

Diverses données conflictuelles existent, néanmoins, sur la responsabilité du glucose dans l'apparition de l'apoptose. *In vitro*, le glucose affecte les îlots d'humains et des rongeurs différemment. L'augmentation de la concentration de glucose entre 5.5 et 11 mmol/l, et au delà, induit l'apoptose des cellules  $\beta$  humaines de façon dose-dépendante (Maedler et al., 2001 ; Maedler et al., 2002), tandis que les études sur des îlots de rats montrent que l'augmentation du glucose à partir du seuil physiologique (5.5–11 mmol/l), diminue l'apoptose (Efanova et al., 1998 ; Donath et al., 1999). Au delà de 11 mmol/l, l'apoptose diminue ou augmente selon les conditions de culture (îlots vs. cellules  $\beta$ , culture en suspension vs. matrice) (Hoorens et al., 1996 ; Efanova et al., 1998 ; Donath et al., 1999 ; Herold et al., 2002 ; Keymeulen et al., 2005 ; Saxena et al., 2007).

Cependant, toutes ces données sont à prendre avec une grande précaution car, outre la grande pauvreté des données due à la faible accessibilité du tissu pancréatique, existent de nombreux biais liés au stress *post-mortem*, surtout chez l'homme (Rahier et al., 2004). De plus, outre les méthodes encore trop limitées pour détecter les faibles niveaux d'apoptose *in vivo* (Donath et al., 2008), différentes variables influencent la susceptibilité à l'apoptose induite par l'hyperglycémie (Martens et Van De Casteele, 2007). C'est par exemple le cas de la durée de mise en culture, la glucotoxicité étant réversible (Maedler et al., 2002 ; Robertson, 2004b). C'est aussi le cas du type de modèle de cellule  $\beta$ , ce qui pose la problématique du fond génétique (Donath et al., 2005) : les modèles provenant de fonds génétiques non-prédisposés au diabète montrent alors une faible susceptibilité à l'apoptose en réponse à l'hyperglycémie. Enfin, l'âge des animaux détermine lui aussi la réponse apoptotique (Maedler et al., 2006).

#### 3.3.4. Voies de mort dans la cellule $\beta$

Dans la physiopathologie du DT2, une grande variété de facteurs conduit à l'apoptose de la cellule  $\beta$  (pour revue : Donath et al., 2005) (Fig. I18). Bien que le stress oxydant joue un rôle central dans chacune de ces voies signalétiques, la voie extrinsèque est la mieux décrite dans le contexte physiopathologique du DT2, et nous nous attarderons sur celle-ci. Parmi les mécanismes menant à l'apoptose de la cellule  $\beta$ , les ERO jouent un rôle décisif de médiateurs intra et intercellulaires. Les modulateurs primaires que sont l'hyperglycémie (Donath et al., 2004 ; Kajimoto et Kaneto, 2004 ; Robertson et Harmon, 2006), les dyslipidémies (Piro et al., 2002 ; Unger et al., 2001), la déprivation en glucose (Rutter et al., 2003), les cytokines pro-inflammatoires (Maedler et al., 2002 ; pour revue : Donath et al., 2008) et la leptine (Maedler et al., 2004) représentent des stimuli de stress métabolique pour la cellule  $\beta$ , et orientent les mécanismes apoptotiques dépendant des ERO. Glucose et cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , et IFN- $\gamma$ ) peuvent induire l'apoptose par les voies intrinsèques et extrinsèques. Par exemple, dans les cellules  $\beta$  murines, l'apoptose induite par l'hyperglycémie s'accompagne d'une diminution des facteurs anti-apoptotiques et d'une augmentation des facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Federici et al., 2001). L'apoptose induite par les cytokines est associée à l'effondrement du potentiel de membrane (typique de la MMP) alors qu'une surexpression du gène Bcl2 inhibe ce phénomène (Saldeen, 2000). Aussi, le glucose, comme les cytokines, peut induire l'apoptose en relation avec la voie extrinsèque, comme en témoignent la surexpression à la membrane du récepteur de mort Fas (CD95) *in vitro* et *in vivo*, et l'activation des caspases-8 (Maedler et al., 2001 ; Laybutt et al., 2003 ; Mellado-Gil et al., 2004).



**Fig. 118. Voies de survie et de mort de la cellule  $\beta$ .** L'hyperglycémie induit l'expression du récepteur de mort Fas via la biosynthèse d'IL-1 $\beta$ , sensibilisant la cellule  $\beta$  au ligand de ce récepteur (FasL). La translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et la voie des MAPK/JNK induisent l'apoptose. La production d'ERO, induite par l'hyperglycémie, fragilise la mitochondrie et favorise la voie apoptotique mitochondriale. Les ERO peuvent aussi être produites en réponse à l'IL-1 $\beta$  et activer les voies NF- $\kappa$ B et MAPK/JNK. Les voies de survie sont conférées par l'activation de PI3K/AKT dépendante du récepteur à IGF (IGFR) et du substrat du récepteur à l'insuline de type 2 (IRS-2). L'AMPc, induit notamment par le récepteur au GLP-1 (GLP1-R) couplé aux adénylates cyclases (AC), active les voies PKA/PI3K ou EPAC qui protègent de l'apoptose. JNK inhibe l'action anti-apoptotique de IRS-2. AMPc, AMP cyclique ; EPAC, cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor (cAMP-GEF) ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; GLP-1, glucagon-like peptide-1 ; IGF, insulin-like growth factor ; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$  ; IRS-2, insulin receptor substrate-2 ; JNK, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B ; PI3K, phosphoinositide-3 kinase ; PKA, protéine kinase A.

La cellule  $\beta$  possède une forte propension à s'engager dans l'apoptose en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Les voies de signalisation concernées sont celles du facteur redox sensible NF- $\kappa$ B et des MAPK/JNK (Ammendrup *et al.*, 2000) ; lorsque ces voies sont régulées de façon aberrante, elles mènent à la mort de la cellule  $\beta$ . À ce titre, les ERO jouent un rôle déterminant dans l'activation de NF- $\kappa$ B induit par l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  (pour revue : Gloire, 2006). En condition de stress métabolique — principalement la gluco(lipo)toxicité — la cellule  $\beta$ , elle-même, peut stimuler la biosynthèse de l'IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines (Campbell *et al.*, 1989 ; Heitmeier *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2003 ; Maedler

*et al.*, 2004 ; *Jia et al.*, 2005 ; *Yang et al.*, 2005). Dans l'îlot humain, les mécanismes par lesquels le glucose induit l'apoptose impliquent la production insulaire — par les cellules  $\beta$  — de l'IL-1 $\beta$  (*Maedler et al.*, 2002). La voie signalétique induite par IL-1 $\beta$  implique l'activation de NF- $\kappa$ B puis la surexpression de Fas, avant que n'ait lieu la fragmentation de l'ADN. L'antagoniste naturel du récepteur de l'IL-1 $\beta$  (IL-1Ra) protège les îlots humains de ces effets délétères du glucose. De même, l'IL-1 $\beta$  est induite dans les cellules  $\beta$  de la gerbille du désert *Psammomys obesus* durant le développement du diabète ; ce phénomène est aboli lorsque la glycémie est normalisée. Ces données suggèrent que l'apoptose induite par le glucose implique la mise en jeu d'une voie finale commune (dépendante de l'IL-1 $\beta$ ) dans le DT1 et le DT2, ce qui remet en perspective les frontières classiques entre ces deux formes de diabète (*Donath et Ehses*, 2006). Cependant, non confirmée dans les îlots de patients diabétiques de type 2 (*Welsh et al.*, 2005), l'hypothèse selon laquelle les effets glucotoxiques passent par l'activation de la voie IL-1 $\beta$ –NF- $\kappa$ B–Fas est sujette à controverse (*Cnop et al.*, 2005 ; *Donath et al.*, 2008). Cette discordance pourrait s'expliquer par des différences dans les méthodes expérimentales utilisées (présence ou non d'une période de préculture à glucose 5.5 mmol/l).

Différentes cytokines, dont la leptine, sont capables d'induire l'apoptose des cellules  $\beta$  *via* l'induction de l'IL-1 $\beta$  et l'inhibition de l'IL-1Ra (*Maedler et al.*, 2004). D'autres cytokines libérées par les adipocytes — incluant le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 — modulent aussi la mort  $\beta$ -cellulaire, bien que la question de savoir si les concentrations circulantes (modulées par l'activité pro-inflammatoire du tissu adipeux) suffisent à stimuler la cellule  $\beta$ , reste ouverte (*Donath et al.*, 2003).

Divers facteurs anti-apoptotiques peuvent inhiber certains facteurs clés des voies précitées dans les îlots. Notamment, A20, induit *in vivo* chez le rat hyperglycémique (*Laybutt et al.*, 2002a ; *Laybutt et al.*, 2002b ; *Laybutt et al.*, 2003), inhibe la transactivation de NF- $\kappa$ B. L'apoptose induite par l'accumulation de lipides — principalement lorsqu'il s'agit du palmitate (*Listenberger et al.*, 2001) — est en grande partie liée à la production de céramides, connus pour leurs effets pro-oxydants et pro-apoptotiques dépendant de la voie mitochondriale (*Shimabukuro et al.*, 1998 ; *Unger*, 2004 ; *Unger et Orci*, 2001). Enfin, dans les états extrêmes de faible métabolisme (y compris dans une cellule  $\beta$  au *sensing* du glucose altéré), les ERO représentent aussi les médiateurs apoptotiques induits par l'AMPK, elle-même sensible à la baisse du métabolisme (*Kefas et al.*, 2003 ; *Rutter et al.*, 2003 ; *Martens et al.*, 2005 ; *Richards et al.*, 2005). Notons que d'autres inducteurs — liés à la glucotoxicité et éventuellement au métabolisme des ERO —, non abordés ici, concernent : l'élévation chronique de calcium et le stress du réticulum endoplasmique (*Donath et al.*, 2004 ; *Marchetti et al.*, 2007 ; *Scheuner et Kaufman*, 2008).

### 3.3.5. Voies de survie dans la cellule $\beta$

L'activation de certaines voies anti-apoptotiques protège la cellule  $\beta$  du stress oxydant associé à la gluco(lipo)toxicité (Fig. I18). L'induction pharmacologique de l'AMPc protège la cellule  $\beta$  (RINm5F) de l'activation des caspases-3 et de l'apoptose induite par la lipotoxicité (*Kwon et al.* 2004). Les auteurs ont observé des effets similaires avec un autre inducteur intracellulaire d'AMPc : le GLP-1 (dont l'action dans la cellule  $\beta$  est relayée par un récepteur membranaire couplé aux protéines G) et un agoniste de son récepteur : l'exenatide de demi-vie plus longue (résistant aux inhibiteurs de dipeptidyl peptidase IV).

L'AMPc protège également de l'apoptose induite par un sucre réducteur pro-oxydant : le ribose (il permet de manifester rapidement les effets à long terme du glucose) (*Koh et al., 2005*). À travers ces études, les voies dépendantes des PKA et du facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) ont été évoquées.

Outre ses rôles multiples dans la régulation de la sécrétion de l'insuline, la croissance cellulaire, la néogenèse, ou la réplication (*Elghazi et al., 2006*), la voie PI3K/PKB (ou PI3K/Akt) intervient dans les processus de survie de la cellule  $\beta$ . Les anomalies de cette voie sont associées au DT2 (*George et al., 2004*), et peuvent être décelées en amont, au niveau du substrat du récepteur de l'insuline (IRS), et plus particulièrement de l'IRS-2 dans la cellule  $\beta$ , celui-ci étant reconnu comme promoteur de croissance et de survie (*Aikin et al., 2004 ; Rhodes, 2005*). Divers facteurs de stress — rassemblés par le phénomène de gluco(lipo)toxicité — engendrent la dégradation de l'IRS-2 et, conséquemment, l'apoptose des cellules  $\beta$  et le DT2 (*Rhodes et White, 2002 ; White, 2002*). Les hauts niveaux d'ERO (via JNK/p38), de céramides, et de cytokines (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) conduisent à cette dégradation par la phosphorylation en serine/thréonine de IRS-2 (pour revue : *Rhodes, 2005*).

### 3.3.6. Effets protecteurs par les antioxydants :

#### 3.3.6.1. *in vitro*

L'une des preuves indirectes des effets pro-oxydants de la glucotoxicité nous vient des effets protecteurs induits par les antioxydants (NAC, aminoguanidine) dans les cellules HIT-T15 et les îlots isolés, cultivés chroniquement à fort glucose (*Kaneto et al., 1996 ; Tajiri et al., 1997*). Des effets comme la préservation de l'expression du gène de l'insuline, l'activité de son promoteur et l'activité de liaison de PDX-1 ont été rapportés (*Tanaka et al., 1999*). L'équipe de Marchetti a montré, dans des îlots de patients DT2, qu'un apport en antioxydants/anti-diabétiques exogènes (GSH et metformine) permet de rétablir partiellement — voire complètement — un phénotype insulaire normal au plan de l'architecture (granulation des cellules  $\beta$ ), de la fonction (ISSG, expression du gène de l'insuline), et de la survie (apoptose, activation des caspases), tout en améliorant/normalisant les concentrations en 8-OHdG, nitrotyrosine et la production de NO après 24–72h de culture (*Marchetti et al., 2004 ; Del Guerra et al., 2005 ; Lupi et al., 2007*).

Dans les îlots isolés de rats Zucker obèses (ZDF), la NAC prévient *in vitro* les altérations par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — induit par l'activation de la voie des hexosamines — sur l'ISSG, l'expression des gènes de l'insuline, de GLUT2, de la glucokinase, ainsi que l'activité de liaison de PDX-1 (*Kaneto et al., 2001*). L'aminoguanidine atténue également les effets délétères du NO, induits par les acides gras, sur la sécrétion de l'insuline (*Shimabukuro et al., 1997*).

Une autre stratégie fréquemment employée est la surexpression de gènes antioxydants (*Grankvist et al., 1981b ; Kubisch et al., 1997 ; Benhamou et al., 1998 ; Hohmeier et al., 1998 ; Tiedge et al., 1998 ; Xu et al., 1999 ; Moriscot et al., 2000*). Par exemple, la surexpression adénovirale du gène Gpx protège les îlots de rats des effets pro-oxydants du ribose, en prévenant la baisse de l'ARNm du gène de l'insuline, le contenu insulaire en insuline et l'ISSG (*Tanaka et al., 2002*). De même, la surexpression de Gclc protège les îlots de rats des effets pro-oxydants de l'IL-1 $\beta$ , et prévient partiellement la baisse de l'ISSG (*Tran et al., 2004*).

3.3.6.2. *in vivo*, chez l'animal

D'autres études, réalisées dans différents modèles animaux de DT2 — et obèses pour la plupart —, confortent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydant est impliqué dans les mécanismes de la glucotoxicité. Chez le rat obèse et diabétique OLETF, la troglitazone (molécule insulino-sensibilisante) prévient l'augmentation des produits de peroxydation lipidique ainsi que l'activité de la SOD (*Fukui et al., 2000*). Le rat ZDF, modèle de DT2 très insulino-résistant, devient hyperglycémique avec l'âge, à partir du moment où les cellules  $\beta$  ne parviennent plus à compenser l'insulino-résistance *via* une augmentation de l'expression du gène de l'insuline, de son contenu insulaire, et de sa sécrétion. Le traitement à base d'antioxydants (NAC ou aminoguanidine) engendre des effets positifs sur, outre les marqueurs de stress oxydant plasmatique (8-OHdG, MDA et HNE), l'hyperglycémie, l'ISSG, le contenu insulaire en insuline, la transcription du gène de l'insuline, ainsi que l'activité de liaison de PDX-1 et MafA (*Tanaka et al., 1999*). Au stade prédiabétique du ZDF, l'administration d'aminoguanidine prévient la surexpression insulaire de la iNOS, minimise la perte de fonctionnalité  $\beta$ -cellulaire, bloque la destruction des cellules  $\beta$  et l'apparition du diabète (*Kaneto et al., 1999*). Des effets positifs sur la régulation glycémique de ces animaux ont aussi été rapportés à la suite d'un traitement aux anti-diabétiques : metformine et troglitazone (*Harmon et al., 1999*).

Chez la souris *db/db*, autre modèle de DT2 associé à l'obésité, la NAC améliore le contrôle de l'homéostasie glucidique, avec une diminution modérée de la glycémie, et une masse  $\beta$ -cellulaire augmentée, expliquée par une apoptose réduite (*Kaneto et al., 1999*). Les auteurs ont aussi rapporté une préservation du contenu insulaire en insuline, de l'expression du gène de l'insuline et du contenu en PDX-1. Récemment, Tang et al. ont rapporté, dans les îlots isolés de rats non diabétiques rendus hyperglycémiques (pendant 48h par infusion de glucose), un rôle préventif *in vivo* d'un analogue pharmacologique de la SOD sur la production insulaire d'ERO et ses effets négatifs associés sur l'ISSG, (*Tang et al., 2007*).

## 4. Stratégies nutritionnelles pour diminuer le stress oxydant dans le DT2

### 4.1. Antioxydants et DT2

Les quelques essais — à base de vitamine E, acide lipoïque, coenzyme Q ou silymarine — réalisés chez les patients DT2 sont de courtes durées (moins d'une année) ; ils montrent quelques bénéfices au plan du contrôle de la sensibilité à l'insuline, de l'homéostasie glucidique, de l'hémoglobine glyquée, et parfois des taux de lipides circulants (*Paolisso et al., 1993a ; Paolisso et al., 1994 ; Paolisso et al., 1995 ; Konrad et al., 1999 ; Manzella et al., 2001 ; Hodgson et al., 2002*). L'efficacité de la vitamine C chez les sujets DT2 est, en revanche, sujette à controverse (*Velussi et al., 1997 ; Darko et al., 2002*).

Par ailleurs, les antioxydants à activité catalytique, comme les mimétiques de longue demi-vie couplant les activités de la SOD et de la catalase, parviennent à prévenir très efficacement les effets délétères des ERO induits par l'hyperglycémie au plan vasculaire. Ces mimétiques préviennent, en effet, très efficacement l'inhibition de la eNOS et de la prostacycline synthase dans l'endothélium (*Salvemini et al., 1999*). De même, et comme on pouvait s'y attendre, plusieurs études rapportent que la combinaison d'antioxydants se montre plus efficace que la monothérapie (*Kowluru et al., 2001*), bien que certains essais de grande envergure — proposant notamment une combinaison de vitamines C, E, B3, et  $\beta$ -carotène, associée à une statine — se soient révélés infructueux, voire même délétères au plan du profil lipidique (*Cheung et al., 2001*). L'effet bénéfique des antioxydants sur la fonction sécrétoire des cellules  $\beta$  n'a quand à elle jamais été montré chez les humains DT2. Les quelques études portant sur ce versant essentiel de la physiopathologie relatent même une absence d'effet, notamment avec la vitamine E (*Paolisso et al., 1993b*).

Une étude récente rapporte, néanmoins, que les concentrations estimées en vitamine E apportés par l'alimentation sont inversement corrélés à l'incidence du DT2 chez l'homme (*Montonen et al., 2004*). Toujours est-il qu'à ce jour, aucun essai de grande envergure avec la vitamine E ne s'est adressé aux populations diabétiques. Les essais cliniques de longue durée faisant usage de cet antioxydant se sont malheureusement montrés inefficaces sur la prévention de la mortalité chez les patients à risque de maladies coronariennes (*Lonn et al., 2002 ; Vivekananthan et al., 2003*). L'absence d'effet dans une situation où le stress oxydant a été montré comme jouant un rôle prédominant, soulève la question de la pertinence de ce moyen thérapeutique en chronique chez le diabétique.

### 4.2. Restriction calorique et fonction mitochondriale

L'augmentation de la balance énergétique due à l'augmentation de la prise alimentaire induit l'insulino-résistance musculaire et hépatique chez le rongeur (*Wang et al., 2001*), tandis que la restriction calorique chez l'homme et le rongeur améliore la sensibilité à l'insuline dans ces tissus (*Kelley et al., 1993 ; Cartee et Dean, 1994*). En réponse à la déprivation calorique, ou au contraire à la suralimentation, l'activation de voies signalétiques de stimulation et de rétroaction assure un *sensing* des changements fins de la balance énergétique. Certaines voies comme celles de la sous-unité de la PI3K, de la protéine déacétylase sirtuin 1 (SIRT1) (*Civitarese et al., 2007 ; Sun et al., 2007*), ou la protéine serine/thréonine kinase mTOR (*Um et al., 2004 ; Tzatsos et Kandror, 2006 ; Krebs et al., 2007*), répondent aux perturbations nutritionnelles. Par exemple, l'augmentation de certaines sous-unités de la PI3K est associée à des modulations de l'action de l'insuline et à l'insulino-



résistance (*Mauvais-Jarvis et al., 2002 ; Chen et al., 2004*) dans le muscle squelettique chez l'homme (*Bandyopadhyay et al., 2005*), de même que l'hyperactivation de mTOR (*Um et al., 2004 ; Tzatsos et Kandror, 2006 ; Krebs et al., 2007*). La restriction calorique chez le rongeur augmente le transport de glucose dans le muscle squelettique parallèlement à la diminution des mêmes sous-unités régulatrices de la PI3K (*McCurdy et al., 2005*). SIRT1 est quant à lui un régulateur positif de la sensibilité à l'insuline (*Bordone et al., 2007 ; Milne et al., 2007*), laquelle est accrue pendant la restriction calorique chez l'homme (*Civitarese et al., 2007*), tandis que la surcharge alimentaire (régime hyperlipidique), chez la souris, abaisse SIRT1 parallèlement à une augmentation de l'insulino-résistance (*Sun et al., 2007*).

Initialement décrit comme un facteur de longévité, régulant l'apoptose et les dommages sur l'ADN (*Lin et al., 2002 ; Brunet et al., 2004 ; Picard et al., 2004 ; Rodgers et al., 2005*), SIRT1 facilite les modulations métaboliques liées aux changements du statut nutritionnel (*Blander et Guarente, 2004 ; Sinclair, 2005*). L'un des mécanismes permettant de lier les effets néfastes du stress oxydant et de l'insulino-résistance repose sur la régulation, par les ERO, de l'activité sirtuin. En effet, il a récemment été montré que la fonction mitochondriale (dans le muscle squelettique) est contrôlée par l'activation de SIRT1 et de PGC1 $\alpha$  (*Lagouge et al., 2006 ; Gerhart-Hines et al., 2007*). En outre, un traitement par le resvératrol, antioxydant (*Baur et Sinclair, 2006*) et activateur spécifique de SIRT1 (*Howitz et al., 2003 ; Borra et al., 2005*), diminue l'acétylation de PGC1 $\alpha$ , améliore la fonction mitochondriale, et protège contre l'obésité et le diabète (*Lagouge et al., 2006 ; Gerhart-Hines et al., 2007*). Les dommages induits par les ERO sur la fonction mitochondriale pourraient donc être relayés par une inhibition de l'activité sirtuin et une augmentation de l'acétylation de PGC1 $\alpha$ , comme c'est le cas chez la souris insulino-résistante en réponse à un régime hyperlipidique (*Gerhart-Hines et al., 2007*).

#### 4.3. La restriction calorique contre le stress oxydant

La restriction calorique constitue aussi une intervention qui permet d'étendre la durée de vie chez les eucaryotes multicellulaires, y compris les mammifères (*Weindruch et Walford, 1988*), et de retarder les processus biologiques associés à l'âge (*Sohal et Weindruch, 1996 ; Yu, 1996 ; Merry, 2000 ; Alliot et al., 2002 ; Kappeler et al., 2004*). La principale explication vient de ce que cette intervention module favorablement les flux métaboliques (*Heilbronn et al., 2006*). La restriction calorique entraîne une diminution de la dépense énergétique de l'organisme entier (*Ramsey, 2000*). Chez le rat, une restriction calorique de 40% permet d'accroître la longévité de 30–50% (*Sohal et Weindruch, 1996 ; Barja et Herrero, 2000 ; Gredilla et al., 2001*). Cette idée, selon laquelle l'espérance de vie est inversement corrélée aux flux métaboliques, était soutenue déjà il y a un siècle à travers la théorie du *rate of living* (*Rubner, 1908 ; Pearl, 1928*) et trouve écho, depuis déjà quelques décennies, dans de nombreuses études portant sur le stress oxydant (*Harman, 1956 ; Sohal et Weindruch, 1996*). En effet, d'une part il existe une association forte entre allongement de la durée de vie et stress oxydant dans un grand nombre de modèles, de *S. cerevisiae*, au ver, ou à la mouche, en passant par la souris (*Weindruch et Walford, 1988 ; Lithgow et al., 1994 ; Longo et al., 1996 ; Migliaccio et al., 1999 ; Fabrizio et al., 2001 ; Holzenberger et al., 2003 ; Longo et Finch, 2003 ; Sinclair, 2005 ; Ingram et al., 2006*), d'autre part, la restriction calorique renforce l'organisme contre le stress oxydant (*Schulz et al., 2008*). Non-identifiés chez l'homme, les mécanismes sous-jacents à cette voie biologique font l'objet d'un débat

(Lin et al., 2002 ; Sinclair et al., 2006), même si des arguments convergent vers l'idée que la restriction calorique est bénéfique chez les humains (Heilbronn et al., 2006).

L'observation de la résistance au stress oxydant est effective dans des systèmes où la diminution de la prise alimentaire est d'au moins 30% (Harper, 2006), sur une période courte (Raffaghello et al., 2008) ou longue (Bruce-Keller et al., 1999). Le succès de cette condition expérimentale repose sur le fait que la limitation en calories, au même titre que de faibles niveaux de glucose, active différentes diverses voies de résistance au stress dans la cellule, lui conférant des propriétés de résistance aux promoteurs de stress oxydant (Masoro, 2000 ; Merry, 2002 ; Sohal et Weindruch, 1996 ; Raffaghello et al., 2008 ; Schulz et al., 2008). La résistance au stress oxydant se manifestent par une atténuation des dommages oxydatifs sur les lipides (peroxydation lipidique) (Lass et al., 1998 ; Bevilacqua et al., 2005), les protéines (Sohal et al., 1994 ; Lass et al., 1998) et l'ADN (Gredilla et al., 2001 ; Lopez-Torres et al., 2002 ; Drew et al, 2003 ; Gredilla et Barja, 2005). De plus, la susceptibilité à l'induction de la MMP, événement apoptotique central, est diminuée chez les animaux restreints (Kristal et Yu, 1996).

## 5. Modèles d'étude

Dans cette thèse, deux modèles animaux ont été étudiés : le rat Goto-Kakizaki, modèle spontané de DT2, et le rat Lou/C, spontanément restreint en calories et résistant à l'obésité.

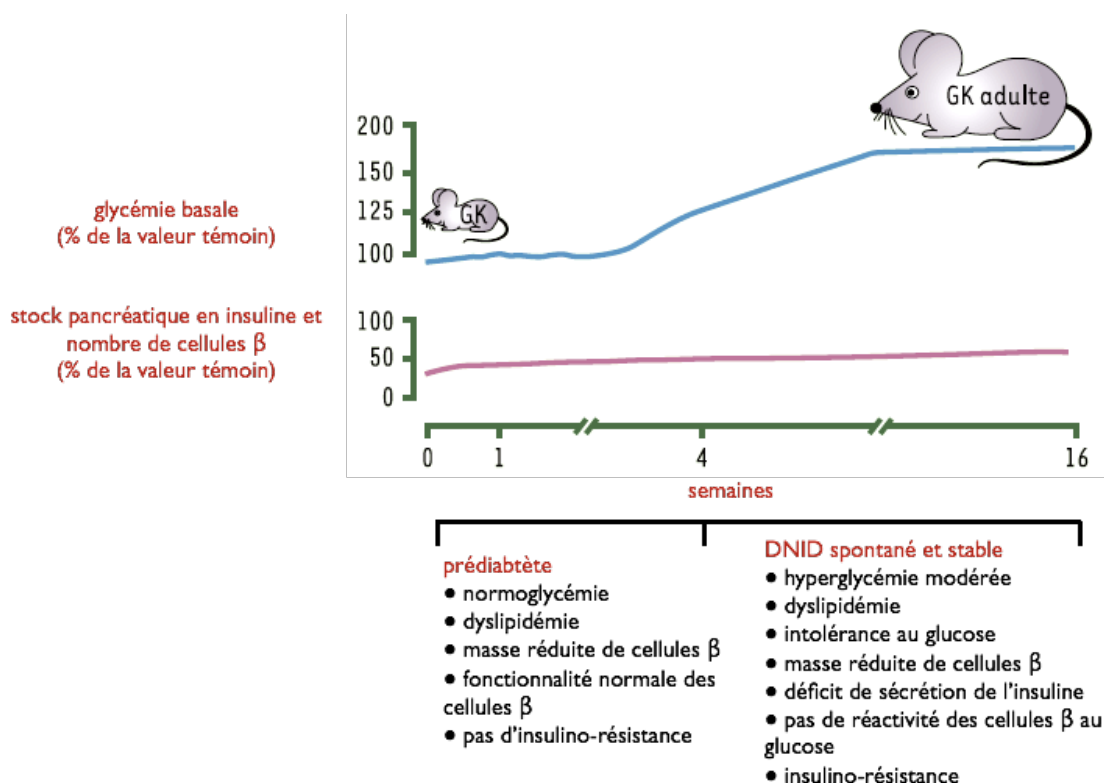
### 5.1. Le rat GK/Par, spontanément diabétique

#### 5.1.1. Modèle de DT2 humain

Issu de croisements répétés de rats Wistar — sur la base d'une tolérance au glucose infranormale — le rat Goto-Kakizaki (GK) est un modèle animal qui développe spontanément un DT2 (*Goto et al., 1975 ; Goto et al., 1988*). Le rat GK issu de la lignée parisienne du Pr. B. Portha (GK/Par) (pour revues récentes : *Portha et al., 2007 ; Portha et al., 2008*) s'apparente au DT2 humain par bien des aspects : (i) un contenu insulaire en insuline et une masse  $\beta$ -cellulaire diminués d'environ 40% ; (ii) une gluco-incompétence, qui se traduit par une réduction/absence de la première phase de sécrétion ; (iii) une réponse maintenue aux autres sécrétagogues : glutamine, leucine, arginine ; et (iv) un déficit en ATP lié à un ratio ATP/ADP diminué en réponse au glucose. La masse de cellules  $\beta$  est congénitalement diminuée chez le rat GK/Par (*Movassat et al., 1997 ; Portha et al., 2001*), non pas en raison d'une apoptose  $\beta$ -cellulaire mais — du moins en partie — à une diminution de leurs taux de réplication *in vivo*. L'hyperglycémie basale apparaît seulement après le sevrage (entre 3 et 4 semaines d'âge) (*Portha et al., 2001*), moment où les anomalies de la fonction  $\beta$ -cellulaire apparaissent. Il existe donc une corrélation chronologique entre l'acquisition de ces anomalies et l'exposition des cellules  $\beta$  à un environnement métabolique diabétique (Fig. I19). L'hyperglycémie chronique est assortie d'une hyperlipidémie (augmentation du cholestérol, des triglycérides et des acides gras non estérifiés) modeste, déjà présente à la naissance (*Homo-Delarche et al. 2008*).

#### 5.1.2. Modèle de stress-oxydant ?

Dans l'îlot GK/Par, il existe un microenvironnement lié au stress oxydant. En effet, des données récentes attestent qu'une inflammation chronique insulaire contribue à la physiopathologie du diabète chez le rat GK/Par (*Homo-delarche et al., 2006 ; Ehses et al., 2007a ; Ehses et al., 2007b ; Portha et al., 2008*). Le travail de Homo-Delarche et al. a permis de mettre en évidence que, parmi les 71 gènes surexprimés (analyse de transcriptome par microarray [Affymetrix]) dans l'îlot GK/Par, la moitié codent pour des molécules de la réponse immunitaire et de l'inflammation, et un quart pour des molécules de la matrice extracellulaire et de l'adhésion cellulaire (*Homo-Delarche et al., 2006*). Il a aussi été montré que les cellules  $\beta$  du rat GK (souche japonaise) surexpriment le gène de l'IL-1 $\beta$  (*Mine et al., 2004*). A ce profil moléculaire, et parallèlement à la durée d'exposition à l'hyperglycémie chronique chez le rat GK/Par, s'associe la présence de macrophages et de granulocytes à l'intérieur et autour des îlots ; elle est accompagnée de la progression de protéines de la matrice extracellulaire (phénomène rappelant la microangiopathie) (*Homo-delarche et al., 2006 ; Ehses et al., 2007b ; Portha et al., 2008*). Les données montrant des altérations de la circulation sanguine et de la vascularisation chez cet animal — restaurées par la normalisation de la glycémie — sont parfaitement compatibles avec des anomalies de la microcirculation insulaire (*Atef et al., 1994 ; Svensson et al., 1994 ; Svensson et al., 2000*).



**Fig. I19. Chronologie d'apparition et d'évolution du diabète spontané du rat GK/Par (d'après Portha, 2003). DNID: diabète non insulino-dépendant.**

L'analyse du transcriptome de l'îlot GK/Par a, par ailleurs, révélé que près de 3% des gènes surexprimés sont impliqués dans le stress oxydant, et 5% régulent les processus de croissance et de survie cellulaire (*Homo-Delarche et al., 2006*). Diverses données sur le stress oxydant sont rapportées dans d'autres colonies de rats GK. Dans les îlots issus de GK japonais (GK/Jap), des marqueurs indirects du stress oxydant (8-OHdG, HNE) ont été décelés, et ceux-ci sont clairement associés à l'hyperglycémie car d'une part ils progressent avec la durée d'exposition à l'hyperglycémie et, d'autre part, ils sont diminués une fois la glycémie normalisée (*Ihara et al., 1999*). Des traitements à base d'antioxydants (vitamine E, acide lipoïque) ou de metformine améliorent le contrôle glycémique, les indicateurs de stress oxydants circulants et urinaires, ainsi que les défenses antioxydantes plasmatiques chez ces animaux (*Ihara et al., 2000 ; Bitar et al., 2005 ; Rösen et Wiernsperger, 2006 ; Sena et al., 2008*). Les effets des traitements antioxydants demeurent néanmoins controversés selon la colonie de rat GK étudiée (*Oliveira et al., 2004*). Par ailleurs, des travaux récents, obtenus dans une colonie portugaise de rats GK/Par, ont mis en évidence, dans les pancréas de ces animaux, une activité accrue de SOD et GPx, parallèlement à un phénomène de peroxydation lipidique (*Sena et al., 2008*).

Toujours dans cette souche portugaise, des altérations fonctionnelles de la mitochondrie de foie ont été observées avec : une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial (*Ferreira et al., 2003a*), une protection contre le stress oxydant et la MMP, et une augmentation des défenses antioxydantes (*Ferreira et al., 1999b ; Santos et al., 2001 ; Ferreira et al., 2003b*). De plus, ces altérations augmentent avec l'âge des animaux (*Ferreira et al., 1999a ; Ferreira et al., 2003a ; Ferreira et al., 2003b*).

## 5.2. Le rat Lou/C, spontanément restreint en calories

### 5.2.1. Modèle animal *anti-obèse*

Le rat Lou/C, dérivé de la souche Wistar (Bazin et Beckers ; Université de Louvain, Belgique), présente tous les stigmates de la restriction calorique. Le rat Lou/C se restreint en calories (-40%) spontanément, et sa prise alimentaire est corrélée à une masse corporelle amoindrie, comparativement à son cousin Wistar (Veyrat-Durebex *et al.*, 1998 ; Ramsey, 2000 ; Couturier *et al.*, 2002) (Photo 1). Avec une hyperactivité locomotrice spontanée et une masse du tissu adipeux brun accrue, assortie d'une thermogenèse plus élevée, le rat Lou/C présente une dépense énergétique supérieure à la normale (Veyrat-Durebex et Alliot, 1997 ; Alliot *et al.*, 2002 ; Couturier *et al.*, 2002 ; Perrin *et al.*, 2003 ; Servais *et al.*, 2003 ; Abdoulaye *et al.*, 2006 ; Soulage *et al.*, 2008). La faible adiposité (-70% comparée au Wistar) caractéristique du rat Lou/C n'est pas reproductible chez le rat Wistar par un simple ajustement des apports caloriques chez ce dernier (Couturier *et al.*, 2002 ; Couturier *et al.*, 2004 ; Garait *et al.*, 2005). Le rat Lou/C maintient une plus faible adiposité comparativement au Wistar restreint (Couturier *et al.*, 2002 ; Couturier *et al.*, 2004), ce qui témoigne d'une plus grande aptitude à oxyder les lipides chez le rat Lou/C. Avec une meilleure sensibilité à l'insuline et une moindre glycémie (Couturier *et al.*, 2002 ; Perrin *et al.*, 2003), le rat Lou/C atteste aussi d'un meilleur contrôle de l'homéostasie glucidique. Enfin, la longévité du rat Lou/C est accrue (Dodane *et al.*, 1991 ; Veyrat-Durebex et Alliot, 1997 ; Alliot *et al.*, 2002 ; Zimmerman *et al.*, 2003), et il se montre résistant à l'obésité avec l'âge contrairement au Wistar (Boghossian *et al.*, 2000 ; Perrin *et al.*, 2003).



**Photo 1. Rats Wistar et Lou/C au même âge**

### 5.2.2. Modèle animal *anti-stress oxydant* ?

Les récentes implications du stress oxydant dans diverses altérations pathologiques (insulino-résistance, hyperinsulinémie, hyperglycémie, dyslipidémie), caractéristiques du syndrome métabolique (pour revue : Frisard et Ravussin, 2006), suggèrent que le rat Lou/C représente un modèle approprié en vue d'évaluer l'impact des apports caloriques sur les propriétés mitochondriales en relation avec l'insulino-sensibilité. À ce titre, de récentes

données montrent que la production mitochondriale d'ERO par le muscle squelettique est diminuée chez le rat Lou/C, et tient à des caractéristiques mitochondriales très singulières : une activité du complexe I diminuée et une augmentation du découplage *via* les protéines découplantes (UCP2 et UCP3) (Garait *et al.*, 2005). Néanmoins, la production d'ERO et les caractéristiques mitochondriales lui étant associées sont normalisées lorsque cet animal est soumis à un régime hyperlipidique (Garait *et al.*, 2005), pour lequel il présente une forte appétence (Veyrat-Durebex et Alliot, 1997 ; Kappeler *et al.*, 2004 ; Garait *et al.*, 2005 ; Héliès *et al.*, 2005).

## BUT DU TRAVAIL

Le monde de la diabétologie ne s'est jamais autant intéressé au stress oxydant. En effet, de multiples évidences montrent clairement que les dommages de l'hyperglycémie chronique, notamment dans les complications associées au diabète, sont causés et entretenus par le stress oxydant. Si de belles démonstrations permettent aujourd'hui de statuer sur le rôle délétère des ERO dans différents tissus (endothélium, rétine, rein), de fortes présomptions se focalisent actuellement sur la cellule  $\beta$ . Cet intérêt grandissant émerge d'un double constat. D'une part on sait que le déclin graduel de la cellule  $\beta$  est le pivot de l'installation et de la progression du DT2 ; une fragilité intrinsèque de la cellule  $\beta$  prédisposerait au DT2. D'autre part, la cellule  $\beta$  est très faiblement pourvue en systèmes antioxydants classiques, bien moins que d'autres cibles cellulaires (cellule endothéliale, neurone), dans lesquelles un stress oxydant manifeste a été identifié et reconnu comme cause des complications associées au DT2. La nocivité des forts niveaux de glucose extracellulaires pour la cellule  $\beta$  (hypothèse de "glucotoxicité") — et donc la progression du DT2 — serait liée en partie à une sensibilité particulière de la cellule  $\beta$  aux ERO. Dans un scénario, on peut imaginer qu'une cellule  $\beta$  diabétique présente des modulations de sensibilité aux effets délétères des ERO, dues à d'éventuelles adaptations à la glucotoxicité.

L'originalité de ce travail a été d'évaluer, dans un modèle animal de DT2 spontané, la vulnérabilité des cellules  $\beta$  diabétiques au stress oxydant et l'influence de l'hyperglycémie sur celle-ci. Deux approches ont été réalisées : (i) une approche visant à évaluer l'influence d'un stress oxydant calibré sur la sécrétion de l'insuline ; (ii) une approche axée sur la survie cellulaire, dans laquelle nous avons étudié les effets de cette exposition au stress oxydant sur l'apoptose des cellules  $\beta$ . (iii) Dans une dernière approche, nous nous sommes intéressés au rôle de l'environnement pro-oxydant et très singulier de l'îlot GK/Par (inflammation et anomalies de endothélium insulaire), pouvant contribuer significativement à l'exposition *in vivo* des cellules  $\beta$  à de forts niveaux d'ERO.

## RESULTATS

### 1. Résistance fonctionnelle au stress oxydant des cellules $\beta$ de rats GK/Par via une adaptation antioxydante

*Article 1 : Diabetic GK/Par rat  $\beta$ -cells achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses*

#### 1.1. Questions posées

Nombreuses sont les questions qui nous ont guidé pour amorcer puis cheminer dans ce premier volet sur l'histoire du stress oxydant de la cellule  $\beta$  diabétique, dans le modèle GK/Par. Est-il possible qu'une cellule  $\beta$  diabétique, voire prédiabétique, soit davantage prédisposée/exposée aux dommages oxydatifs ? Met-elle en oeuvre des stratégies de défenses ? Si oui, par quels mécanismes intracellulaires ? Quel est la place de l'hyperglycémie dans un tel scénario ?

#### 1.2. Résultats principaux

##### 1.2.1. Microenvironnement insulaire marqué par le stress oxydant

Le rat diabétique GK de la colonie japonaise a été décrit comme un modèle présentant un état de stress oxydant insulaire (*Ihara et al., 1999 ; Ihara et al., 2000*). En premier lieu, nous avons vérifié si les rats GK/Par de notre colonie — présentant des différences métaboliques avec leurs homologues japonais (*Portha et al., 2008*) — en sont aussi victimes. Dans un premier temps, nous avons donc cherché à identifier des marqueurs de stress oxydant au niveau de l'îlot GK/Par. L'étude immunohistochimique nous a permis de déceler la présence des principaux marqueurs indirects de stress oxydant sur des sections de pancréas, aux niveaux des compartiments hydrophiles (nitrotyrosine) et lipophiles (HNE). À notre grande surprise, bien que ces deux marqueurs aient été décelés de manière plus importante dans les pancréas diabétiques, ils localisent exclusivement le pourtour des îlots (Article 1, Fig. 1A ; résultats complémentaires, Fig. R1). L'état redox du glutathion, au niveau circulant, indique aussi un stress oxydant plus généralisé chez l'animal diabétique (Article 1, Table 1 ; résultats complémentaires, Fig. R2). De façon globale, nous avons constaté que l'îlot diabétique GK/Par évolue dans un microenvironnement oxydatif.

##### 1.2.2. Résistance aux effets délétères des ERO

Mon travail de thèse s'est poursuivi par la mise au point d'un protocole permettant d'étudier les effets des ERO sur la fonctionnalité de la cellule  $\beta$  diabétique GK/Par. Au laboratoire, deux types de protocoles expérimentaux existent afin de mesurer la sécrétion de l'insuline : l'incubation statique et la périfusion d'îlots (chambre de périfusion). Nous avons privilégié la périfusion compte tenu de ses nombreux atouts, dont la mesure en temps réel de l'insulino-sécrétion, l'analyse des différentes phases de l'exocytose, ainsi que la non-accumulation de produits. L'appareillage final a débouché sur un "système en T" périfusant les substrats et divers agents pro-oxydants de manière concomitante ; il nous a permis de détecter de fines perturbations sur l'exocytose en réponse aux fortes concentrations de glucose et de KCL.

Le deuxième point important dans la mise en place de ce protocole a été de restituer la gluco-compétence chez le rat GK/Par diabétique, afin de mieux déceler des altérations sur



cette fonction. À cette fin, nous avons adjoint de l'acétylcholine (1 mmol/l) au glucose à forte concentration (16.7 mmol/l), comme cela a été précédemment montré au laboratoire dans les îlots GK/Par (Dolz *et al.*, 2005).

À notre grande surprise, nous avons montré que les îlots GK/Par, contrairement à ceux des Wistar, sont résistants à tous les agents pro-oxydants testés (Article 1, Fig. 2). Les agents utilisés ont été sélectionnés sur la base de la nature des ERO qu'ils génèrent : exogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou exogène/endogène (alloxan et STZ). Cette absence d'effet a aussi été confirmée en incubation statique (Article 1, Fig. 6B ; résultats complémentaires, Table R1), condition qui nous a permis de tester d'autres molécules de modulation du statut pro-/anti-oxydant intracellulaire (résultats complémentaire, Fig. R3).

### 1.2.3. Défenses antioxydantes accrues

La détermination du phénotype de l'îlot GK/Par, pour le moins étonnant, nous a amené à en étudier les mécanismes. Les seuls systèmes en mesure de contrecarrer les ERO et leurs effets délétères sont les systèmes antioxydants. Nous avons donc déterminé les niveaux de défenses antioxydantes de l'îlot diabétique GK/Par (Article 1, Fig. 4). En adéquation avec la résistance fonctionnelle, nous avons montré un grand nombre de gènes surexprimés dans ces îlots. Parmi les principaux : Nrf2, Gpx1, Gclc, Cat, Sod1 et -2, Trx1 et -2, Txnrd1, Prxd1 et -2, Glrx1, Hmox1. De même, les gènes impliqués dans le découplage (Ucp2), et la production en NADPH (G6pdx, Me1, Idh1), cofacteur majeur des enzymes codées par les gènes présentées ci-dessus, sont également surexprimés. Ce profil transcriptionnel "très antioxydant" est accompagné d'un état redox du glutathion plus réduit [ $\uparrow$ GSH/(GSH+GSSG)] dans l'îlot GK/Par.

### 1.2.4. Moindre production d'ERO

Intimement liée aux capacités de défenses antioxydantes, l'accumulation d'ERO a été quantifiée en adaptant, à l'îlot, une technique de spectrofluorescence utilisant la sonde CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Les contenus insulaires en ERO, à faible concentration de glucose (mais pas à forte concentration), sont moins élevés dans le groupe GK/Par diabétique, comparativement au Wistar (Article 1, Fig. 5). Nous avons vérifié si ces ERO ont bien une origine essentiellement mitochondriale en répétant ces expériences en présence d'inhibiteurs spécifiques des centres de la chaîne respiratoire impliqués dans la production d'ERO : les complexes I et III. Cette accumulation est effectivement supérieure en présence des inhibiteurs spécifiques de ces complexes (roténone et antimycine, respectivement) dans les îlots GK/Par diabétiques, comme dans les îlots témoins. Les contenus en ERO sont même plus élevés dans ces conditions dans le groupe GK/Par. En revanche, et contrairement aux îlots témoins, un antioxydant (Trolox) n'est pas en mesure d'inhiber la production d'ERO par les îlots GK/Par. De plus, contrairement aux îlots témoins, l'insulino-sécrétion n'est pas non plus inhibée par les antioxydants (Trolox et NAC) dans le groupe GK/Par.

### 1.2.5. Résistance à l'effet "signal" exercé par les ERO à faible dose ("effet sensing")

Tout récemment, ont été mis évidence, dans la cellule  $\beta$ , un mécanisme de *sensing*, dépendant des ERO et l'altération de ce *sensing* par l'hyperglycémie *in vitro* (Pi *et al.*, 2007). Les auteurs ont imputé l'anomalie du *sensing* à une surexpression globale des défenses

antioxydantes engendrées par l'hyperglycémie, source mitochondriale d'ERO. Nous avons donc vérifié si cette thèse est valable *in vivo* dans notre modèle de cellule  $\beta$  diabétique, qui présente également un accroissement spontané des mêmes défenses. L'effet ERO-*sensing* a été validé dans notre système d'incubation avec les îlots témoins, puisque l'insulino-sécrétion à basse concentration de glucose est stimulée par une faible dose d'ERO exogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5  $\mu\text{mol/l}$ ) ou endogène (BSO, 1  $\text{mmol/l}$ ). De plus, l'effet potentialisateur de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est supprimé par la NAC dans ces îlots (Article 1, Fig. 6A, C). Dans les îlots GK/Par, en revanche, ni les effets potentialisateurs de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , ni ceux du BSO ne sont apparents. À forte concentration de glucose, alors que la NAC (Article 1, Fig. 6F) ou le Trolox (Article 1, Fig. 5C) inhibent l'ISSG par les îlots témoins, ces antioxydants sont sans effet dans les îlots GK/Par.

Ces résultats accréditent deux idées essentielles. Premièrement, l'interférence des défenses antioxydantes avec le *sensing* du glucose est probable dans les îlots du rat GK/Par spontanément diabétique, puisqu'un inhibiteur de la biosynthèse de GSH restaure partiellement *in vitro* (à faible concentration de glucose uniquement) la sécrétion de l'insuline. Deuxièmement, les antioxydants sont sans effet *in vitro* sur la restauration fonctionnelle des îlots GK/Par.

#### 1.2.6. Adaptation au diabète

Pour déterminer si les adaptations antioxydantes sont la conséquence de l'hyperglycémie chronique, nous avons étudié les îlots GK/Par pendant la période prédiabétique (avant le sevrage). Le statut pro-/anti-oxydant des rats GK/Par normoglycémiques âgés de 7 jours a été évalué (Article 1, Fig. 7). Parmi les 15 gènes participant aux défenses antioxydantes, deux (Gpx1 et Txn1) sont déjà surexprimés, et un (Gsr) est sous-exprimé dans les îlots de rats GK/Par prédiabétiques, comparativement aux rats Wistar du même âge. L'expression de tous les autres gènes est, en revanche, comparable à celle du groupe Wistar. Parallèlement, l'état redox du glutathion a tendance à être plus oxydé ( $p=0.06$ ). Ce profil pro-oxydant est accompagné d'une accumulation accrue d'ERO mitochondriales dans les îlots de rats GK/Par nouveaux-nés. Donc, bien que l'hyperglycémie chronique semble moduler de manière importante les défenses insulaires chez le rat GK/Par, elle n'est pas le seul facteur responsable (Article 3), puisque des altérations transcriptionnelles sont présentes précocement, dès le stade prédiabétique.

**Diabetic GK/Par Rat  $\beta$ -cells achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses**

Grégory Lacraz<sup>1</sup>, Florence Figeac<sup>1</sup>, Nadim Kassis<sup>1</sup>, Josiane Coulaud<sup>1</sup>, Anne Galinier<sup>2</sup>, Corinne Leloup<sup>2</sup>, Danielle Bailbé<sup>1</sup>, Françoise Homo-Delarche<sup>1</sup>, and Bernard Portha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité Mixte de Recherche (UMR) 7059, National Center for Scientific Research (CNRS) and Université Paris-Diderot (UP7), Bâtiment BUFFON, Paris, France

<sup>2</sup> UMR 5241, CNRS and Université P. Sabatier, CHU Rangueil, Toulouse, France

*Running title:* **Antioxidant defenses in diabetic GK/Par islets**

Address correspondence to: Bernard Portha, Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, CNRS UMR 7059, Université Paris-Diderot, Bâtiment BUFFON; 5ème étage; 36, Rue Hélène Brion, F-75251 Paris, France. Tel.: 33-1-57277787; Fax: 33-1-57277791; Email: [portha@univ-paris-diderot.fr](mailto:portha@univ-paris-diderot.fr)

## ABSTRACT

Oxidative stress (OS), through excessive and/or chronic reactive oxygen species (ROS), is a mediator of diabetes-related damages in various tissues including pancreatic  $\beta$ -cells. Here, we have evaluated islet OS status and  $\beta$ -cell response to ROS using the GK/Par rat as a model of type 2 diabetes.

Localization of OS markers was performed on whole pancreases. Using islets isolated from 7-day-old or 2.5-month-old male GK/Par and Wistar control rats, 1) gene expression was analyzed by qRT-PCR; 2) insulin secretion rate was quantitated; 3) ROS accumulation and mitochondrial polarization were assessed by fluorescence methods; 4) antioxidant contents were quantified by HPLC.

After diabetes onset, OS markers targeted mostly peri-islet vascular and inflammatory areas, and not islet cells. GK/Par islets revealed in fact protected against OS since they maintained basal ROS accumulation similar or even lower than Wistar islets. Remarkably, GK/Par insulin secretion also exhibited strong resistance to the toxic effect of exogenous  $H_2O_2$  or endogenous ROS exposures. Such adaptation was associated to both high glutathione content and overexpression of a large set of genes encoding antioxidant proteins as well as UCP2. Finally, we showed that such a phenotype was not innate but spontaneously acquired after diabetes onset, as the result of an adaptive response to the diabetic environment.

The GK/Par model illustrates the effectiveness of adaptive response to OS by  $\beta$ -cells to achieve self-tolerance. It is proposed that defective insulin secretion could be the necessary price to pay to blunt ROS accumulation that may otherwise compromise  $\beta$ -cell survival.

## INTRODUCTION

Oxidative stress (OS) is a well-established mediator of hyperglycemic damage to a wide range of tissues, i.e., neurons, retinal cells and vascular endothelium (1). Because of their high aerobic glucose metabolism rates, pancreatic  $\beta$ -cells have so far been considered victims of this hyperglycemia-induced reactive oxygen species (ROS) scenario (2), even more than other cell types, as they were reported to express low levels of some classical ROS-scavenging enzyme systems (3, 4).

In human type 2 diabetes, the concept that  $\beta$ -cell dysfunction reflects OS is supported by the following findings: nitrotyrosine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) concentrations are significantly higher in diabetic than control islets and associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (5); OS-related DNA damage is enhanced (6), NADPH-oxidase is overexpressed (7) in diabetic pancreases; *in vitro* 24h exposure of diabetic islets to the antioxidant glutathione decreases the nitrotyrosine concentration (5), suggesting that lowering islet OS might be a potential therapeutic approach to type 2 diabetes.

However, the notion that OS is pro-diabetic is not so straightforward, as evidence from transgene-expressing nonobese diabetic mice studies suggests that antioxidant enzymes e.g., metallothionein and catalase, accelerate spontaneous diabetes (8), highlighting the beneficial role of ROS. Moreover, growing evidence indicates that ROS are involved in signaling normal  $\beta$ -cell–glucose responsiveness (9, 10). Hence, to what extent the  $\beta$ -cell is able to react to enhanced or chronic ROS as encountered during type 2 diabetes, remains unknown.

The Goto–Kakizaki/Paris line (GK/Par) of the spontaneous rat type 2 diabetes model is

characterized by hyperglycemia and defective GSIS (11). Pertinently, OS markers such as 8-OHdG and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) were reported high in islets from GK rats (Japanese colony) (12). Moreover, we recently reported upregulation of pro- and anti-oxidant genes (thioredoxin-interacting protein-1 and glutathione peroxidase-1, respectively), concomitantly with inflammation in diabetic GK/Par islets (13).

This study was designed to evaluate tissue localization of OS markers and the extent to which OS contributes to  $\beta$ -cell injury in GK/Par rats, by exploring the functional susceptibility of diabetic  $\beta$ -cells (insulin secretion) to calibrated ROS exposure, intracellular mechanisms of their unexpected adaptation to OS, and time-course of this OS adaptation, taking advantage of GK/Par rat normoglycemia until weaning.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

All animal experiments were conducted on fed age-matched male GK/Par (11) and non-diabetic Wistar rats from our local colonies in accordance with accepted standards of animal care, established by the French National Center for Scientific Research. In some experiments, newborn Wistar received streptozotocin (STZ) to induce type 2 diabetes (14). All pharmacological agents, except  $^{125}\text{I}$ -labeled insulin (DiaSorin) and metaphosphoric acid (VWR Prolabo), were purchased from Sigma-Aldrich.

**Immunohistochemistry.** For HNE labelling, Wistar and GK/Par rat pancreases were fixed in aqueous Bouin's solution and embedded in paraplast, according to standard procedures. For nitrotyrosine labelling, pancreases were frozen in *n*-hexane on dry ice-chilled alcohol (13). Immunohistochemistry used: 1) rabbit anti-mouse nitrotyrosine (Upstate) and anti-Ig horseradish peroxidase detection kit (BD Pharmingen) according to the manufacturers' instructions; 2) mouse anti-HNE (Japan Institute for the Control Aging), the secondary antibody (biotin-conjugated rabbit F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG, Serotec), and the Vectastin Universal ABC-AP kit (Vector), followed by the Vector Black substrate kit. CD68 and MCA967 labellings were done as previously described (13).

**Islet isolation.** Seven-day-old (D7) or 2.5-month-old adult rats were killed by decapitation and pancreatic islets were isolated in collagenase (Sigma) and then handpicked under a stereomicroscope (15).

**Insulin secretion.** Freshly isolated islets were perfused as (15) and exposed to 2.8 (G2.8) or 16.7 mmol/l glucose (G16.7) or KCl 50 mmol/l (KCl50), in the absence or presence of oxidants (50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 mmol/l STZ, or 1 mmol/l alloxan) for times indicated. For static incubations, batches of 20 or 50 freshly isolated islets were preincubated with 1 mmol/l *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) or 2 mmol/l buthionine sulfoximine (BSO) for 1 hr at 37°C in 1 ml Krebs–Ringer bicarbonate (KRB)–BSA containing 5.5 mmol/l glucose (G5.5). After washing, pretreated islets were stimulated for 30 min at 37°C in 1 ml KRB–BSA containing G2.8 or G16.7 alone or supplemented with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at different concentrations. A radioimmunoassay determined insulin secretion.

**Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ).** Rhodamine-123 (Invitrogen) fluorescence (excitation: 488 nm; emission: 530 nm) was used as an indicator of ( $\Delta\Psi_m$ ) (10). Islets were loaded with rhodamine-123 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for the last 20 min of a 1-hr preincubation in KRB–BSA containing G5.5. Then, 10 islets were perfused on the stage of an inverted fluorescent microscope (Nikon Diaphot). Carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 4  $\mu\text{mol/l}$ ) was added to uncouple mitochondria at the end of each experiment.

**ROS measurements.** Islets were loaded with the fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; Invitrogen) (4  $\mu$ mol/l) for 30 min at 37°C (10) and then rapidly frozen and stored at -80°C. Supernatant ROS content (200  $\mu$ l) was quantified with a reader (Fluostar Galaxy, BMG; excitation: 485 nm; emission: 530 nm).

**mRNA analysis.** Total RNA was isolated from islets using the RNeasy mini kit (Qiagen) and its concentration determined by optical density at 260 nm. To remove residual DNA contamination, the RNA samples were treated with RNase-free DNase (Qiagen) and purified with RNeasy mini-column (Qiagen). Total RNA (4  $\mu$ g) from each islet sample was reverse transcribed with 40 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) using random hexamer primers. The primers used were derived from rat sequences and designed using OLIGO6. Real-time quantitative PCR amplification reactions were carried out in a LightCycler 1.5 detection system (Roche) using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit (Roche). Reverse transcribed RNA (10 ng) was used as the template for each reaction. All reactions were run in duplicate with no template control. The PCR conditions were: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s. mRNA transcript levels of 4 housekeeping genes (rpl19, Tbp, cyclophilin a, 18S) were assayed; rpl19 was retained for normalization of other transcripts.

**Glutathione and  $\alpha$ -tocopherol measurements.** To measure glutathione, red blood cells (RBC, 50  $\mu$ l) were mixed with 1% EDTA/5% metaphosphoric acid (1:5 v/v; 450  $\mu$ l), and 100 or 200 islets were mixed with 5% metaphosphoric acid (300  $\mu$ l). After centrifugation (3000 g, 10 min, 4°C), reduced glutathione (GSH) and its oxidized form (GSSG) were identified in supernatants by reverse-phase HPLC with electrochemical detection (16). Results are expressed as mmol/l of RBC or  $\mu$ mol/g of islet proteins. Total glutathione content, referred to as "equivalent GSH" (Eq GSH), is the sum of GSH and doubled GSSG concentrations (2GSH $\rightarrow$ GSSG). The glutathione redox state is: ([reduced form]/[total forms])  $\times$  100, with [total forms] = [oxidized form]+[reduced form].  $\alpha$ -Tocopherol was determined, as above, in heparinated plasma (100  $\mu$ l) extracted with 2-propanol (400  $\mu$ l) (17). Results are expressed as  $\mu$ mol of plasma.

**Data presentation and statistical analysis.** Variations of  $\Delta\Psi_m$  are presented as fluorescence changes over the basal level (G2.8). Integrated elevation above baseline value ( $\Delta$ Ins (AUC for insulin secretion), in ng/10 islets) was used to quantitate insulin response. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses used an unpaired Student's *t* test or ANOVA as appropriate. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

**OS markers in diabetic GK/Par rats.** Immunohistochemistry on diabetic GK/Par pancreases (Fig. 1) showed, unlike Wistar, the presence of nitrotyrosine and HNE labelling, which identify ROS and lipid peroxidation, respectively. Marker-positive cells were predominantly localised at the GK/Par islet periphery or along ducts and were accompanied by inflammatory infiltrates. Such markers were absent in D7 GK/Par and D7 Wistar pancreases (data not shown).

The glutathione redox state was 14.2% lower ( $p < 0.001$ ) in GK/Par RBC than Wistar (Table 1), with comparable Eq GSH contents. In D7 GK/Par RBC, Eq GSH content was half that of D7 Wistar ( $p < 0.001$ ), for comparable glutathione redox state. Plasma  $\alpha$ -tocopherol

was higher in D7 and adult GK/Par than age-matched Wistar rats, indicating that the OS in GK/Par does not result from  $\alpha$ -tocopherol deficiency. Altogether, these data showed that signs of overall OS in GK/Par rat correspond to diabetes onset.

**Resistance of diabetic GK/Par islets to deleterious ROS effects on insulin secretion.** Acute effects of different ROS-generating agents on GSIS and KCl-stimulated insulin secretion were first evaluated *in vitro*. Because GSIS by GK/Par islets had to be sufficiently high to appreciate a negative ROS impact, we used acetylcholine (ACh) to restore their GSIS (15).  $H_2O_2$  (50  $\mu$ mol/l), STZ (1 mmol/l) or alloxan (1 mmol/l) strongly blunted GSIS by Wistar islets, as assessed by insulin secretion AUC ( $\Delta$ Ins<sub>30–50min</sub>: –54%, –76% or –58%, respectively,  $p < 0.0001$ ), but none affected GK/Par GSIS (Fig. 2, *panels A and B*).

Given that mitochondria are key players in GSIS (18), changes of mitochondrial hyperpolarization ( $\Delta\Psi_m$ ) in response to high glucose were evaluated. Raising glucose from 2.8 to 16.7 mmol/l, hyperpolarized mitochondria (–50%,  $p < 0.05$ ) in Wistar islets, with FCCP depolarizing mitochondria as expected (data not shown), while GK/Par islets underwent limited hyperpolarization (Fig. 2C). Furthermore, GK/Par islets were resistant to  $H_2O_2$ -induced modification of glucose-induced mitochondrial hyperpolarization, unlike Wistar islets ( $p < 0.05$ ). Finally, to exclude the possibility that our observations were merely an artefact of the GK/Par model, we tested another type 2 diabetes model, the neonatally streptozotocin-treated rat (n-STZ) rat. The n-STZ islet secretory response to ROS was similar to that of GK/Par islets (Fig. 3).

**More AOD in diabetic GK/Par islets.** The expression of a large set of antioxidant genes involved in ROS detoxification was assessed (Fig. 4, *panels A and B*). mRNA levels of cytosolic (Sod1) and mitochondrial (Sod2) superoxide dismutases, which represent the first-line defenses against superoxide anions generated by the mitochondrial electron transfer chain (ETC), were overexpressed ( $\times 2.3$ ,  $p < 0.0001$ ; and  $\times 1.7$ ,  $p < 0.001$ , respectively) in GK/Par islets. Similarly, mRNA accumulation was increased for antioxidant enzymes involved in further reduction of superoxide-derived compounds ( $H_2O_2$ ), catalase (Cat:  $\times 1.7$ ,  $p < 0.001$ ), glutathione peroxidase-1 (Gpx1:  $\times 3.8$ ,  $p < 0.0001$ ), and enzymes such as thiol/disulfide oxidoreductases, glutaredoxin (Glx1) ( $\times 2.2$ ,  $p < 0.001$ ) and thioredoxins (Txn1  $\times 2$ ,  $p < 0.001$ ; and Txn2  $\times 1.2$ ,  $p < 0.05$ ). The expression of thioredoxin reductase (Txnrd1), necessary for NADPH-dependent reduction of thioredoxins, was also upregulated ( $\times 1.4$ ,  $p < 0.01$ ). Peroxiredoxins that catalyze  $H_2O_2$  reduction to water, using thioredoxins or glutaredoxins as physiological hydrogen donors, were also overexpressed (Prxd1:  $\times 2.6$ ,  $p < 0.0001$ ; and Prxd2:  $\times 1.4$ ,  $p < 0.05$ ). Finally, the abundance of GSH, the parameter most accurately reflecting the AOD potential, was 19% greater ( $p < 0.01$ ) in GK/Par islets (Fig. 4C), and was associated with more  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit mRNA (Gclc:  $\times 2$ ,  $p < 0.0001$ ) but less glutathione reductase (Gsr) mRNA ( $\times 0.47$ ,  $p < 0.01$ ). Because glutathione reductase regenerates GSH from GSSG, improved redox balance in diabetic GK/Par islets would make this transcript less necessary..

Because NADPH is a major substrate for GSH, thioredoxin and glutaredoxin regeneration, expressions of genes driving NADPH generation were assessed. GK/Par mRNA levels for glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6Pdx), malic enzyme-1 (Me1) and isocitrate dehydrogenase-1 (Idh1) were twice Wistar levels ( $p < 0.001$ ), while nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) levels were comparable (Fig. 4B). Thus, NADPH production might be enhanced in GK/Par islets. The gene encoding heme-oxygenase-1

(Hmox1), an antioxidant induced by supraphysiological glucose concentrations (19–21), was overexpressed 25-fold ( $p < 0.0001$ ), with no difference in non-inducible Hmox2 (Fig. 4A). The expression of transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2), which drives the expression of many above-mentioned genes (22, 23), was also overexpressed ( $\times 3.3$ ,  $p < 0.0001$ ) in GK/Par islets, together with that of uncoupling protein-2 (Ucp2:  $\times 1.9$ ,  $p < 0.0001$ ), which limits superoxide production by dissipating the proton gradient (24). All these data strongly suggest that diabetic GK/Par islets are able to protect themselves against ROS toxicity *via* AOD and/or uncoupling, contrarily to naive Wistar islets.

**Less ROS production in diabetic GK/Par islets.** GK/Par islet AOD upregulation could limit ROS content. Therefore, islet ROS contents, as assessed by CM-H<sub>2</sub>DCFDA, were evaluated over 30 min in response to G2.8 or G16.7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation by GK/Par islets at G2.8 was half that of Wistar ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5A). While glucose decreased ROS accumulation by 65% ( $p < 0.0001$ ) in Wistar (strongest effect from 2 to 5 mmol/l, data not shown), only a mild decrease was observed in GK/Par islets. At G2.8, rotenone and antimycin A (inhibitors of ETC complexes I and III, respectively) increased ROS contents in Wistar ( $p < 0.01$ ) and GK/Par islets ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 5B), with significantly higher values ( $p < 0.05$ ) in GK/Par than Wistar islets at both glucose concentrations, suggesting basal ROS content in GK/Par islets did not reflect lower activity of ETC complexes. Concomitantly, these inhibitors blunted GSIS in Wistar (–55%,  $p < 0.0001$ ) and GK/Par islets (–48%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5C). Trolox, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-scavenging water-soluble vitamin E analog, decreased ROS contents in Wistar islets (–57%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 5B), but had no impact on GK/Par islets, thereby illustrating the inefficacy of antioxidant supplementation in these islets.

**GSH biosynthesis inhibition restores activation of insulin secretion by low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level in diabetic GK/Par islets.** Physiological ROS levels were recently shown to positively signal insulin secretion (9). Here, we confirmed this mechanism in Wistar islets, as 5  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly increased (50%,  $p < 0.05$ ) their insulin secretion at G2.8 (Fig. 6A). By contrast, the ROS-signaling effect was absent in GK/Par islets (Fig. 6A), but was achieved (42%,  $p < 0.05$ ) by adding the GSH-biosynthesis inhibitor BSO to 2  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 6C). The ROS-signaling effect in Wistar  $\beta$ -cells was abolished by the GSH-inducer NAC (Fig. 6E). In G16.7, NAC decreased GSIS (without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: –38%,  $p < 0.0001$ ) by Wistar but not GK/Par islets (Fig. 6F). The same respective patterns were observed with trolox in Wistar (–53%,  $p < 0.001$ ) and GK/Par islets (Fig. 5C). As in the perfusion experiments, GK/Par islet insulin secretion was resistant to 50  $\mu\text{mol/l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, unlike Wistar islets (Fig. 6B). Moreover, endogenous ROS triggered by GSH depletion, either induced by BSO (fig. 6D) or a GSH-oxidizing agent, *tert*-butylhydroperoxide (50  $\mu\text{mol/l}$ , data not shown), was ineffective only in GK/Par islets. Taken together, these results demonstrated that excess antioxidant (notably GSH) is detrimental for insulin secretion, despite protection against ROS: such a mechanism might operate spontaneously in diabetic GK/Par islets.

**AOD upregulation in GK/Par islets after diabetes onset.** To address the potentially causative role of the diabetic environment in raising AOD, we studied D7 GK/Par islets, because hyperglycemia starts only at 1-month of age (weaning) (11). Since 12 of the 15 selected antioxidant genes were normally expressed in D7 GK/Par islets (Fig. 7, *panels A and B*), we concluded that the enhanced GK/Par AOD was mostly an adaptive response to hyperglycemia-induced OS. However, genes encoding Gsr and Gpx1 were, respectively, underexpressed ( $\times 0.12$ ,  $p < 0.001$ ) and overexpressed ( $\times 1.8$ ,  $p < 0.01$ ) in D7 GK/Par islets.



This imbalance paralleled a tendency for a lower GK/Par glutathione redox state ( $-33\%$ ,  $p=0.06$ ), with unchanged Eq GSH content (Fig. 7C), and with a five fold increased ROS content, regardless of glucose concentration ( $p<0.0001$ ) (Fig. 7D), compared with age-matched Wistar islets. In Wistar and D7 GK/Par islets, raising glucose from 2.8 to 16.7 mmol/l similarly blunted ROS contents ( $-33\%$ ,  $p<0.05$ ; and  $-32\%$ ,  $p<0.01$ , respectively) (Fig. 7D). Moreover, at G2.8 or G16.7, ROS contents were increased by rotenone and antimycin A ( $p<0.05$ ), but inhibited by trolox in D7 islets ( $p<0.05$ ) (Fig. 7E). Hence, prediabetic GK/Par islets show elevated ROS levels; AOD upregulation comes later, after diabetes onset.

## DISCUSSION

The results of this study show that diabetic GK/Par pancreases accumulate markers of OS. This accumulation was most prominent in non-endocrine cells near GK/Par islets, and was not observed in endocrine islet cells. For the first time, we demonstrated that GK/Par islet cells developed an unexpected adaptive protection to counteract chronic OS, since they were able to maintain basal ROS accumulation lower than in non-diabetic islet cells, due to induction of AOD. Finally, it is proposed that such islet AOD upregulation might contribute to GK/Par  $\beta$ -cell secretory dysfunction (Fig. 8).

**Enhanced OS within diabetic GK/Par pancreases.** As in diabetic patients (2, 6), GK/Par rats exhibited systemic OS, reflected by decreased glutathione redox status in RBC. Moreover, immunohistochemistry revealed that some non-endocrine cells within the GK/Par pancreases accumulated oxidative products. While no HNE-adduct was detectable in prediabetic D7 GK/Par pancreases, HNE labelling was located close to vascular areas in diabetic GK/Par pancreases, as previously described in *db/db* mice (26). HNE-modified proteins accumulation as a function of age in the GK rat pancreases (Japanese colony) was reported to correlate to hyperglycemia duration (12). Macrophages and granulocytes infiltrate around/within GK/Par islets after diabetes onset (13). Here, some nitrotyrosine-positive cells were found among inflammatory infiltrates in diabetic GK/Par pancreases, while these cells were undetectable in D7 GK/Par pancreases (data not shown). Interestingly, similar localization within/around islets was also described in NOD mouse (27) and type 2 diabetic humans (28), and it is known that pro-inflammatory cytokine activities, like those of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , involve ROS generation (29).

**Resistance of diabetic GK/Par islets to ROS-induced suppression of GSIS and enhanced AOD.** Because our data indicated an OS environment surrounding diabetic GK/Par  $\beta$ -cells, the acute effects of several oxidative stressors were tested *in vitro*; none of them had an effect on GK/Par islet GSIS, unlike Wistar islets. This remarkable ability to resist against deleterious ROS, entails a heightened ability to dissipate free radical-induced stress. The effect of BSO, an inhibitor of GSH biosynthesis, upon GSIS, was also investigated. As expected, BSO, which lowers intra-islet GSH levels and raises endogenous islet peroxide (30), diminished Wistar islet GSIS, but had no effect on GK/Par islets, strongly suggesting that a higher glutathione redox state contributes to ROS resistance by GK/Par islets. Because the weak antioxidant status of normal  $\beta$ -cells has been considered a major feature of their poor resistance to oxidative injury (3, 4), stimulating AOD is currently considered the best way to strengthen  $\beta$ -cell resistance to OS (2, 4, 5, 30–34): this is what we found in GK/Par islets. First, their islet glutathione was entirely in the reduced state, this reflecting a lack of OS in the cellular hydrophilic compartment. Second their high islet GSH level was

associated with enhanced Gclc mRNA. This is consistent with the report that Gclc overexpression increased intra-islet GSH and partially prevented the GSIS decrease caused by ROS generated after islets exposure to IL-1 $\beta$  (29). Once synthesized, GSH serves as a substrate for glutathione peroxidase, which destroys H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipid peroxides and peroxynitrite (35). Accordingly, high Gpx1 mRNA in GK/Par islets might protect islet cells against OS (30) and limit nitrotyrosine (peroxynitrite-reaction product) formation.

Concomitantly, GK/Par islets strongly express a wide battery of crucial antioxidant genes that could contribute to the very low GSSG level. Indeed, the best protection against ROS appears to require combined overexpressions of genes encoding superoxide-inactivating isoenzymes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inactivating enzymes (Gpx1 and catalase) (31–33). This combination was especially effective in mouse islets because it protected mice against STZ-induced diabetes and limited islet nitrotyrosine accumulation (34), a pattern similar to that observed in GK/Par islets. Genes encoding for thioredoxin metabolism-related proteins and Hmox1, known to be induced in  $\beta$ -cells during OS (19–20, 23, 36–38) and protective under stressful conditions (37, 38), might also be at work in GK/Par islets. Finally, globally enhanced AOD in GK/Par islets might partly reflect the overexpression of Nrf2, a key player in the regulation of genes encoding NADPH-generating enzymes and antioxidant response genes encoding Gclc, Trx, and Hmox1 (22, 23).

**Decreased GSIS and adaptive AOD in diabetic GK/Par islets.** It is generally thought that the pathway activating insulin secretion sharply enhances endogenous ROS production, and high glucose stimulation concurs with elevated ROS production in several  $\beta$ -cell/islet models (9, 30, 39). By contrast, we, like Martens et al. (40), found that increasing glucose to 16.7 mmol/l did not raise ROS contents in Wistar islets, but rather decreased them. The contrast between these observations and data indicating the primary role of ROS generation in chronic hyperglycemia-associated  $\beta$ -cell dysfunction/death is intriguing and remains unexplained. Our data clearly showed that endogenous ROS accumulation in diabetic GK/Par islets was lower than in prediabetic islets and it remained unchanged in response to acute high glucose. Suppression of  $\beta$ -cell mitochondrial ROS formation could potentially be contributory: however, this possibility is unlikely since our data on ROS accumulation in the presence of mitochondrial complex blockers rather suggest higher ROS production in diabetic than normal islets under these conditions. Normal rat isolated  $\beta$ -cells with low metabolic responsiveness to glucose generate more mitochondrial superoxide (40) and low glucose concentrations lead to a sustained ROS production in  $\beta$ -cells (41). Because modestly decreased, normal or even slightly increased glycolytic and mitochondrial glucose oxidation rates have been reported in diabetic GK/Par rats (42–45), and as we found normal glucose oxidation rate in GK/Par islets in parallel experiments (Fradet, unpublished data), it seems improbable that decreased ROS accumulation relies on major changes in glucose sensing and metabolism. The most likely mechanism by which ROS production is blunted in diabetic GK/Par islets is *via* their raised AOD (Fig. 8).

The relationship between the ROS-induced increase of  $\beta$ -cell AOD and the impaired insulin secretion is questionable since increased  $\beta$ -cell ROS production could lead to glucose-sensor (glucokinase) inhibition (46) or suppression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity (25), with impaired GSIS in both cases. These options do not apply in fact to GK/Par islets, because their glucose-activated glycolytic flux was normal or enhanced (42, 43, Fradet, unpublished data). A more attractive hypothesis would be that defective GK/

Par GSIS results from mitochondrial uncoupling (47). That concept is supported by our findings of Ucp2 overexpression and lack of  $\Delta\Psi_m$  change in response to high glucose, along with the reported lower ATP/ADP ratio in GK/Par islets (48). This hypothesis is also consistent with the established uncoupling-dependent mechanism of protection against OS as being responsible for diminished ATP production, leading to impaired GSIS (21, 46, 49, 50) (Fig. 8). Moreover, our observation that ROS sensing can be obtained when GK/Par islets are challenged, with low H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in the presence of BSO (as are the Wistar islets in the absence of BSO), also supports the notion that the enhanced AOD are detrimental for insulin secretion.

**Adaptive increase of AOD and chronic diabetic environment in GK/Par islets.** As previously mentioned, after diabetes onset in GK/Par rats,  $\beta$ -cells are exposed *in vivo* to chronic inflammation and therefore to a complex combination of ROS/NO/cytokines (51), first at the islet periphery before progressing into the islets (13). Also nitrotyrosine-/HNE-modified protein accumulation in peri-islet structures, inducible nitric oxide synthase overexpression, together with nuclear factor-kappa B subunit p65 transactivation (Lacraz, unpublished data) and overexpression of various stress genes (especially Hmox1), were time-correlated with diabetes exposure. Consistent with the GK/Par scenario, exposure of INS-1 cells or mouse islets to HNE markedly increased AOD, including mRNA of Nrf2-targeted genes, and depressed GSIS (10). Moreover, chronic hyperglycemia is known to be a major cause of islet OS, as assessed by HNE and nitrotyrosine markers in diabetic mice (26, 27). Furthermore, islet mRNA levels of some stress/AOD genes were enhanced by supraphysiological glucose levels *in vitro* (19) or *in vivo* in pancreatectomized rats, but were reversed after glycemia normalization (20, 21). The GK/Par islet model fits well with these models of OS adaptation, as it showed upregulation of most stress genes and antioxidant molecule (GSH) only after diabetes onset. However, the contribution of the prediabetic period is probably also determinant for adaptation because of ROS accumulation in D7 GK/Par islets. The reason for this deserves further investigation, but might be linked to GK lipid anomalies (52). For example, non-esterified fatty acid-induced ROS production was at play in situations triggering lipid overload in  $\beta$ -cells (53).

Finally, the low islet functional susceptibility to ROS exposure we found in another type 2 diabetes model, the n-STZ-treated rat, strengthens the possibility that chronic hyperglycemia promotes  $\beta$ -cell self-adaptation to OS. Moreover, our study shows that the possibility for eukaryotic cells to acquire tolerance to lethal ROS doses by prior exposure to sublethal doses (54, 55) is also operative under pathological conditions such as spontaneous diabetes.

## REFERENCES

1. Brownlee M. (2001) *Nature* **414**, 813–820
2. Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., and Poitout V. (2004) *Diabetes* **53(Suppl 1)**, S119–S124
3. Lenzen S., Drinkgern J., and Tiedge M. (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 463–466
4. Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. (1997) *Diabetes* **46**, 1733–1742
5. 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) *Diabetes* **54**, 727–735
6. Sakuraba H., Mizukami H., Yagihashi N., Wada R., Hanyu C., and Yagihashi S. (2002) *Diabetologia* **45**, 85–96
7. Marchetti P., Del Guerra S., Marselli L., Lupi R., Masini M., Pollera M., Bugliani M., Boggi U., Vistoli F., Mosca F., and Del Prato S. (2004) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 5535–5541
8. Li X., Chen H., and Epstein P.N. (2006) *Diabetes* **55**, 1592–1604
9. Pi J., Bai Y., Zhang Q., Wong V., Floering L.M., Daniel K., Reece J.M., Deeney J.T., Andersen M.E., Corkey B.E., and Collins S. (2007) *Diabetes* **56**, 1783–1791
10. Bindokas V.P., Kuznetsov A., Sreenan S., Polonsky K.S., Roe M.W., and Philipson L.H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 9796–9801
11. Portha B., Giroix M.-H., Serradas P., Gangnerau M.-N., Movassat J., Rajas F., Bailbe D., Plachot C., Mithieux G., and Marie J.-C. (2001) *Diabetes* **50(Suppl 1)**, S89–S93
12. Ihara Y., Toyokuni S., Uchida K., Odaka H., Tanaka T., Ikeda H., Hiai H., Seino Y. and Yamada Y. (1999) *Diabetes* **48**, 927–932
13. Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J.-C., Gangnerau M.-N., Coulaud J., Rickenbach K., Dolz M., Halban P., Portha B., and Serradas P. (2006) *Diabetes* **55**, 1625–1633
14. Portha B., Movassat J., Cuzin-Tourrel C., Bailbe B., Giroix M.-H., Serradas P., Dolz M., and Kergoat M. (2007) *Animal models of diabetes*, Shafrir R (ed). Taylor and Francis Ltd, London, pp 221–248
15. Dolz M., Bailbé D., Giroix M.-H., Calderari S., Gangnerau M.-N., Serradas P., Rickenbach K., Irminger J.-C., and Portha B. (2005) *Diabetes* **54**, 3229–3237
16. Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I., Hine R.J., and James S.J. (1999) *J. Nutr. Biochem.* **10**, 490–497
17. Galinier A., Carriere A., Fernandez Y., Caspar-Bauguil S., Periquet B., Periquet A., Penicaud L., and Casteilla L. (2006) *FEBS Lett.* **580**, 6391–6398
18. Maechler P., Jornot L., and Wollheim C.B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 27905–27913
19. Jonas J.-C., Guiot Y., Rahier J., and Henquin J.C. (2003) *Diabetologia* **46**, 1234–1244
20. Laybutt D.R., Kaneto H., Hasenkamp W., Grey S., Jonas J.-C., Sgroi D.C., Groff A., Ferran C., Bonner-Weir S., Sharma A., and Weir G.C. (2002) *Diabetes* **51**, 413–423
21. Laybutt D.R., Glandt M., Xu G., Ahn Y.B., Trivedi N., Bonner-Weir S., and Weir G.C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2997–3005
22. Kwak M.K., Wakabayashi N., Itoh K., Motohashi H., Yamamoto M., and Kensler T.W. (2003) *J Biol Chem* **278**, 8135–8145
23. Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M., and Cook J.L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26071–26078
24. Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., and Brand M.D. (2002) *Nature* **415**, 96–99
25. Sakai K., Matsumoto K., Nishikawa T., Suefuji M., Nakamaru K., Hirashima Y., Kawashima J., Shirohani T., Ichinose K., Brownlee M., and Araki E. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 216–222
26. Shao J., Iwashita N., Ikeda F., Ogihara T., Uchida T., Shimizu T., Uchino H., Hirose T., Kawamori R., and Watada H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**, 1224–1233
27. Emre Y., Hurtaud C., Karaca M., Nubel T., Zavala F., and Ricquier D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19085–19090
28. Hayden M.R., Sowers J.R. (2007) *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 891–910
29. Tran P.O., Parker S.M., LeRoy E., Franklin C.C., Kavanagh T.J., Zhang T., Zhou H., Vliet P., Oseid E., Harmon J.S., and Robertson R.P. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 53988–53993
30. Tanaka Y., Tran P.O., Harmon J., and Robertson R.P. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12363–12368
31. Tiedge M., Lortz S., Munday R., Lenzen S. (1998) *Diabetes* **47**, 1578–1585
32. Lortz S., Tiedge M. (2003) *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 683–688

33. Mysore T.B., Shinkel T.A., Collins J., Salvaris E.J., Fiscaro N., Murray-Segal L.J., Johnson L.E., Lepore D.A., Walters S.N., Stokes R., Chandra A.P., O'Connell P.J., d'Apice A.J., and Cowan P.J. (2005) *Diabetes* **54**, 2109–2116
34. Chen H., Li X., and Epstein P.N. (2005) *Diabetes* **54**, 1437–1446
35. Sies H., Sharov V.S., Klotz L.O., and Briviba K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27812–27817
36. Bast A., Wolf G., Oberbäumer I., and Walther R. (2002) *Diabetologia* **45**, 867–876
37. Hotta M., Tashiro F., Ikegami H., Niwa H., Ogihara T., Yodoi J., and Miyazaki J. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 1445–1451
38. Ye J., and Laychock S.G. (1998) *Endocrinology* **139**, 4155–4163
39. Krauss S., Zhang C.Y., Scorrano L., Dalgaard L.T., St-Pierre J., Grey S.T., and Lowell B.B. (2003) *J. Clin. Invest.* **112**, 1831–1842
40. Martens G.A., Cai Y., Hinke S., Stangé G., Van de Castele M., and Pipeleers D. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 20389–20396
41. Rutter G.A., Da Silva Xavier G., and Leclerc I. (2003) *Biochem J* **375**, 1–16
42. Giroix M.-H., Sener A., Portha B., and Malaisse W.J. (1993) *Diabetologia* **36**, 305–309
43. Giroix M.-H., Vesco L., and Portha B. (1993) *Endocrinology* **132**, 815–822
44. Ling Z.C., Efendic S., Wibom R., Abdel-Halim S.M., Ostenson C.G., Landau B.R., and Khan A. (1998) *Endocrinology* **139**, 2670–2675
45. Hughes S.J., Faehling M., Thorneley C.W., Proks P., Ashcroft F.M., and Smith P.A. (1998) *Diabetes* **47**, 73–81
46. Kajimoto Y., Matsuoka T., Kaneto H., Watada H., Fujitani Y., Kishimoto M., Sakamoto K., Matsuhisa M., Kawamori R., Yamasaki Y., and Hori M. (1999) *Diabetologia* **42**, 1417–1424
47. Zhang C.Y., Baffy G., Perret P., Krauss S., Peroni O., Grujic D., Hagen T., Vidal-Puig A.J., Boss O., Kim Y.B., Zheng X.X., Wheeler M.B., Shulman G.I., Chan C.B., and Lowell B.B. (2001) *Cell* **105**, 745–755
48. Giroix M.-H., Sener A., Bailbe D., Leclercq-Meyer V., Portha B., and Malaisse W.J. (1993) *Biochem. Med. Metab. Biol.* **50**, 301–321
49. Chan C.B., De Leo D., Joseph J.W., McQuaid T.S., Ha X.F., Xu F., Tsushima R.G., Pennefather P.S., Salapatek A.M., and Wheeler M.B. (2001) *Diabetes* **50**, 1302–1310
50. Li L.X., Skorpen F., Egeberg K., Jorgensen I.H., and Grill V. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 273–277
51. Ehses J.A., Calderari S., Irminger J.-C., Serradas P., Giroix M.H., Egli A., Portha B., Donath M.Y., and Homo-Delarche F. (2007) *Curr. Immunol. Rev.* **3**, 216–232
52. Argoud K., Wilder S.P., McAteer M.A., Bihoreau M.T., Ouali F., Woon P.Y., Wallis R.H., Ktorza A., and Gauguier D. (2006) *Diabetologia* **49**, 2679–2688
53. Choe S.S., Choi A.H., Lee J.W., Kim K.H., Chung J.J., Park J., Lee K.M., Park K.G., Lee I.K., and Kim J.B. (2007) *Diabetes* **56**, 1534–1543
54. Temple M.D., Perrone G.G., and Dawes I.W. (2005) *Trends Cell. Biol.* **15**, 319–326
55. Seo Y.J., Lee J.W., Lee E.H., Lee H.K., Kim H.W., and Kim Y.H. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1272–1281

## FOOTNOTES

**Acknowledgements.** These studies were funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, the EFSD/MSD European Foundation, MERCK-SERONO, and NEB Research Foundation. The authors thank Pr. X. Lerverve for stimulating discussions. G. Lacraz and F. Figeac received a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Ecole Doctorale 394, Physiologie/ Physiopathologie). Some of these data were presented at the 43rd European Association for the Study of Diabetes Meeting, Amsterdam, The Netherlands, September 2007 and at the 66th American Diabetes Association Meeting, Washington, D.C., USA, June 2006.

**The abbreviations used are:** ACh, acetylcholine; AOD, antioxidant defenses; AU, arbitrary units; BSO, buthionine sulfoximine; Cat, catalase; CM-H<sub>2</sub>DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester; D7, day 7; Eq GSH, equivalent glutathione; ETC, electron transfer chain; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; G6pdx, glucose-6-phosphate dehydrogenase; Gclc,  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit; Glrx, glutaredoxin; Gpx, glutathione peroxidase; GSH, reduced glutathione; GSIS, glucose-stimulated insulin secretion; Gsr, glutathione reductase; GSSG, oxidized glutathione; Hmox, heme oxygenase; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; Idh1, isocitrate dehydrogenase-1; KRB, Krebs–Ringer bicarbonate; Me1, malic enzyme-1; NAC, *N*-acetyl-L-cysteine; Nnt, nicotinamide nucleotide transhydrogenase; Nrf2, transcription factor NF-E2–related factor 2; n-STZ, neonatally streptozotocin-treated rat; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; OS, oxidative stress; Prxd, peroxiredoxin; RBC, red blood cells; ROS, reactive oxygen species; Sod, superoxide dismutase; STZ, streptozotocin; Txn, thioredoxin; Txnrd, thioredoxin reductase; Ucp2, uncoupling protein-2;  $\Delta$ Ins, AUC for insulin secretion;  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial membrane potential.

## FIGURE LEGENDS

**Table 1. Biological characteristics of 7-day-old or 2.5-month-old male Wistar and GK/Par rats.** Glucose, insulin and  $\alpha$ -tocopherol were determined in plasma. Glutathione redox state (% of reduced glutathione (GSH)) and GSH (Eq GSH) content were determined in red blood cells (RBC). Data are means  $\pm$  SEM. Wistar,  $n=9-13$ ; GK/Par,  $n=7-9$ . <sup>a</sup> $p<0.05$  vs. age-matched Wistar group.

	7-day-old		2.5-month-old	
	Wistar	GK/Par	Wistar	GK/Par
Body weight (g)	16.0 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	384.2 $\pm$ 9.7	277.2 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>
Plasma glucose (mmol/l)	7.2 $\pm$ 0.1	7.0 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
Plasma insulin (pmol/l)	440 $\pm$ 60	160 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	840 $\pm$ 40	1000 $\pm$ 80
Plasma $\alpha$ -tocopherol ( $\mu$ mol/l)	25.2 $\pm$ 0.9	30.7 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	13.5 $\pm$ 0.6	22.0 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
RBC glutathione redox state	92.2 $\pm$ 0.6	91.0 $\pm$ 0.5	93.5 $\pm$ 1.0	80.1 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
RBC Eq GSH content (mmol/l)	71.1 $\pm$ 8.2	37.9 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	3.9 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.3

**Fig. 1. In 2.5-month-old diabetic GK/Par pancreases, nitrotyrosine and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins accumulate in the peri-islet vascular and inflammatory compartments.** Immunolabelling of nitrotyrosine or HNE-adducts (arrows) in pancreatic tissues of GK/Par and Wistar rats (**A**). An islet is encircled in each quadrant. Nitrotyrosine-positive (arrows) material was closely associated with macrophages (CD68) and granulocytes (MCA967) at the islet periphery (**B**), and in the vicinity of pancreatic ducts (**C**). Original magnification  $\times 250$ .

**Fig. 2. Diabetic GK/Par  $\beta$ -cells are resistant to oxidative stress *in vitro*.** Wistar or GK/Par islets were perfused with medium containing (in mmol/l) 2.8 glucose (G2.8), 16.7 glucose + 1 ACh (G16.7 + ACh1), G 2.8, or 50 KCl (KCl50). Vehicle or oxidative agents ( $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{mol/l}$ , alloxan 1 mmol/l, or streptozotocin (STZ) 1 mmol/l) were added as indicated (**A,B**).  $\Delta\text{Ins}$  values (insulin secretion AUC) derived from panels (**A**) and (**B**) indicated that GK/Par insulin secretion at G16.7 and KCl50 was strongly resistant to the toxic effects of all oxidative agents used, unlike Wistar. Modifications of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) induced by G16.7 in the absence (vehicle) or presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**C**). For each experiment, data were normalised to the rhodamine-123 fluorescence intensity obtained at G2.8. GK/Par islets were resistant to  $\text{H}_2\text{O}_2$  alteration on glucose-induced mitochondrial hyperpolarization. Data are the means  $\pm$  SEM of 3–6 experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group;  $^\dagger p < 0.05$  vs. vehicle in the same group.

**Fig. 3. Unlike Wistar  $\beta$ -cells, diabetic neonatally streptozotocin-treated (n-STZ) and GK/Par  $\beta$ -cells are resistant to oxidative stress *in vitro*.** The perfusion experiments are the same that those described in the legend to Fig. 2. Data are the means  $\pm$  SEM of 4–6 experiments in each group.

**Fig. 4. Antioxidant defense status was higher in diabetic GK/Par islets.** The mRNA levels for genes encoding antioxidant proteins (**A**). The mRNA levels for genes encoding proteins instrumental in the production of the antioxidant cofactor NADPH (**B**). Intra-isular reduced glutathione GSH (Eq GSH) content was higher in GK/Par than Wistar rats (**C**). Data are the means  $\pm$  SEM of 8–16 experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group.

**Fig. 5. Less reactive oxygen species (ROS) accumulated in diabetic GK/Par than Wistar islets.** ROS generation was assessed as CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$  fluorescence intensity (arbitrary units (AU)) normalised to total islet proteins in Wistar or GK/Par islets incubated at 2.8 (G2.8) or 16.7 mmol/l glucose (G16.7) (static incubation, 30 min) (**A**). The ROS experiments are the same that those described in the legend to (**A**) with blockers of the electron transfer chain complexes I (rotenone, 10  $\mu\text{mol/l}$ ) or III (antimycin A, 20  $\mu\text{mol/l}$ ), or the ROS scavenger (trolox, 1 mmol/l) (**B**). Insulin secretion values derived from experiments (**C**). Data are the means  $\pm$  SEM of 5–23 experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group;  $^\dagger p < 0.05$  vs. G 2.8 or G 16.7 for the same group;  $^\ddagger p < 0.05$  vs. G 16.7 for the same group.

**Fig. 6. The dual effect (i.e., stimulatory or inhibitory) of exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  on insulin secretion was abolished in diabetic GK/Par islets.**  $\text{H}_2\text{O}_2$  dose-response effect on insulin secretion at 2.8 (G2.8) or 16.7 mmol/l glucose (G16.7) (static incubation, 30 min) (**A,B**). The same experiments were repeated after pretreatment of islets (1h) with the reduced glutathione (GSH)-depleting agent buthionine sulfoximine (BSO, 2 mmol/l) (**C,D**) or GSH-inducing agent *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, 1 mmol/l) (**E,F**). Data are the means  $\pm$  SEM of 6–23 experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group;  $^\dagger p < 0.05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  0  $\mu\text{mol/l}$  in the same group;  $^\ddagger p < 0.05$  vs. BSO +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0  $\mu\text{mol/l}$  in the same group.  $^\S p < 0.05$  vs. NAC +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0  $\mu\text{mol/l}$  in the same group.

**Fig. 7. Antioxidant defense status tended to be lower in prediabetic GK/Par rat islets and was associated with enhanced reactive oxygen (ROS) production.** Protocols (see the legend to Fig. 5) were repeated with 7-day-old (D7) Wistar or D7 GK/Par rats. The mRNA levels for genes encoding antioxidant proteins (**A**). The mRNA levels for genes encoding proteins instrumental in the production of the antioxidant cofactor NADPH (**B**). Intra-insular reduced glutathione (Eq GSH) content tended to be decreased in D7 GK/Par rats (**C**). ROS generation was assessed as fluorescence intensity (AU) normalised by total islet proteins in D7 Wistar or D7 GK/Par islets incubated for 30 min at 2.8 (G2.8) or 16.7 mmol/l glucose (G16.7) (**D**). The ROS experiments are the same that those described in the legend to (**D**) with blockers of the electron transfer chain complexes I (rotenone, 10  $\mu$ mol/l) or III (antimycin A, 20  $\mu$ mol/l), or the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger (trolox, 1 mmol/l) (**E**). Data are the means  $\pm$  SEM of 10–28 experiments ( $n=15$ –51 animals) in each group. \* $p<0.05$  vs. age-matched Wistar group; † $p<0.05$  vs. G2.8 or G16.7 in the same group; ‡ $p<0.05$  vs. G16.7 in the same group.

**Fig. 8. Hypothetical model of diabetic GK/Par  $\beta$ -cell adaptive protection against reactive oxygen species (ROS) at basal condition.** (**A**) Intracellular glucose oxidation begins with glycolysis in the cytoplasm and continues in mitochondria to generate reducing equivalents (NADPH and FADH<sub>2</sub>) that will be passed down the electron transfer chain (ETC) (1), ultimately facilitating ATP generation *via* ATP-synthase from ADP plus P<sub>i</sub>. At normoglycemia, low insulin (ATP) demand results in moderate proton (H<sup>+</sup>) accumulation outside the mitochondrial matrix and moderate electrogenic potential ( $\Delta\Psi_m$ ) (2). As a consequence, very low ROS are generated (3). (**B**) By contrast, under chronic hyperglycemia as encountered in GK/Par  $\beta$ -cells, glycolytic flux is elevated, resulting in the accumulation of reduced NADH and FADH<sub>2</sub> cofactors, and associated acceleration of electron transport (4). As a result, the  $\Delta\Psi_m$  rises up to a point where its electrogenic potential tends to overcome the driving force of respiration-driven proton pumps (hyperpolarization) (5), ETC slows down, electrons accumulate, and more ‘random’ single electron transfer reactions from ETC components to molecular oxygen enhance ROS generation. Chronic and/or elevated ROS levels might augment expression of i) uncoupling protein-2 (UCP2), which dissipates  $\Delta\Psi_m$ , and ii) antioxidant defenses (AOD) in mitochondria (6) and cytosol (7), both of which guarantee  $\beta$ -cell self-protection against oxidative damage. Furthermore, high glucose metabolism, through elevated NAD(P)H generation (8), improves the ROS-scavenging potential. As a consequence, heightened AOD and/or mitochondrial uncoupling might directly weaken the GK/Par  $\beta$ -cell secretory function when exposed to high glucose because of insufficient ATP generation.



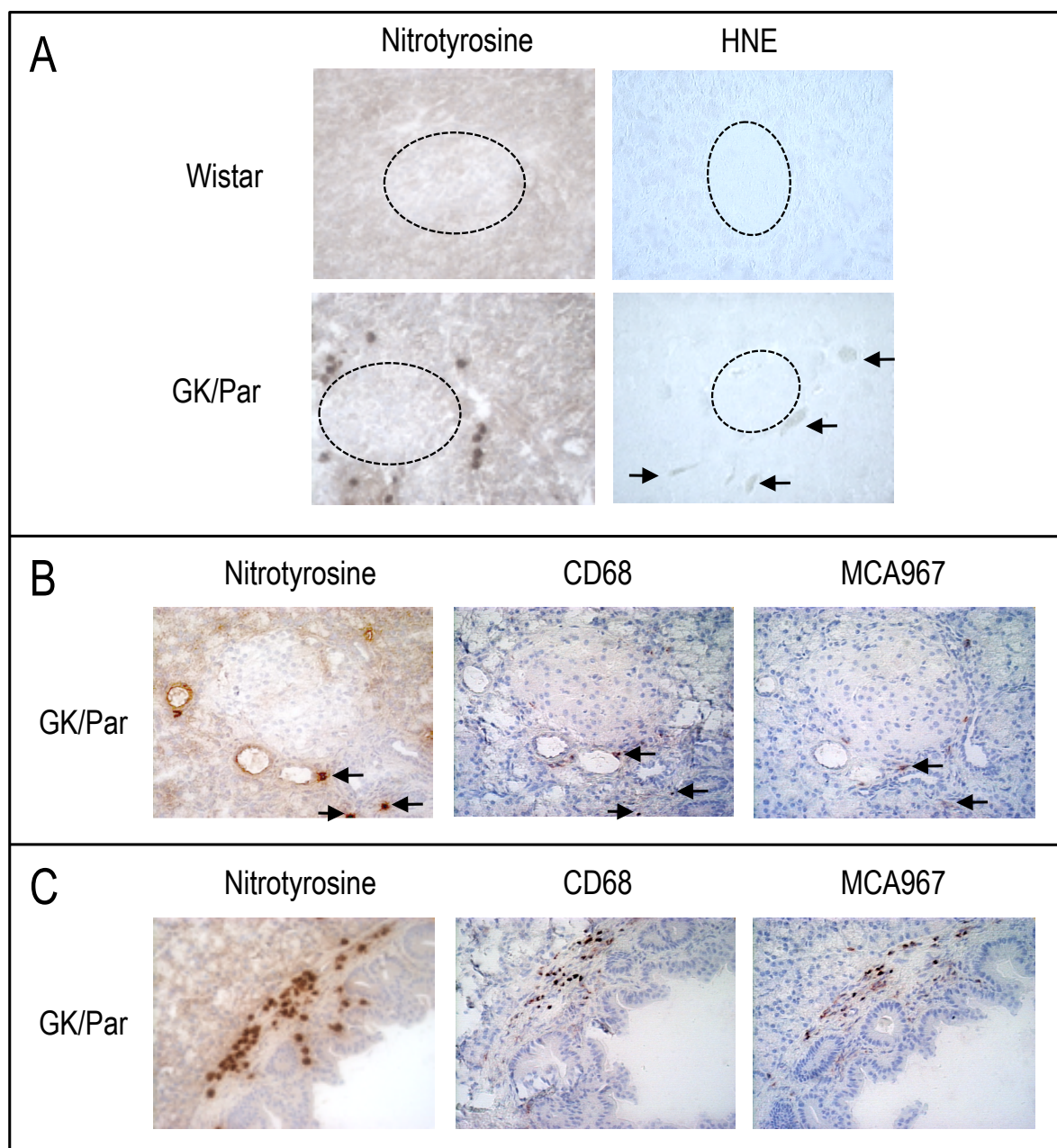


Fig. 1. In 2.5-month-old diabetic GK/Par pancreases, nitrotyrosine and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins accumulate in the peri-islet vascular and inflammatory compartments.

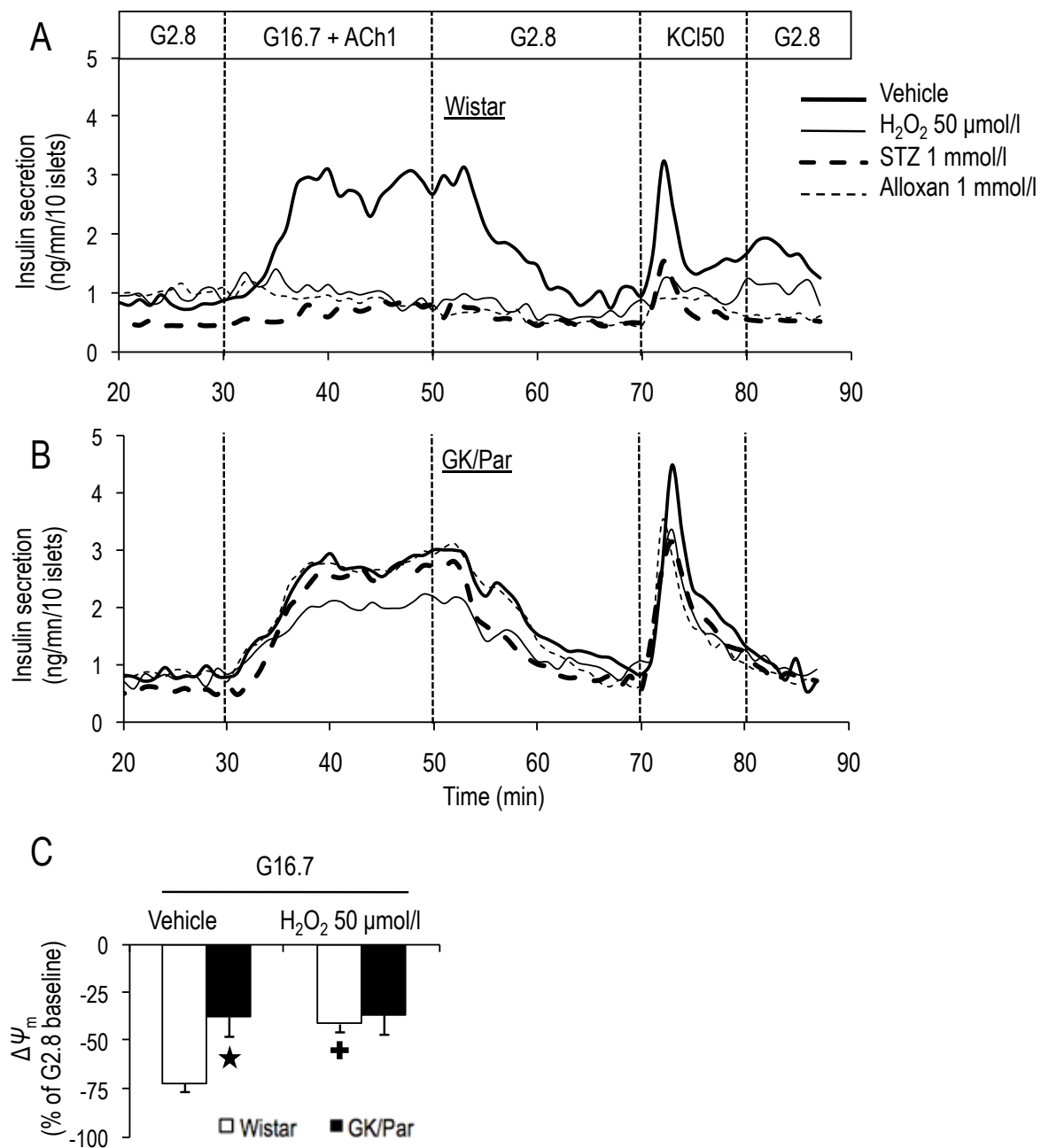


Fig. 2. Diabetic GK/Par  $\beta$ -cells are resistant to oxidative stress *in vitro*.

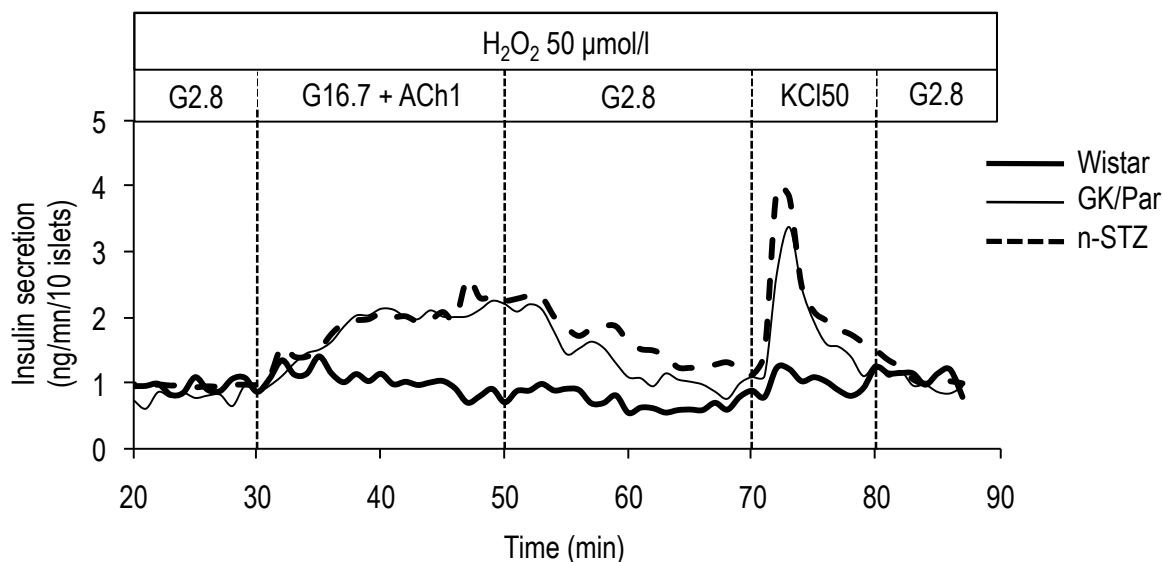


Fig. 3. Unlike Wistar β-cells, diabetic neonatally streptozotocin-treated (n-STZ) and GK/Par β-cells are resistant to oxidative stress *in vitro*.

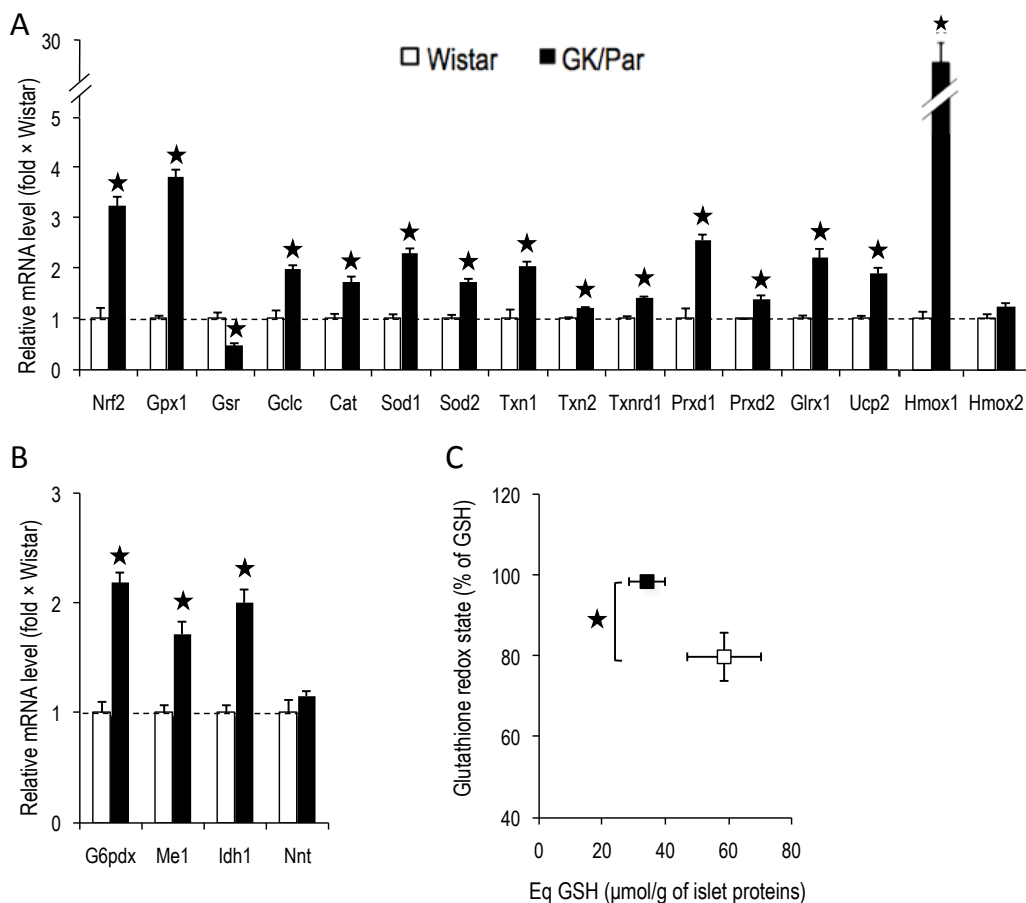


Fig. 4. Antioxidant defense status was higher in diabetic GK/Par islets.

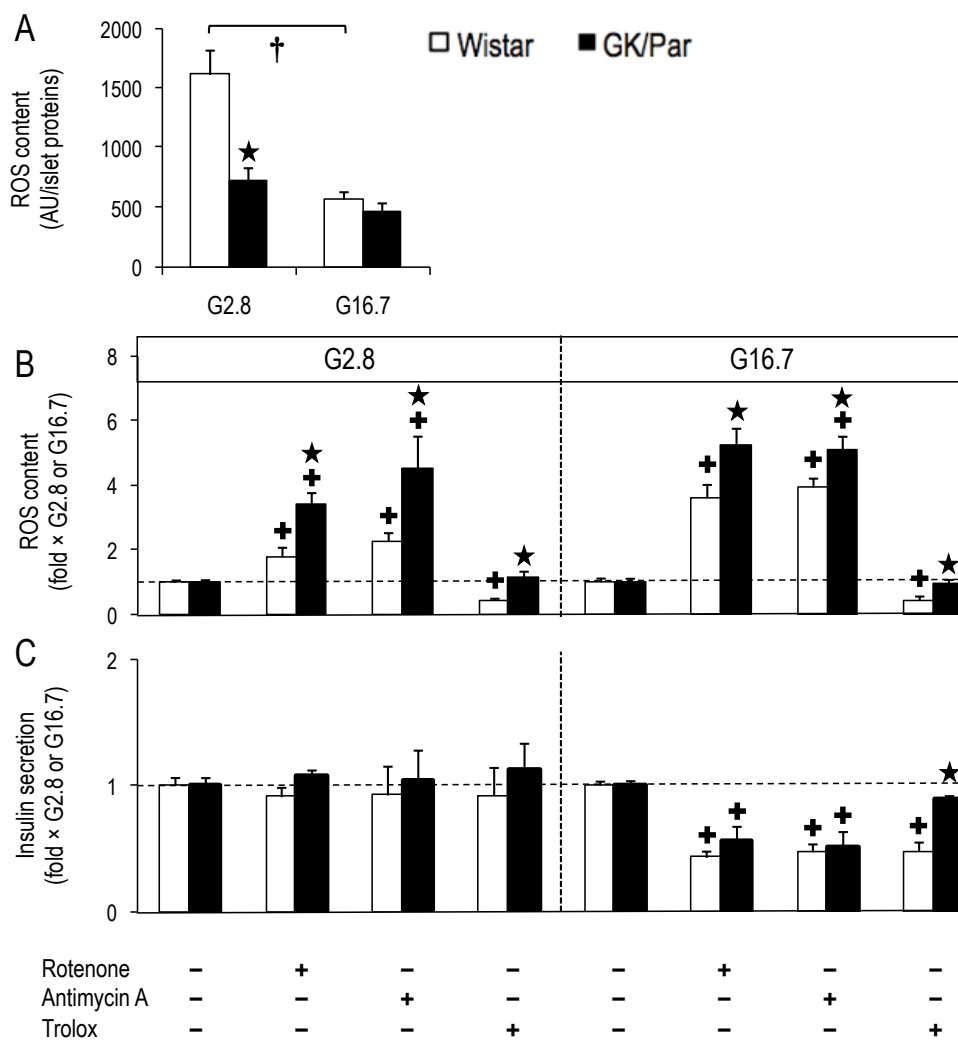


Fig. 5. Less reactive oxygen species (ROS) accumulated in diabetic GK/Par than Wistar islets.

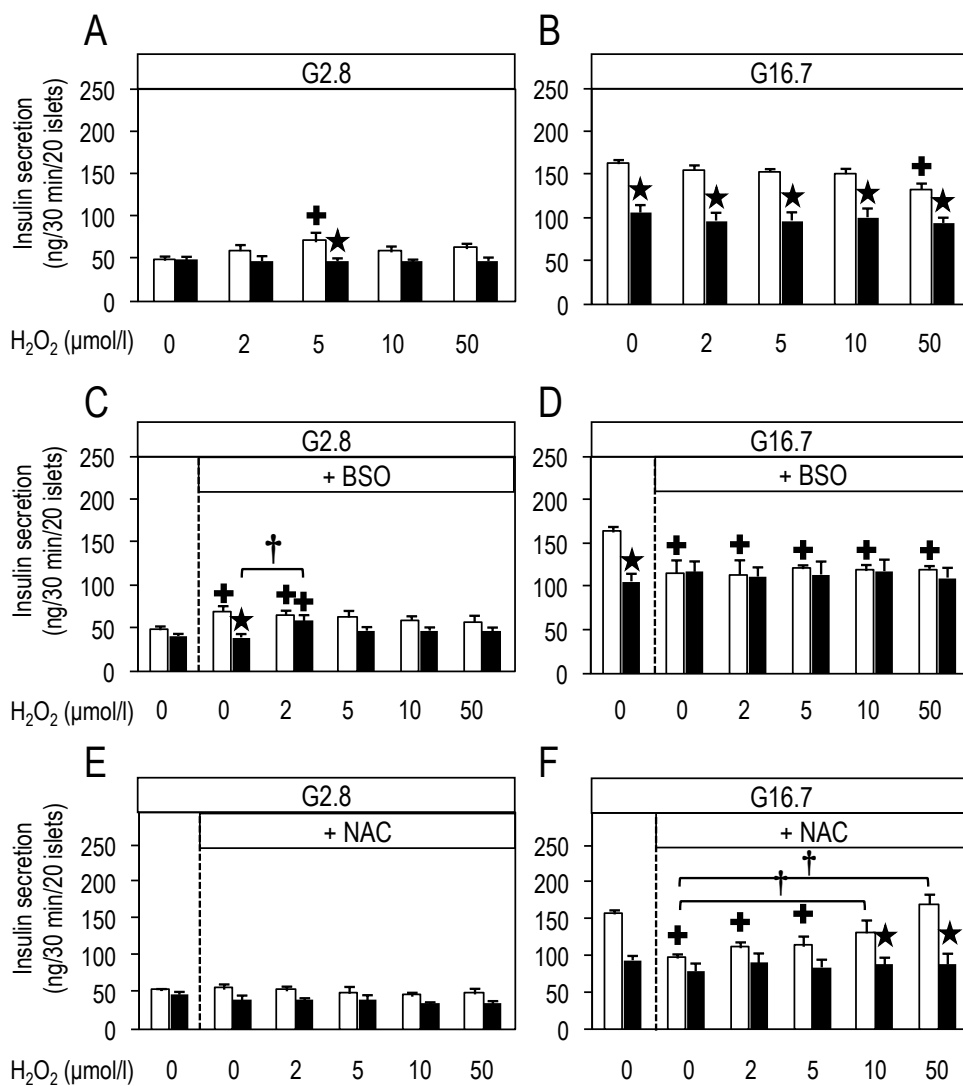


Fig. 6. The dual effect (i.e., stimulatory or inhibitory) of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on insulin secretion was abolished in diabetic GK/Par islets.

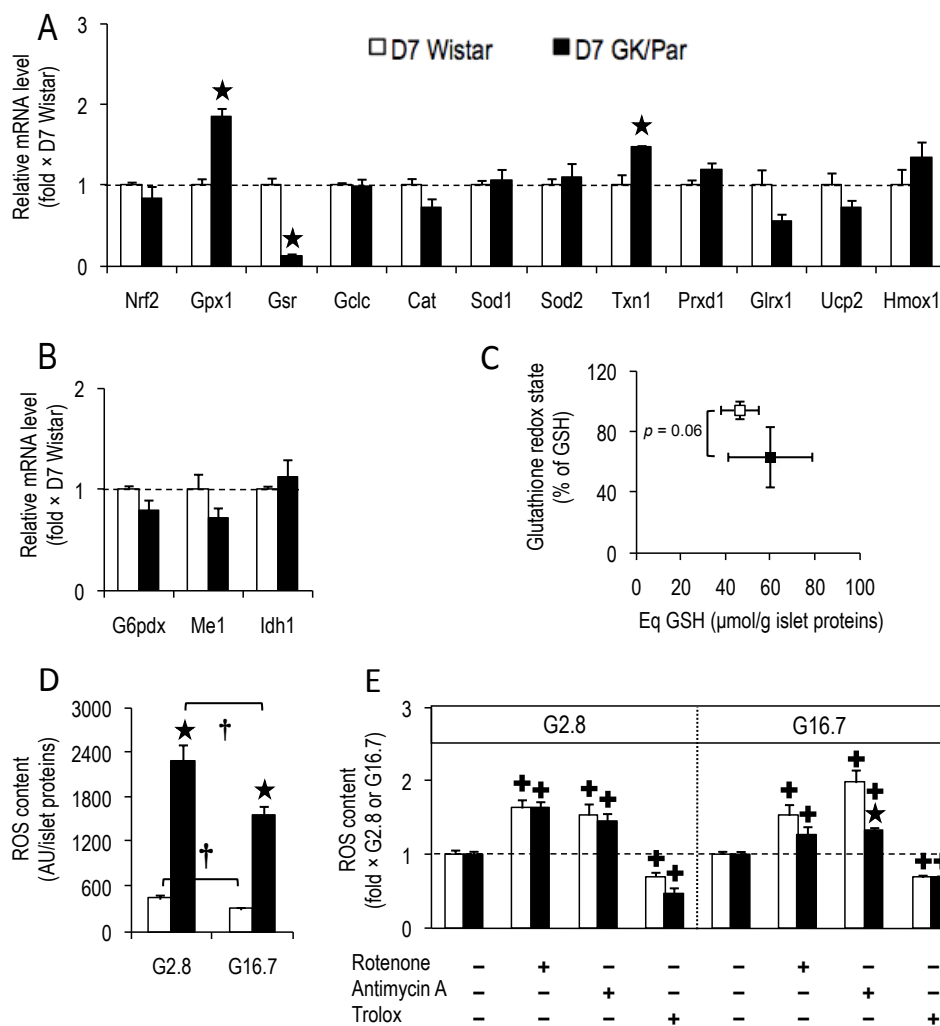


Fig. 7. Antioxidant defense status tended to be lower in prediabetic GK/Par rat islets and was associated with enhanced reactive oxygen (ROS) production.

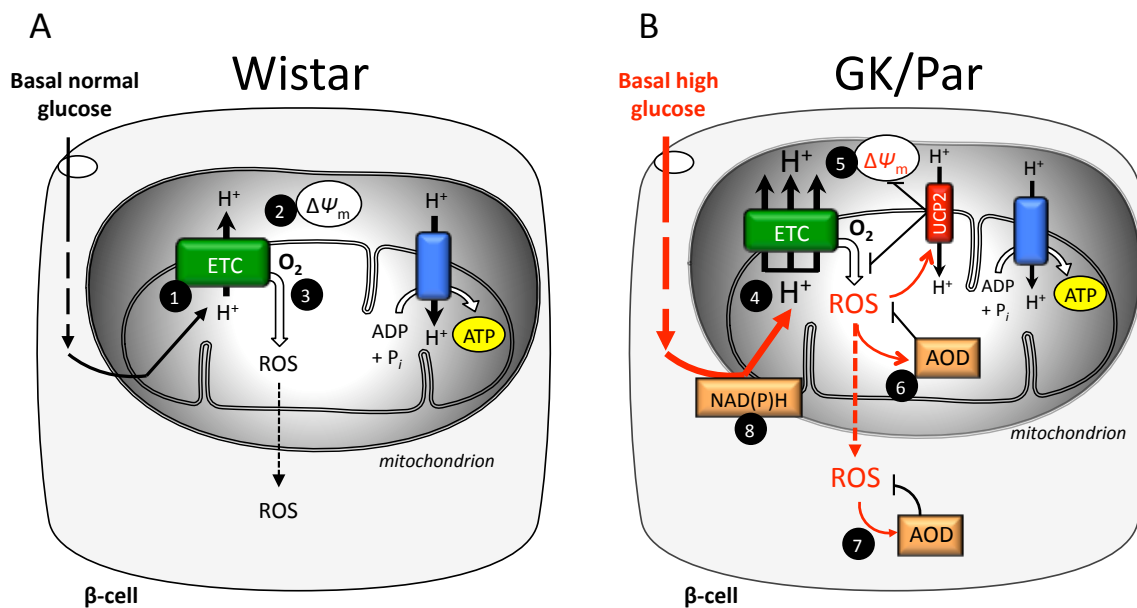
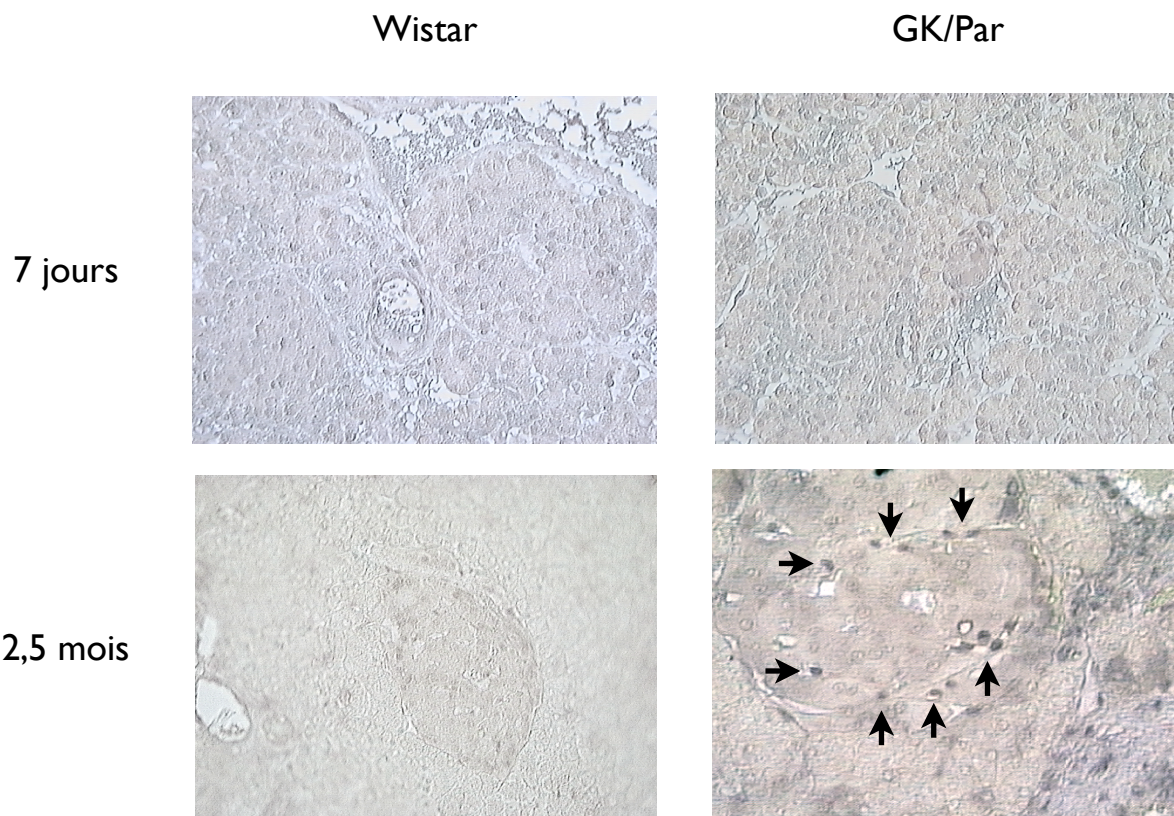


Fig. 8. Hypothetical model of diabetic GK/Par  $\beta$ -cell adaptive protection against reactive oxygen species (ROS) at basal condition.

#### 1.4. Résultats complémentaires

##### 1.4.1. Marqueur de stress oxydant de l'ADN

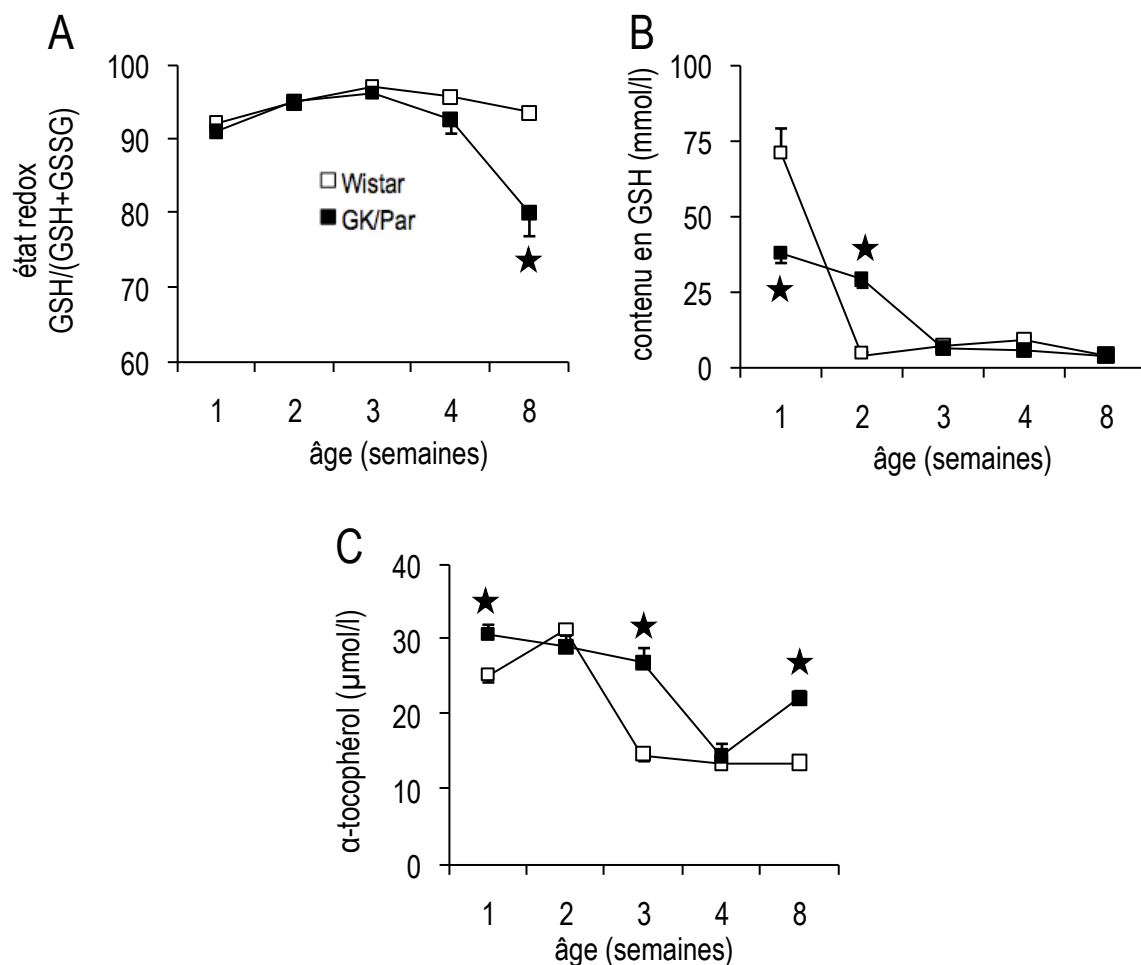
La Fig. 1 de l'Article 1 ne présente pas les résultats avec un témoin indirect de stress oxydant, marqueur de l'ADN : le 8-OHdG. La Fig. R1 montre que le marquage 8-OHdG, sur les sections pancréatiques de rats Wistar et GK/Par, présente exactement le même profil de localisation que les marquages HNE et nitrotyrosine, à savoir : (i) une absence totale de marquage à l'âge de 7 jours dans les deux groupes d'animaux ; (ii) un marquage chez l'adulte uniquement dans le groupe GK/Par ; et (iii) un marquage positif en bordure et à la périphérie des îlots.



**Fig. R1. Présence de marqueur de stress oxydant de l'ADN en bordure des îlots diabétiques GK/Par.** L'immunolocalisation a été réalisée avec un anticorps dirigé contre le 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Les sections proviennent de pancréas de rats Wistar et GK/Par âgés de 7 jours ou 2,5 mois (pour plus de détails sur la préparation des sections pancréatiques, cf. Méthodes Article 1). Grossissement  $\times 250$  (zoom numérique sur la fenêtre de l'îlot GK/Par 2,5 mois).

Au niveau circulant, nous avons également mesuré des anomalies du redox du glutathion (proportion de GSH) après le sevrage ; la diminution du ratio (GSH/[GSH/GSSG]) est significative à 8 semaines et certainement avant (entre 4 et 8 semaines) (Fig. R2A). Parallèlement, les concentrations plasmatiques en  $\alpha$ -tocophérol sont augmentées avant et après le sevrage (Fig. R2C).

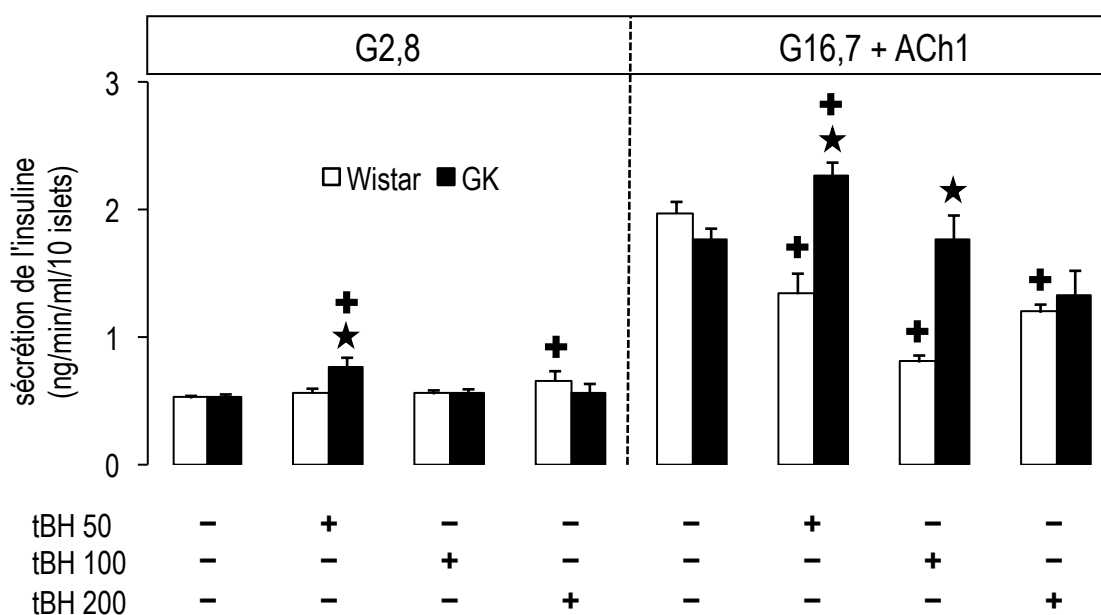




**Fig. R2. Marqueurs circulants de stress oxydant en fonction de l'âge chez les rats Wistar et GK/Par.** La glutathion érythrocytaire, sous ses formes réduite (GSH) et oxydée (GSSG), a été déterminé par HPLC en phase reverse avec détection électrochimique. La concentration en  $\alpha$ -tocophérol a été déterminée dans le plasma. Pour plus de détails sur la préparation des échantillons, cf. Méthodes Article 1. Wistar, n=7–9; GK/Par, n=8–13 ; \* $p < 0.05$  vs. Wistar.

#### 1.4.2. Résistance $\beta$ -cellulaire dans d'autres conditions expérimentales

Le *tert*-butylhydroperoxide (tBH) est un agent pro-oxydant connu pour oxyder le GSH et inhiber l'oxydation du glucose et l'ISSG (Malaisse et al., 1982). En condition d'incubation statique, alors que le tBH, à partir d'une concentration de 50  $\mu\text{mol/l}$  (jusqu'à 200  $\mu\text{mol/l}$ ), inhibe l'ISSG des îlots Wistar, il n'affecte pas ce paramètre dans le groupe GK/Par, excepté à une dose de 50  $\mu\text{mol/l}$  à laquelle il stimule l'ISSG (Fig. R3). L'absence d'effets de la STZ sur l'ISSG par les îlots GK/Par, en condition de périfusion, est exposée dans l'Article 1. En incubation statique, cette toxine se montre également inefficace dans les îlots GK/Par (Table R1).



**Fig. R3. Effets du *tert*-butylhydroperoxide (tBH) sur la sécrétion de l'insuline par les îlots Wistar et GK/Par.** Suite à une préincubation pendant 1h à glucose 5,5 mmol/l, des îlots frais de rats Wistar et GK/Par ont été incubés, par séries de 10 dans des cupules pendant 30 minutes, en présence de glucose à 2,8 ou 16,7 mmol/l + acétylcholine (ACh) à 1 mmol/l, et éventuellement de tBH à différentes concentrations (en  $\mu\text{mol/l}$ ). \* $p < 0.05$  vs. Wistar ; + $p < 0,05$  vs. véhicule.

[glucose]	condition	Wistar	GK/Par
G2,8	véhicule	0,49 ± 0,04	0,49 ± 0,03
G16,7	véhicule	2,27 ± 0,08	1,99 ± 0,23
G16,7 + Ach1	STZ 1	1,73 ± 0,09 <sup>+</sup>	1,88 ± 0,14
G16,7 + Ach1	STZ 2	1,01 ± 0,01 <sup>+</sup>	1,91 ± 0,14 <sup>*</sup>

**Table. R1. Effets de la streptozotocine (STZ) sur la sécrétion de l'insuline par les îlots Wistar et GK/Par.** Suite à une préincubation pendant 1h à glucose 5,5 mmol/l, des îlots frais de rats Wistar et GK/Par ont été incubés, par séries de 10 dans des cupules pendant 30 minutes, en présence de glucose à 2,8 ou 16,7 mmol/l + de l'acétylcholine (ACh) à 1 mmol/l, et éventuellement de STZ à différentes concentrations (en mmol/l). Les valeurs de sécrétion de l'insuline sont indiquées en ng/min/ml/10 îlots. \* $p < 0.05$  vs. Wistar ; + $p < 0,05$  vs. véhicule.

### 1.4.3. Conclusions et points de discussion

De prime abord, et contrairement aux idées reçues, la cellule  $\beta$  diabétique GK/Par n'est pas plus sensible, du moins sur le plan fonctionnel, aux attaques des ERO. Au contraire, nos données montrent une résistance remarquable à ces entités. Ce phénomène reflète probablement une adaptation de la cellule  $\beta$  diabétique visant à contrecarrer le stress oxydant, puisqu'il existe une corrélation chronologique entre l'installation du diabète et l'activation de la presque totalité des gènes de défenses antioxydantes et de découplage (Article 1, Fig. 8). Il est possible que ces mécanismes adaptatifs interviennent dans la dysfonction  $\beta$ -cellulaire, une fois le diabète déclaré ; ce point doit être approfondi. Dans un autre modèle de DT2, le rat traité à la naissance à la STZ, nous avons observé le même phénomène de résistance fonctionnelle au stress oxydant (Article 1, Fig. 3). Il est probable que ces animaux non-spontanément diabétiques se défendent par des mécanismes antioxydants similaires. Nous proposons donc l'idée que la cellule  $\beta$  diabétique montre une réponse défensive à l'environnement pro-oxydant lié à l'hyperglycémie chronique. L'étiologie des anomalies précoces de la balance redox du glutathion assorties d'une hyperproduction d'ERO, dans l'îlot prédiabétique GK/Par, reste encore indéterminée. Cependant, l'environnement prédiabétique voire foetal (facteurs épigénétiques ?) joue probablement un rôle pro-oxydant, contribuant aussi au renforcement antioxydant de l'îlot.

## 2. Résistance à l'apoptose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induite des cellules β diabétiques de rats GK/Par via une réponse adaptative dépendante de l'AMPc

*Article 2 : Diabetic GK/Par rat β-cells are spontaneously protected against oxidative stress induced-apoptosis. A cAMP-dependent adaptive response.*

### 2.1. Questions posées

L'une des hypothèses émises à l'issue de notre premier Article était que, dans les îlots diabétiques GK/Par, la contrepartie des effets potentiellement néfastes des défenses antioxydantes sur le ERO-*sensing* soit une préservation de la masse β-cellulaire. Cette hypothèse était d'autant plus séduisante, dans ce modèle, que notre équipe a précédemment rapporté que l'apoptose des cellules β *ex vivo* sur des sections pancréatiques est comparable entre les rats GK/Par et Wistar (*Movassat et Portha, 1999*). Les questions posées ont donc été les suivantes : les îlots GK/Par peuvent-ils résister au stress oxydant lorsque leur survie est en jeu ? Et si oui, par quel(s) mécanisme(s) anti-apoptotique(s) ? Dans le deuxième volet de ce travail de thèse, nous avons donc étudié les effets, à long terme, d'une exposition aiguë à un stress oxydant calibré (identique à la première étude : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μmol/l, 30 min), après 24h de culture.

### 2.2. Résultats principaux

#### 2.2.1. L'apoptose β-cellulaire est normale dans les îlots diabétiques GK/Par fraîchement isolés

L'apoptose n'avait jamais été mesurée dans les îlots GK/Par fraîchement isolés à la collagénase. Nos résultats n'ont pas révélé de différence entre les rats témoins et les rats diabétiques (Article 2, Fig. 1). En revanche, nous avons mis en évidence des anomalies significatives du profil d'expression des gènes pro-/anti-apoptotiques. Parmi les principaux gènes pro-apoptotiques, notons la surexpression de casp3 et -9, p53, Fas et FasL dans les îlots GK/Par fraîchement isolés. En revanche, des gènes anti-apoptotiques Bcl2 et A20 sont aussi activés dans les îlots GK/Par après isolement. Par ailleurs, d'autres gènes liés au stress oxydant, à l'inflammation, à l'hypoxie et à la dé-différenciation, sont surexprimés : Nox2, Cox2, iNos, Hif1α, et c-myc.

#### 2.2.2. L'apoptose β-cellulaire est activée dans les îlots diabétiques GK/Par cultivés

Après 24h de culture à glucose 10 mmol/l, les cellules β GK/Par présentent des taux d'apoptose quatre fois augmentés, par rapport aux témoins. Parallèlement, nous avons montré que l'ensemble des gènes pro-/anti-apoptotiques sélectionnés, ainsi que les gènes du stress oxydant (décrits dans le premier manuscrit), restent tous surexprimés dans le groupe GK/Par (Article 2, Fig. 2). Un moyen d'évaluer l'effet propre du stress occasionné par la mise en culture revient à comparer les niveaux d'expression génique des îlots cultivés à ceux des îlots frais (tous les échantillons de cDNA ayant été passés dans un même *run* de PCR quantitative en temps réel, pour un gène donné) (Article 2, Fig. S1). Ceci nous a permis d'identifier quels sont les gènes spécifiquement activés par la culture dans un même groupe de rat. De manière identique entre les îlots Wistar et GK/Par, la culture augmente l'expression des gènes antioxydants, ainsi que iNos et Hif1α. En revanche, seuls les îlots GK/Par présentent une forte induction (×40) de FasL.

### 2.2.3. Les cellules $\beta$ diabétiques GK/Par sont résistantes à l'induction de l'apoptose par l' $H_2O_2$

Tandis que l' $H_2O_2$  augmente l'apoptose d'un facteur trois dans les cellules  $\beta$  de rats Wistar, l'agent pro-oxydant est sans effet dans le groupe GK/Par (Article 2, Fig. 3). Cette résistance est spécifique des cellules  $\beta$ , car le nombre de cellules apoptotiques non- $\beta$  (insuline-négative) est augmenté en présence d' $H_2O_2$  dans le groupe GK/Par, par rapport au Wistar.

### 2.2.4. L'AMPc protège les cellules $\beta$ diabétiques GK/Par de la mort cellulaire

Il a été montré que l'AMPc protège les cellules  $\beta$  normales contre le stress oxydant (Kwon *et al.*, 2004 ; Koh *et al.*, 2005). De plus, le laboratoire a précédemment rapporté chez le rat GK/Par (i) des niveaux accrus d'expression de gènes impliqués dans la production d'AMPc (Frayon *et al.*, 1999) ; et (ii) des concentrations insulaires accrues en AMPc (Dolz *et al.*, 2005). L'utilisation de dbcAMP, un analogue de l'AMPc, permet de protéger les cellules  $\beta$  témoins contre l'apoptose induite par l' $H_2O_2$  (Article 2, Fig. 3B). Nous avons donc vérifié si cette élévation d'AMPc est impliquée dans la résistance aux effets pro-apoptotiques de l' $H_2O_2$ . Dans le groupe GK/Par, bien que le dbcAMP ne soit pas capable de diminuer significativement l'apoptose  $\beta$ -cellulaire en réponse à l' $H_2O_2$ , il permet d'inhiber l'apoptose spontanée. Inversement, un inhibiteur des adénylates cyclases, la dd-Ado, permet de normaliser la sensibilité aux effets de l' $H_2O_2$  dans les cellules  $\beta$  GK/Par. Nous avons validé l'hyperactivation, dans les îlots GK/Par, d'un certain nombre de gènes régulateurs du métabolisme de l'AMPc, tels que ceux codant pour les protéines G (G $\alpha$ olf et G $\alpha$ s) et les isoformes 2 et 3 des adénylates cyclases (Adcy2 et -3) (Article 2, Fig. 4A). De plus, après 24h de culture, 6 des 8 gènes sélectionnés contribuant à des concentrations élevées en AMPc (G $\alpha$ olf ; Adcy1, -2, -3, et -8 ; Pde3b) restent surexprimés (Article 2, Fig. 4B).

### 2.2.5. Adaptation au diabète

Nous avons à nouveau profité de la période de prédiabète du modèle GK/Par pour approfondir l'étiologie de cette adaptation au stress oxydant, en analysant le profil transcriptionnel des îlots de rats GK/Par âgés de 7 jours (Article 2, Fig. 5). Parmi les 10 gènes pro-/anti-apoptotiques sélectionnés, 9 sont normalement exprimés dans les îlots prédiabétiques GK/Par. Parmi les 8 gènes sélectionnés intervenant dans la régulation de l'AMPc, 6 sont normalement exprimés dans ces mêmes îlots.

2.3. Manuscrit 2

*AJP, en révision*

**Diabetic GK/Par rat  $\beta$ -cells are spontaneously protected against oxidative stress induced-apoptosis. A cAMP-dependent adaptive response**

Grégory Lacraz, Florence Figeac, Nadim Kassis, and Bernard Portha

*Unité Mixte de Recherche (UMR) 7059, National Center for Scientific Research (CNRS) and Université Paris-Diderot (UP7), Bâtiment BUFFON, F-75251 Paris, France*

**Running title: cAMP-dependant apoptosis resistance of GK/Par  $\beta$ -cells**

Address for correspondence:

Professeur B. PORTHA

Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine

Université PARIS-DIDEROT / UP7 - CNRS UMR 7059

Bâtiment BUFFON; 5<sup>ème</sup> étage; 36, Rue Hélène Brion

F - 75205 PARIS Cedex 13

Tél: +33-1-57 27 77 87

Fax: +33-1-57 27 77 91

e-mail: [portha@univ-paris-diderot.fr](mailto:portha@univ-paris-diderot.fr)

## ABSTRACT

The alteration of the  $\beta$ -cell population in the Goto-Kakizaki rat (GK/Par line), a model of spontaneous type 2 diabetes, has been ascribed to significantly decreased  $\beta$ -cell replication and neogenesis, while  $\beta$ -cell apoptosis is surprisingly not enhanced and remains in the normal range. To gain insight into the mechanisms by which those  $\beta$ -cells are protected from death, we studied *ex vivo* the apoptotic activity and the expression of a large set of pro-/anti-apoptotic and pro-/anti-oxidant genes in GK/Par islet cells. This was done *in vitro* in freshly isolated islets as well as in response to culture conditions and calibrated reactive oxygen species (ROS) exposure (i.e.,  $H_2O_2$ ). We also investigated the intracellular mechanisms of the diabetic  $\beta$ -cell response to ROS, the role if any of the intracellular cAMP metabolism, and finally the kinetic of ROS response, taking advantage of the GK/Par rat normoglycemia until weaning. Our results show that the peculiar GK/Par  $\beta$ -cell phenotype was correlated with an increased expression of many stress genes as well as pro/anti-apoptotic genes. We demonstrate that such combination confers resistance to cytotoxic ROS exposure *in vitro*, raising the possibility that at least some of the activated stress/defense genes have protective effects against  $\beta$ -cell death. We also present some evidence that the GK/Par  $\beta$ -cell resistance to ROS is at least partly cAMP dependant. Finally, we show that such a phenotype is not innate but it is spontaneously acquired after diabetes onset, as the result of an adaptive response to the diabetic environment.

**Keywords:**  $\beta$ -cell mass; apoptosis; reactive oxygen species; cAMP; diabetic GK rat

## INTRODUCTION

Excessive formation of ROS is a well-established mediator of hyperglycemic damage in diabetes to a wide range of tissues, such as neurons, retinal cells, and vascular endothelium (4). Also pancreatic  $\beta$ -cells are reportedly vulnerable to oxidative stress, which may induces  $\beta$ -cell apoptosis and a decrease in  $\beta$ -cell mass (57, 58, 67). This decrease results in the dysfunction of insulin secretion, and leads to the onset of type 1 and 2 diabetes (10, 16, 57, 64). Oxidative stress results from increased levels of ROS, which include free radicals such as superoxide and hydroxyl, and non-radical species such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). These radicals are generated when  $\beta$ -cells are under conditions of exposure to low glucose (42), high glucose (43, 58), high fatty acids (5), hypoxia (19, 26) or cytokines (11). The susceptibility of  $\beta$ -cells to ROS may be related to their possessing relatively low levels of antioxidant enzymes such as Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2), catalase, and glutathione peroxidase (GPx) (58, 67). Whether oxidative stress is pro-diabetic or anti-diabetic, is however not so clear as there is evidence from transgene-expressing NOD mice studies that overexpression of antioxidant enzymes, such as metallothionein and catalase, accelerate the progression to diabetes (37). However, in normal islets from rats submitted to a 90% pancreatectomy, hyperglycemia stimulates several genes that are not, or only slightly, expressed in normal  $\beta$ -cells, such as Gpx and the inducible isoform of heme-oxygenase-1 (Hmox1) (34). High glucose and cAMP have also been reported to stimulate Hmox1 and Gpx gene expression in cultured normal rat islets (25). As in other cell types (49), the hyperglycemia dependant-increase in Hmox1 and Gpx expression could result from an overproduction of ROS and serve to protect  $\beta$ -cells from this

stress. Indeed, overexpression of Hmox1, Gpx, or other antioxidant genes in pancreatic  $\beta$ -cells improves their survival and function under various stressful conditions (40, 51, 66, 67).

In the adult hyperglycemic GK/Par rat, which is a model of spontaneous type 2 diabetes, total pancreatic  $\beta$ -cell mass is decreased (44). In adult diabetic GK/Par islets, we have reported peri-islet inflammation (20) and more recently the accumulation of indirect oxidative stress markers, such as 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) and nitrotyrosine, targeting mostly peri-islet areas (they can hardly be detected within the islets) (G. Lacraz, unpublished observations). In GK islets issued from a Japanese colony, high levels of 8-OHdG and HNE have been reported, and they were decreased by a blood glucose-lowering agent (22). The alteration of the  $\beta$ -cell population in diabetic GK/Par rats has been ascribed to significantly decreased  $\beta$ -cell replication and neogenesis (45, 46), while  $\beta$ -cell apoptosis is surprisingly not increased and remains in the normal range (45, 46). Extensive follow-up of the animals from birth has revealed that GK/Par pups become overtly hyperglycemic for the first time after four weeks of age only, and that the  $\beta$ -cell mass deficit already present in normoglycemic day-7-old (D7) GK/Par, again, could not be ascribed to increased  $\beta$ -cell apoptosis (45). To gain insight into the mechanisms by which  $\beta$ -cell are protected from death caused by elevated hyperglycemia, we studied *ex vivo* the functional status of diabetic islet cells in term of apoptotic activity (apoptosis index, expression of pro-/anti-apoptotic and pro-/anti-oxidant genes). This has been done *in vitro* in the basal state as well as in response to culture conditions and calibrated  $H_2O_2$  exposure. We also investigated the intracellular mechanisms of the diabetic  $\beta$ -cell adaptation to ROS and the role if any of the intracellular cAMP metabolism, and finally the kinetic of the ROS response, taking advantage of GK/Par rat normoglycemia until weaning.

## MATERIALS AND METHODS

All animal experiments were performed on fed age-matched male GK/Par (52, 53, 54) and non-diabetic Wistar rats from our local colonies in accordance with accepted standards of animal care as established by the French National Centre for Scientific Research.

**Islet isolation.** Seven-day-old or 2.5-month-old adult rats were killed by decapitation. Pancreatic islets were isolated by collagenase (Sigma-Aldrich, Lyon, France) digestion and then handpicked under a stereomicroscope as previously described (9).

**Islet Culture.** Rat islets were cultured in 2 ml of RPMI 1640 containing 11 mmol/l glucose (Cambrex, Emerainville, France) and supplemented with penicillin/streptomycin (100 mU/ml and 100  $\mu$ g/ml, respectively; Cambrex), 2 mmol/l l-glutamine (Cambrex) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cambrex). Islets were maintained free-floating at 37 °C in a humidified atmosphere of 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ , until initiation of experiments. Batches of 50 islets were incubated in the absence, or the presence of the cAMP analogue N<sup>6</sup>,2'-O-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dbcAMP, 1 mmol/l; Sigma-Aldrich) or the inhibitor of membrane-bound adenylyl cyclase isoforms, 2',5'-dideoxyadenosine (dd-Ado, 100  $\mu$ mol/l; Calbiochem, France-Biochem, Meudon, France) for 24h. In some experiments, islets were pretreated with 50  $\mu$ mol/l  $H_2O_2$  alone, or in combination with dbcAMP or dd-Ado for 30 min, and then washed twice with RPMI medium before culturing islets.

**Immunohistochemistry analysis.** Freshly or 24h-cultured islets were fixed in aqueous Bouin's solution (picric acid 71.4%, formaldehyde 23.8%, acetic acid 4.8%, all by volume;



VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) and embedded in paraplast, according to standard procedures. Immunohistochemistry was performed as previously described (44, 47). Apoptotic cells in the islet sections were detected by TdT-dependent dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) assay using the ApopTag peroxidase *in situ* apoptosis detection kit (Chemicon International, Chesham, UK) according to the manufacturer's instructions. Sections were then immunostained for insulin using the indirect method with a guinea pig anti-porcine insulin (1:300; MP Biomedicals, France) and an anti-guinea pig alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (MP Biomedicals). Immunoreactivity was localized using a peroxidase substrate kit (DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or an alkaline phosphatase substrate kit (Vector Laboratories). To estimate total islet-cell and  $\beta$ -cell replication rates, total and  $\beta$ -cells were counted in double-stained islet sections using an Olympus BX40 microscope. Results were expressed as the percentage of TUNEL-positive total or  $\beta$ -cells. At least 300  $\beta$ -cells and 500 total cells were counted per islet (2-9 islets per section), and 3-26 different sections were analyzed for each independent experiment.

**mRNA analysis.** Total RNA was isolated from islets using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and its concentration determined by optical density at 260 nm. To remove residual DNA contamination, the RNA samples were treated with RNase-free DNase (Qiagen) and purified with RNeasy mini-column (Qiagen). Total RNA (4  $\mu$ g) from each islet sample was reverse transcribed with 40 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using random hexamer primers. The primers used were derived from rat sequences and designed using OLIGO6. Real-time quantitative PCR amplification reactions were carried out in a LightCycler 1.5 detection system (Roche, Meylan, France) using the Light Cycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit (Roche). Reverse transcribed RNA (10 ng) was used as the template for each reaction. All reactions were run in duplicate with no template control. The PCR conditions were: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s. mRNA transcript levels of four housekeeping genes (rpl19, Tbp, cyclophilin a, 18S) were assayed; rpl19 was retained for normalisation of other transcripts.

**Data presentation and statistical analysis.** Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses used an unpaired Student's t test or ANOVA as appropriate. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

**GK/Par  $\beta$ -cell death is normal in freshly isolated islets.** The apoptotic index for islet cells from Wistar and GK/Par rats as estimated by TUNEL staining at the end of the collagenase isolation procedure is shown in Fig.1A, B. GK/Par islet cells had a low apoptotic index that was not significantly different from that in control Wistar islets. Double labeling for TUNEL and insulin indicated that the fraction of  $\beta$ -cells undergoing apoptosis within the freshly isolated GK/Par islets was similar to that found in Wistar. The mRNA levels for two pro-oxidant genes i.e., NADPH oxidase-2 (Nox2) and the inducible cyclo-oxygenase-2 (Cox2) were higher ( $\times 2.9$ ,  $p < 0.0001$ ; and  $\times 18.7$ ,  $p < 0.001$ , respectively) in GK/Par islets (Fig. 1C). Both pro-/anti-apoptotic gene mRNA levels were upregulated in GK/Par. We found overexpression of pro-apoptotic genes such as caspases (Casp3:  $\times 2.6$ ,  $p < 0.01$ , Casp9:  $\times 1.4$ ,  $p < 0.05$ ), the transcription factor p53 ( $\times 2.2$ ,  $p < 0.0001$ ), which is implicated in mediating

stress-activated apoptosis, and Fas-receptor as well Fas-ligand (Tnfrsf6:  $\times 3.7$  and Faslg:  $\times 2.5$ , respectively,  $p < 0.05$ ), while Bax was unchanged. The inducible isoform of NO synthase gene (iNos), which is mainly involved in the inflammatory response, was strongly overexpressed in GK/Par islets ( $\times 10$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1C). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (Hif1 $\alpha$ ) was also higher ( $\times 1.7$ ,  $p < 0.05$ ) in GK/Par islets. The transcription factor c-myc, an early response proto-oncogene, whose mRNA levels were previously shown to be elevated in  $\beta$ -cells under chronic hyperglycemia and activated by cAMP (23, 24), was strongly enhanced ( $\times 11.4$ ,  $p < 0.0001$ ) in GK/Par islets. The expression levels of the anti-apoptotic genes Bcl2 ( $\times 1.4$ ,  $p < 0.05$ ) and A20 ( $\times 12.9$ ,  $p < 0.0001$ ) were significantly higher in GK/Par islets.

To evaluate the status of the antioxidant defenses in freshly islets, under basal conditions, the expression of a large set of antioxidant genes was assessed (Fig. 1D). The mRNA levels for Sod1 and Sod2 were higher in GK/Par islets ( $\times 2.3$ ,  $p < 0.0001$  and  $\times 1.7$ ,  $p < 0.001$  respectively). The mRNA levels for the main antioxidant genes encoding enzymes involved in further reduction of superoxide-radical-forming compounds were also higher in GK/Par islets (i.e., Gpx1:  $\times 3.8$ ,  $p < 0.0001$ ) and catalase (Cat:  $\times 1.7$ ,  $p < 0.05$ ), as well the mRNA levels for thioredoxin-1 (Txn1:  $\times 2$ ,  $p < 0.05$ ), and glutaredoxin-1 (Glr1:  $\times 2.2$ ,  $p < 0.001$ ). Peroxiredoxin-1 that catalyzes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction to water using thioredoxins or glutaredoxins as their physiological hydrogen donors was also overexpressed (Prxd1:  $\times 2.6$ ,  $p < 0.0001$ ) in GK/Par islets. Moreover, the mRNA levels of  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit, the rate-limiting enzyme for biosynthesis of the main cellular antioxidant GSH, was significantly higher in GK/Par islets (Gclc:  $\times 2$ ,  $p < 0.0001$ ). Hmox1 gene, which is activated in stressful conditions (25, 34, 35), and transcription factor Nrf2, which drives the expression of many of the above-mentioned genes (30), were also overexpressed in GK/Par islets ( $\times 25$  and  $\times 3.25$ , respectively,  $p < 0.0001$ ). Finally, the expression of uncoupling protein-2 (Ucp2), which limits superoxide production by dissipating the proton gradient (12) was higher in GK/Par islets (Ucp2:  $\times 1.9$ ,  $p < 0.0001$ ). Altogether these data strongly suggest that under basal conditions,  $\beta$ -cells from diabetic GK/Par 1/ exhibit signs for endogenous activation of the pro-apoptotic and pro-oxidant pathways, 2/ are self protected from apoptosis despite these adverse conditions *via* marked activation of endogenous defenses and mitochondrial uncoupling.

**GK/Par  $\beta$ -cell death is activated by culture conditions.** The apoptotic pattern for Wistar and GK/Par islet cells was quite different after the 24h culture. Indeed, we observed a greater number of apoptotic total cells and  $\beta$ -cells in GK/Par islets ( $\times 3.6$  and  $\times 4.1$ , respectively,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 2A, B). After the 24h culture, the mRNA levels for almost all of the selected pro-/anti-apoptotic as well as pro-/anti-oxidant genes remained overexpressed in GK/Par islets, except for Bax, Tnfrsf6, Gclc, Sod1, Glrx1 and Cox2 (Fig. 2C, D). To further discriminate at the molecular level the stressful effect of *in vitro* condition *per se*, we compared stress gene expression after 24h vs. before 24h culture. The relative changes of the apoptotic-related genes were quite different: Faslg was greatly induced ( $\times 39$ ,  $p < 0.0001$ ) in GK/Par, unlike Wistar islets (supplement data, Fig. S1A). Other stress-activated genes such as iNos and Hif1 $\alpha$  were strongly upregulated (more than 10 fold) in both Wistar and GK/Par, while A20 was upregulated in Wistar ( $\times 1.5$ ,  $p < 0.05$ ) unlike GK/Par islets. However, the relative changes of oxidative stress-related genes were very similar in both Wistar and GK/Par islets, except for Cox2, which was strongly induced in Wistar ( $\times 243$ ,  $p < 0.001$ ) unlike GK/Par (supplement data, Fig. S1B).

**GK/Par  $\beta$ -cells are resistant to ROS-activated cell death.** We recently showed that insulin exocytosis by GK/Par  $\beta$ -cells exhibited an unexpected resistance to many pro-oxidant agents – including 50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  – when acutely exposed (G. Lacraz, unpublished observations). Here, we have further examined the effects of 50  $\mu\text{mol/l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  acutely added (30 min), before culturing the islets, on the  $\beta$ -cell apoptotic rate. In the Wistar cultured islets,  $\text{H}_2\text{O}_2$  strongly raised the apoptotic index in the total islet cell population ( $\times 2.8$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3A) as well as in the  $\beta$ -cell population ( $\times 2.9$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 4B). By contrast, in the GK/Par cultured islets,  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not further amplify apoptosis in neither total islet cells nor  $\beta$ -cells (Fig. 3A, B). After a 48h culture following the same  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure protocol, we observed the same pattern of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -resistance in the GK/Par  $\beta$ -cells (data not shown).

**Elevated cAMP levels afford protection from ROS-activated  $\beta$ -cell death.** Because the cAMP pathway was previously shown to protect normal  $\beta$ -cells from oxidative stress (28, 31), and because we have previously observed that *Adcy2* and *-3* and the G protein *Golf*  $\alpha$  subunit genes were overexpressed in GK/Par islets (17), we tested the hypothesis that cAMP elevation was involved in GK/Par resistance against  $\text{H}_2\text{O}_2$ , as observed in our culture protocol. dbcAMP, a cell-permeable analogue of cAMP, significantly protected Wistar  $\beta$ -cells from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced apoptosis after cultures ( $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $4.51 \pm 0.53$ , vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  plus dbcAMP:  $2.07 \pm 0.24\%$  apoptotic cells,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3B). Such protective effect did not reach statistical significance in GK/Par  $\beta$ -cells (despite a 40% decrease of the apoptotic index). However dbcAMP induced-protection of GK/Par  $\beta$ -cells from culture conditions alone reached significance (vehicle:  $3.43 \pm 0.53$  vs. dbcAMP:  $1.82 \pm 0.36\%$  apoptotic cells,  $p < 0.05$ ). When using dd-Ado, an adenylyl cyclase inhibitor, apoptosis was frankly enhanced ( $\times 2.5$ ,  $p < 0.05$ ) in Wistar  $\beta$ -cells. It was further elevated ( $\times 3.6$ ,  $p < 0.05$ ) when  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added to dd-Ado. At variance, GK/Par  $\beta$ -cell apoptosis in the presence of dd-Ado was similar to that of vehicle group, suggesting that GK/Par  $\beta$ -cells exhibit a poor responsiveness to cAMP-production inhibition. It was nevertheless enhanced (1.8,  $p < 0.05$ ) when  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added to dd-Ado as compared to dd-Ado alone, showing that the inhibition of cAMP production in GK/Par  $\beta$ -cells restored to some degree their responsiveness to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Altogether, these data suggest that the intracellular cAMP level is crucial to protect  $\beta$ -cells (either normal or diabetic) from apoptosis when they are challenged with ROS.

**Higher expression of cAMP-related proteins in GK/Par islets.** In order to ascertain our hypothesis that a more active endogenous cAMP production in GK/Par islets could contribute to their resistance to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , we then confirmed the expression of genes crucial for cAMP regulation. The mRNA levels for *Golf* ( $\times 2.5$ ,  $p < 0.001$ ), *Gas* ( $\times 2.1$ ,  $p < 0.01$ ), *Adcy2* ( $\times 5.7$ ,  $p < 0.01$ ), and *-3* ( $\times 6$ ,  $p < 0.01$ ), were higher in fresh GK/Par than Wistar islets (Fig. 4A), while mRNA levels *Adcy1* and *-8* remained unchanged. Such pattern of *Adcy* (adenylyl cyclase) expression is indeed associated with a significantly more important cAMP basal level in freshly isolated GK/Par as compared to Wistar islets (9). The phosphodiesterase isoform *Pde1c* and *Pde3b* mRNA levels remained unchanged in fresh GK/Par islets. After the 24h culture, almost all of these cAMP-related genes remained overexpressed in the GK/Par islets, apart from *Gas* and *Pde1c* (Fig. 4B). To discriminate at the molecular level the stressful effect of *in vitro* conditions *per se*, we compared the cAMP-related gene expression after 24h vs. before 24h culture. The relative changes in mRNA levels were very similar in both Wistar and GK/Par islets, with a general tendency to decreased expression. Over the set of the selected genes, most of them remained overexpressed in GK/Par islets after the

cultures, except for Gas (Fig. 4C). These data are consistent with our assumption that an exaggerated cAMP production allows GK/Par islets to resist to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis.

**Expression of apoptotic- and cAMP-related genes is upregulated in GK/Par islets only after diabetes onset.** Finally, to address the pathogenesis for the raised expression of the pro-/anti-apoptotic, pro-/anti-oxidant- and cAMP-related genes in diabetic GK/Par islets, we studied islets obtained from D7 GK/Par rats at a stage when they are still normoglycemic (prediabetics). We have previously shown that basal hyperglycemia starts at 1-month of age (weaning) in the GK/Par rat colony (53). Among the ten pro-/anti-apoptotic genes selected, nine were found normally expressed in D7 GK/Par islets (Fig. 5A). Interestingly, mRNA levels for the anti-apoptotic gene A20 induced in stressful conditions such as experimentally-induced hyperglycemia (34, 35), was 3.2-fold lower ( $p < 0.05$ ) in D7 GK/Par than age-related Wistar. After diabetes onset, A20 mRNA levels were strongly enhanced ( $\times 7.7$ ,  $p < 0.01$ ) in GK/Par, whereas it was markedly diminished ( $\times 3$ ,  $p < 0.01$ ) in Wistar islets (Fig. 2A vs. 5A). In addition, among the thirteen pro-/anti-oxidant genes selected, eleven were found normally expressed in D7 GK/Par islets, unlike Gpx1 and Txn1 which were higher ( $\times 1.8$ ,  $p < 0.01$ ; and  $\times 1.5$ ,  $p < 0.05$ , respectively) (Fig. 5B). Finally, the mRNA levels for Gas, Adcy2, Adcy3, Pde1c and Pde3b were normal in fresh D7 GK/Par as compared to D7 Wistar (Fig. 5C) except those of Adcy1 and Adcy8, which were lower (1.3-fold,  $p < 0.0001$ ; and 1.6-fold,  $p < 0.05$ , respectively) as compared to D7 Wistar (Fig. 5C). This allows us to suggest that the overexpression of these families of genes, as seen in overtly hyperglycemic diabetic adult GK/Par islets, is not constitutive but mainly represents an acquired adaptation, probably in response to the development of basal hyperglycemia and diabetes metabolic conditions.

## DISCUSSION

In the present study, we show that the  $\beta$ -cell rate of apoptosis is not increased in freshly isolated islets from GK/Par rats with type 2 diabetes, therefore confirming our previous conclusion obtained *in situ* using total pancreatic tissue and the same methodological design to quantify apoptotic cells (double staining; insulin/TUNEL) (44, 45). At first glance this is a paradoxical conclusion as it is currently admitted that chronic exposure to elevated levels of glucose and lipids, as also encountered in the GK/Par model (53, 54) causes  $\beta$ -cell apoptosis. This is even more puzzling if one considers that similar to diabetic human islets (54), GK/Par rats exhibit a peri-islet inflammatory response (13, 20) with elevated islet pro-inflammatory cytokines/chemokines release (J. Ehses, unpublished observations) and accumulation of markers for pancreatic oxidative stress (G. Lacraz, unpublished observations). Our results show that the peculiar GK/Par  $\beta$ -cell phenotype is correlated with an enhanced expression of many stress genes. We demonstrate here that it confers resistance to cytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure *in vitro*, raising the possibility that at least some of the activated genes have protective effects against death of these  $\beta$ -cells. We also present some evidence that the GK/Par  $\beta$ -cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is at least partly cAMP dependant. Such a phenotype is not innate but it is spontaneously acquired after diabetes onset, as the result of an adaptive response to the diabetic environment.

**Stress gene expression in GK/Par islets.** During the process of islet isolation, chemical and mechanical injuries occur and the interruption of the vascular supply compounds the problem by producing hypoxia. Some of this stress response may be due to the endotoxin content of collagenase preparations (68), but destruction of the extracellular matrix (69) and

hypoxia (8) could also be playing a role. Since fresh GK/Par and Wistar islets were obtained through the same process of isolation and collagenase exposure, and because some mRNA levels (Bax, Pde1c) remain normal, the increase in gene expression seen in GK/Par islets can not be ascribed to an isolation process-induced general activation. In the freshly isolated GK/Par islets, evidence for a stress response was found with elevations in the expression of a large panel of genes some being pro-apoptotic (Casp3, Casp9, Faslg, Tnfrsf6, p53), pro-oxidant (Nox2, Cox2, iNos), anti-apoptotic (Bcl2, A20), or antioxidant (Hmox1, Gpx1, Cat, Sod1, Sod2, Txn1, Prdx1, Glrx1). Because these various genes remained expressed at very low levels in fresh Wistar islets, this may reflect an up-regulation of the intrinsic GK/Par  $\beta$ -cell defense status, which is maintained *ex vivo*. Hyperglycemia is probably playing a crucial role in eliciting up-regulation of stress genes in the GK/Par islets, since a similar degree of basal hyperglycemia (10 mmol/l) obtained in normal rats after pancreatectomy led to activation of similar protective genes (34). Specificity of hyperglycemia was strongly suggested as a phlorizin treatment, which normalized hyperglycemia in the pancreatectomized model, reversed those increased mRNA levels (34). However hyperglycemia is not the sole determinant of this adaptation, as some genes which were upregulated (Sod1, Sod2, p53, Cat, Bcl2) in the GK/Par islets, were not in the pancreatectomized model (34). Moreover, since we have found that NF- $\kappa$ B, MyD88, Tlr2, Tlr4, Tnfa, Mcp1 $\alpha$ , Il1 $\beta$  and Il6 genes are also upregulated in fresh GK/Par islets (J. Ehses, unpublished observations), the production of pro-inflammatory cytokines and/or ROS by the islet cells themselves, may be also central for the GK/Par islet adaptive response. Finally, since Cox2 and Nox2 mRNA are markedly up-regulated in GK/Par islets, an enhanced generation of the pro-inflammatory prostaglandin E2 (50, 63) and non-mitochondrial ROS (48) may also contribute to the inflammatory and oxidatively stressed status of GK/Par islets.

Besides causing damage to cells, ROS may activate genes involved in cell defense as well (70). HO-1, the inducible isoform of heme oxygenase, is an enzyme that catalyzes the NADPH-dependent decomposition of heme to form the antioxidant biliverdin, iron, and carbon monoxide (CO) (49). These products may be important for protecting cells because bilirubin formed from biliverdin can inhibit the oxidation of unsaturated fatty acids and scavenge ROS; iron can lead to the formation of ferritin, which provides an iron detoxification mechanism; and CO can suppress production of cytokines and may play a role in the regulation of insulin release. Interestingly, the HO-1 promoter contains consensus binding sites for a large number of transcription factors, e.g. NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB, HIF-1 $\alpha$ , Myc/Max heterodimers, Sp1 (14), some of which could be activated by high glucose and/or ROS (24, 65). It has recently been reported that upregulation of HO-1 protected both rodent islets and  $\beta$ -cell lines from apoptosis and improved their *in vivo* function (51). The generation of ROS may also be important for the activation of the redox-sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B (61). Upon activation, NF- $\kappa$ B may be important in promoting the transcription of stress genes that could be pro-/anti-apoptotic, as well as pro-/anti-oxidant (41). For example, NF- $\kappa$ B binding sites are found in the promoter regions of the Hmox1 (33) and A20 genes (29). Hmox1 overexpression has been found to protect islets from apoptosis (51). A20 overexpression in islets or other cell types (endothelial cells, fibroblasts, and B-cells) confers resistance to cytokine-induced apoptosis (18). The culture of dispersed rat  $\beta$ -cells with IL-1 $\beta$  was shown to stimulate the expression of Hmox1, Sod2, A20 and Hsp70 genes, and was

associated with reduced sensitivity to the ROS-mediated toxic effects of alloxan and streptozotocin (39).

Hif-1 $\alpha$  was up-regulated in fresh GK/Par islets. This gene codes the subunit HIF-1 $\alpha$ , which interacts with HIF-1 $\beta$  (also known as hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) to form HIF-1, a transcription factor implicated in the transcriptional activation of genes in hypoxic cells. This suggests that at variance with the Wistar islets, GK/Par islets faced a hypoxic stress probably triggered by the alteration of islet vascularization *in situ*, as reported previously (20), and perturbation of islet blood flow (2). In addition, as the transcriptional regulation of Hif1 $\alpha$  requires NF- $\kappa$ B (56), increased NF- $\kappa$ B expression could contribute to HIF-1 $\alpha$  activation therefore coupling activation of the innate immune response in the GK/Par islets to the hypoxic response. The c-myc gene was also upregulated in GK/Par islets. c-MYC is a transcription factor that heterodimerizes with Max to modulate the transcription of a large number of genes regulating cell metabolism, division, and apoptosis (7). In differentiated cells, including fibroblasts, smooth muscle cells, and hepatocytes, c-myc overexpression stimulates cell growth and proliferation, decreases cell differentiation, and sensitizes cells to apoptosis (7). The c-myc mRNA levels were increased in rat islets exposed to high glucose both *in vivo* and *in vitro* (24), in response to cAMP-raising agents (15) or after short-term exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15) or cytokines (15). Interestingly, these effects resemble those observed in GK/Par islets. Finally, Ucp2 gene was upregulated in GK/Par islets. Since overexpression of UCP2 limits superoxide production (12) and decreases H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity (36) and cytokine-induced ROS generation (55) in  $\beta$ -cell lines, UCP2 may contribute to GK/Par  $\beta$ -cell defenses against ROS. Taken together, our data strongly suggest that GK/Par islets are able to defend against ROS toxicity *via* antioxidant defenses and uncoupling, contrarily to naive Wistar islets.

**Resistance of GK/Par  $\beta$ -cells to ROS.** In Wistar islets, we confirmed that  $\beta$ -cell apoptosis was slightly enhanced by culture conditions *per se* and it was markedly activated 24h after an acute (30 min) exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50  $\mu$ mol/l) (21, 27). Under the same *in vitro* protocols, GK/Par islets showed an increased sensitivity to culture conditions alone as far as  $\beta$ -cell apoptosis is concerned, but they were strongly resistant against the toxic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This clearly indicates that the diabetic GK/Par islet cells are more susceptible to the process of islet isolation and adaptation to culture conditions than the non-diabetic Wistar islets. It also suggests that the stress conditions as induced by our culture protocol can not be reduced to oxidative stress conditions only and that, despite of their resistance to pure H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress, the GK/Par  $\beta$ -cells might remain highly sensitivity to other kinds of stressors. In parallel experiments (G. Lacraz, unpublished observations), *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alloxan or streptozotocin exposure acutely blunted KCl-induced insulin release by Wistar islets. At variance, all three agents did not modify KCl-activated insulin release by GK/Par islets. This remarkable ability of GK/Par  $\beta$ -cells to resist to the deleterious effects of ROS as far as both cell death program and insulin exocytosis are concerned, entails a heightened ability to dissipate ROS. This positive adaptive response enables an enhanced islet protection not only against chronic diabetes-mediated (basal state) ROS overproduction, but also towards further oxidative damage (exposure to additional stressors). Consistent with this conclusion are data reporting that increased liver antioxidant defenses allowed type 1 diabetic BB rats to counteract hypoxia-mediated challenge better than their non-diabetic counterpart (3).

**cAMP metabolism and resistance of GK/Par  $\beta$ -cells to ROS.** Herein, we demonstrate that elevated intracellular cAMP levels reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell apoptosis. This is true in the GK/Par  $\beta$ -cells in the basal situation since the adenylyl cyclase blocker dd-Ado restores their sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. This holds true also for the non-diabetic Wistar  $\beta$ -cells since dbcAMP rendered these cells resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis. Our data strongly confirm in a model of spontaneous type 2 diabetes that cAMP-elevating drugs are efficient therapeutic candidates against  $\beta$ -cell failure. They are also in agreement with the reports that GLP-1 suppressed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis (21) and that elevated intracellular cAMP levels prevented lipotoxicity induced-apoptosis (31) or oxidative damage caused by 2-deoxy-D-ribose (28), in various pancreatic  $\beta$ -cell lines. It has been recently reported that cAMP-dependent signalling pathways increased the expression of antioxidant enzymes such as HO-1 in rat  $\beta$ -cells (25), an effect likely to be ascribed to the presence of a cAMP responsive element in the promoter of the hmx1 gene. The cAMP response element binding protein (CREB) seems an important cell survival factor since Exendin-4 and  $\beta$ cellulin together increased CREB phosphorylation/activation, restored the antiapoptotic gene Bcl2 expression and decreased apoptosis in cytokine-treated islets (60).

Our observation that dbcAMP prevented GK/Par  $\beta$ -cell apoptosis induced by the culture conditions alone, is consistent with other studies demonstrating that dbcAMP also inhibited apoptosis induced by serum deprivation and cytotoxic agents different from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (38, 59). Therefore it can be speculated that the pathways activated by the various stressors used here converged into a final common pathway which mediate the death signal and that the intracellular cAMP levels might affect this final common pathway. We did not investigate the pathways downstream of cAMP accumulation in the stressed  $\beta$ -cells. Our observation that dd-Ado did not increase significantly GK/Par  $\beta$ -cell apoptosis induced by the culture conditions alone, is consistent with a protective role of intracellular cAMP within the GK/Par  $\beta$ -cells also in the basal condition. This is rendered possible since the intracellular cAMP content is spontaneously high in GK/Par islets already in the basal state (9). This is related to overexpression of the adenylyl cyclase-1, -2 and -3, and of the G $\alpha$ S and G $\alpha$ olf proteins while the phosphodiesterases PDE3B and PDE1C isoforms are decreased (9). An attractive possibility that has been explored in the GK/Sto rat is that enhanced Adcy3 is due to functional mutations in the promoter region of the Adcy3 gene (1). We do not retain this hypothesis in the GK/Par islet since we found that the expression of the Adcy1, Adcy2, Adcy3, G $\alpha$ S and G $\alpha$ olf genes were not increased in the prediabetic GK/Par islets.

**Resistance of the diabetic GK/Par  $\beta$ -cells to ROS is a spontaneous adaptive response.** When comparing diabetic vs. prediabetic GK/Par islets, our results show that the increased expression of most of the stress genes is time correlated with installation of overt diabetes in the GK/Par rat, i.e. basal hyperglycemia, hyperlipidemia and hypercholesterolemia. At this time, it is not possible to distinguish the specific role of each parameter. However, since in islets from partially pancreatectomized rats, increasing mRNA levels of some stress genes correlate with increasing levels of hyperglycemia *in vivo*, and that changes in stress gene expression were reversed by normalizing glycemia with phlorizin (34), the pathogenic contribution of the mild hyperglycemia, as seen in the GK/Par rats from their weaning to adulthood, seems to be guaranteed. Our working hypothesis is therefore that the abnormal diabetic environment in the GK/Par rat that in itself is the source for moderate oxidative stress, progressively educate the  $\beta$ -cell to fight against ROS through an adaptive

enhancement of its antioxidant defenses and finally triggers a tolerance to oxidative insults. There are several examples showing that endogenous antioxidant defense systems may be enhanced by various stimuli including sublethal oxidative challenges, which induce tolerance to subsequent lethal oxidative injuries (6, 32). Cells pretreated with low dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were significantly tolerant when challenged with a lethal concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, with reduced cell lysis and improved survival rate (62) and these authors reported that both the catalase and glutathione system were enhanced by pre-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation.

In conclusion, this study using the GK/Par model of type 2 diabetes, demonstrates for the first time, contrarily to usually claimed, that the  $\beta$ -cell is able to self-adapt to chronic exposure to multiple stressors such as mild activation of innate immunity, hypoxic status and oxidative stress. This is illustrated by the spontaneously enhanced expression of a large panel of genes known to be activated in response to both endogenous and exogenous ROS *in vivo*. We propose that activation of the cAMP/PKA pathway is part of the mechanism conferring resistance of the GK/Par  $\beta$ -cell to ROS-induced apoptosis. This may further add to the benefits of cAMP elevating agent-based therapy in patients with type 2 diabetes.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

These studies were funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, MERCK-SERONO, and NEB Research Foundation. The authors thank Pr. X. Leverve and Dr. F. Homo-Delarche for stimulating discussions. Some of these data were presented at the 43rd European Association for the Study of Diabetes Meeting, Amsterdam, The Netherlands, September 2007 and at the 66th American Diabetes Association Meeting, Washington, D.C., USA, June 2006.

### **GRANTS**

G. Lacraz and F. Figeac received a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Ecole Doctorale 394, Physiologie/Physiopathologie).



## REFERENCES

1. Abdel-Halim SM, Guenifi A, He B, Yang B, Mustafa M, Hojeberg B, Hillert J, Bakhiet M, Efendic S. Mutations in the promoter of adenylyl cyclase (AC)-III gene, overexpression of AC-III mRNA, and enhanced cAMP generation in islets from spontaneously diabetic GK rat model of type-2 diabetes. *Diabetes* 47: 498-504, 1998.
2. Atef N, Portha B, Penicaud L. Changes in islet blood flow in rats with NIDDM. *Diabetologia* 37: 677-680, 1994.
3. Bonfigli A, Colafarina S, Falone S, Di Giulio C, Di Ilio C, Amicarelli F. High levels of antioxidant enzymatic defence assure good protection against hypoxic stress in spontaneously diabetic rats. *Int J. Biochem Cell Biol* 38: 2196-2208, 2006.
4. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820, 2001.
5. Carlsson C, Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140: 3422-3428, 1999.
6. Clerch LB, Massaro D. Tolerance of rats to hyperoxia lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest* 91: 499-508, 1993.
7. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16: 253-264, 2006.
8. Dionne KE, Colton CK, Yarmuch ML. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 42:12-21, 1993.
9. Dolz M, Bailbé D, Giroix MH, Calderari S, Gangnerau MN, Serradas P, Rickenbach K, Irminger JC, Portha B. Restitution of defective glucose-stimulated insulin secretion in diabetic GK rat by acetylcholine uncovers paradoxical stimulatory effect of  $\beta$ -cell muscarinic receptor activation on cAMP production. *Diabetes* 54: 3229-3237, 2005.
10. Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med* 81: 455-470, 2003.
11. Donath MY, Størling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and  $\beta$ -cell biology: from concept to clinical translation. *Endocrine Reviews* 29: 334-350, 2008.
12. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415: 96-99, 2002.
13. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Ellingsgaard H, Schneider MKJ, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56: 2356-2370, 2007.
14. Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 438-447, 1999.
15. Elouil H, Cardozo AK, Eizirik DL, Henquin JC, Jonas JC. High glucose and hydrogen peroxide increase c-Myc and haeme-oxygenase 1 mRNA levels in rat pancreatic islets without activating NF $\kappa$ B. *Diabetologia* 48: 496-505, 2005.
16. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes* 52:1-8, 2003.
17. Frayon S, Pessah M, Giroix MH, Mercan D, Boissard C, Malaisse WJ, Portha B, Garel JM. Gaolf identification by RT-PCR in purified normal pancreatic B cells and in islets from rat models of non-insulin dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Com* 254: 269-272, 1999.
18. Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C. A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. *J Exp Med* 190: 1135-1146, 1999.
19. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91:807-819, 2006.
20. Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger JC, Rickenbach K, Gangnerau MN, Coulaud J, Dolz M, Halban P, Portha B, Serradas P. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of T2D, the Goto-Kakizaki (GK) rat: potential role of islet microangiopathy. *Diabetes* 55:1625-1633, 2006.
21. Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144: 1444-1455, 2003.

22. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48 : 927-932, 1999.
23. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic  $\beta$  cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274: 14112-14121, 1999.
24. Jonas JC, Laybutt DR, Steil GM, Trivedi N, Pertusa JG, Van de Casteele M, Weir GC, Henquin JC. High Glucose Stimulates Early Response Gene c-Myc Expression in Rat pancreatic  $\beta$  cells *J Biol Chem* 276: 35375-35381, 2001.
25. Jonas JC, Guiot Y, Rahier J, Henquin JC. Haeme-oxygenase 1 expression in rat pancreatic  $\beta$  cells is stimulated by supraphysiological glucose concentrations and by cyclic AMP. *Diabetologia* 46:1234-1244, 2003.
26. Kaelin Jr WG. ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell Metab* 1: 357-358, 2005.
27. Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Naoyuki Taniguchi N. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 320: 855-863, 1996.
28. Koh G, Suh KS, Chon S, Oh S, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS. Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage in pancreatic  $\beta$ -cells. *Arch Biochem Biophys* 438: 70-79, 2005.
29. Krikos A, Laherty CD, Dixit VM. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267: 17971-17976, 1992.
30. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278: 8135-8145, 2003.
31. Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, Schaffer JE, McDaniel ML. cAMP dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 279: 8938-8945, 2004.
32. Lai CC, Peng M, Huang L, Huang WH, Chiu TH. Chronic exposure of neonatal cardiac myocytes to hydrogen peroxide enhances the expression of catalase. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1157-1163, 1996.
33. Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5987-5991, 1994.
34. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to  $\beta$ -cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51: 413-423, 2002.
35. Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, Weir GC. Critical reduction in  $\beta$ -cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes *J Biol Chem* 278: 2997-3005, 2003.
36. Li LX, Skorpen F, Egeberg K, Hals-Jorgensen I, Grill V. Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal  $\beta$ -cells. *Biochem Biophys Res Comm* 282: 273-277, 2001.
37. Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice. Reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 55:1592-1604, 2006.
38. Lindenboim L, Haviv R, Stein R. Inhibition of drug-induced apoptosis by survival factors in PC 12 cells. *J Neurochem* 64: 1054-1063, 1995.
39. Ling Z, Van de Casteele M, Eizirik DL, Pipeleers DG. Interleukin-1 $\beta$  induced alteration in a  $\beta$ -cell phenotype can reduce cellular sensitivity to conditions that cause necrosis but not to cytokine-induced apoptosis. *Diabetes* 49: 340-345, 2000.
40. Lortz S, Tiedge M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* 34: 683-688, 2003.
41. Mandrup-Poulsen T. B-cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes* 50(Suppl 1): S58-S63, 2001.

42. Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stange G, Van de Casteele M, Pipeleers D. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic  $\beta$  cells. *J Biol Chem* 280: 20389-20396, 2005.
43. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR. 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: 359-369, 2007.
44. Movassat J, Saulnier C, Serradas P, Portha B. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 40: 916-925, 1997.
45. Movassat J, Portha B. Beta-cell growth in the neonatal Goto-Kakizaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia* 42: 1098-1106, 1999.
46. Movassat J, Calderari S, Fernandez E, Martin MA, Escriva F, Plachot C, Gangnerau MN, Serradas P, Alvarez C, Portha B. Type 2 diabetes – a matter of failing  $\beta$ -cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes, Obesity, Metabolism* 9 (Suppl 2): 187-195, 2007.
47. Movassat J, Portha B. Early administration of keratinocyte growth factor improves  $\beta$ -cell regeneration in rats with streptozotocin induced diabetes. *J Endocrinology* 195: 333-340, 2007.
48. Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 583: 9-24, 2007.
49. Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol* 279: L1029-L1037, 2000.
50. Persaud S, Burns CJ, Belin V, Jones P. Glucose-induced regulation of Cox-2 expression in human islets of Langerhans. *Diabetes* 53(Suppl1): S190-S192, 2004.
51. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattani P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 50: 1983-1991, 2001.
52. Portha B, Giroix MH, Serradas P, Gangnerau MN, Movassat J, Rajas F, Bailbé D, Plachot C, Mithieux G, Marie JC.  $\beta$ -cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50(Suppl 1): S89-S93, 2001.
53. Portha B. Programmed disorders of  $\beta$ -cell development and function as one cause for type 2 diabetes ? The GK rat paradigm. *Diab Metab Res Rev* 21: 495-504, 2005.
54. Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix M-H, Bailbé D, Gangnerau M-N, Dolz M, Tourrel-Cuzin C, Movassat J. The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human  $\beta$ -cell in type 2 diabetes ? *Mol Cell Endocrinol* (July 1, 2008). doi.org/10.1016/j.mce.2008.06.013
55. Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Bécard D, Gjinovci A, Keller PA, Wollheim CB, Herrera P, Muzzin P, Assimakopoulos-Jeannet F. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* 50: 84-93, 2007.
56. Rius J, Gula M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF- $\kappa$ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF- $\alpha$ . *Nature* 453: 807-812, 2008.
57. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poynter V.  $\beta$ -Cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53(Suppl 1): S119-S124, 2004.
58. Robertson RP, Harmon JS. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet  $\beta$  cell. *Free Radic Biol Med* 41:177-184, 2006.
59. Rukenstein A, Rydel RE, Greene LA. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. *J Neuroscience* 17: 2552-2583, 1991.
60. Sarkar SA, Gunter J, Bouchard R, Reusch JEB, Wiseman A, Gill RG, Hutton JC, Pugazhenth S. Dominant negative mutant forms of the cAMP response element binding protein induce apoptosis and decrease the anti-apoptotic action of growth factors in human islets. *Diabetologia* 50: 1649-1659, 2007.
61. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258, 1991.
62. Seo YJ, Lee JW, Lee EH, Lee HK, Klim HW, Kim YH. Role of glutathione in the adaptive tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radical Biology Medicine* 37: 1272-1281, 2004.

63. Shanmugam N, Todorov IT, Nair I, Omori K, Reddy MA, Natarajan R. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic islets treated with high glucose or ligands of the advanced glycation endproduct-specific receptor (AGER), and in islets from diabetic mice. *Diabetologia* 49: 100-107, 2006.
64. Tabatabaie T, Vasquez-Weldon A, Moore DR, Kotake Y. Free radicals and the pathogenesis of type 1 diabetes:  $\beta$ -cell cytokine-mediated free radical generation via cyclooxygenase-2. *Diabetes* 52:1994-1999, 2003.
65. Tacchini L, Fusar-Poli D, Bernelli-Zazzera A. Activation of transcription factors by drugs inducing oxidative stress in rat liver. *Biochem Pharmacol* 63: 139-148, 2002.
66. Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic  $\beta$  cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12363-12368, 2002.
67. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46: 1733-1742, 1997.
68. Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, Alcalde L, Martí M, Costa M, Serradell, L, Dominguez O, Fernández-Llamazares J, Julian JF, Sanmartí A, Pujol-Borrell, R. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 65: 722-727, 1998.
68. Wang RN, Rosenberg L. Maintenance of  $\beta$ -cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol* 163: 181-190, 1999.
70. Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sciences* 30: 453-461, 2005.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.  $\beta$ -cell death is normal in diabetic GK/Par islets.**  $\beta$ -cell apoptosis in freshly isolated islets was determined by double-immunostaining for TUNEL (brown, arrows) and insulin (pink); original magnification  $\times 500$  (*A* and *B*). Islet total RNA was extracted, and expression for genes encoding pro-/anti-apoptotic proteins (*C*) or pro-/anti-oxidant proteins (*D*) was determined by real-time RT-PCR and expressed as percentage of rpL19 mRNA levels. Data are the means  $\pm$  SEM for 3–6 independent experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group.

**Fig. 2. Culture conditions activate  $\beta$ -cell death in both Wistar and diabetic GK/Par islets.** Islets were cultured for 24h in RPMI (10 mmol/l glucose) and  $\beta$ -cell apoptosis was determined by double-immunostaining for TUNEL (brown, arrows) and insulin (pink); original magnification  $\times 250$  (*A* and *B*). At the end of the 24h culture, islet total RNA was extracted, and expression for genes encoding pro-/anti-apoptotic proteins (*C*) or pro-/anti-oxidant proteins (*D*) was determined by real-time RT-PCR and expressed as percentage of rpL19 mRNA. Data are the means  $\pm$  SEM for 3 independent experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group.

**Fig. 3. Diabetic GK/Par  $\beta$ -cells are resistant to  $H_2O_2$ -activated cell death, in a cAMP-dependant manner.** Islets were cultured for 24h in RPMI-G10 in the absence or presence of the cAMP analogue dibutyrylcAMP (dbcAMP, 1 mmol/l) or the adenylyl cyclase inhibitor 2',5'-dideoxy-adenosine (dd-Ado, 100  $\mu$ mol/l), and  $\beta$ -cell apoptosis was determined by double-immunostaining for TUNEL (brown, arrows) and insulin (pink); original magnification  $\times 250$  (*A-C*). Before cultures, the fresh islets were acutely exposed (30 min) to vehicle or 50  $\mu$ mol/l  $H_2O_2$  in the absence or presence of dbcAMP or dd-Ado. Data are the means  $\pm$  SEM for 2–4 independent experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group; † $p < 0.05$  vs. vehicle for the same group.

**Fig. 4. Expression of cAMP-related genes is upregulated in diabetic GK/Par islets.** Islet total RNA was extracted, and expression for genes encoding proteins related to control of cAMP metabolism in freshly (*A*) or 24h-cultured islets (*B*), was determined by real-time RT-PCR and expressed as percentage of rpL19 mRNA. The relative changes of expression for these genes, due to culture conditions in both Wistar and GK/Par groups, is shown in panel *C*. Data are the means  $\pm$  SEM for 6 independent experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group. † $p < 0.05$  vs. fresh islets within the same experimental group.

**Fig. 5. Expression of survival, oxidative stress response and cAMP-related genes is upregulated in GK/Par islets only after diabetes onset.** Islet total RNA was extracted, and expression for genes encoding pro-/anti-apoptotic proteins (*A*) or pro-/anti-oxidant proteins (*B*) or proteins related to control of cAMP metabolism in freshly islets from 7-day-old (D7) GK/Par (prediabetic) and Wistar rats, was determined by real-time RT-PCR and expressed as percentage of rpL19 mRNA. Data are the means  $\pm$  SEM for 3 independent experiments in each group. \* $p < 0.05$  vs. age-matched Wistar group.

### Supplement data

**Fig. S1. Culture conditions activate stress gene response in Wistar and diabetic GK/Par islets.** Expression for genes encoding pro-/anti-apoptotic proteins (*A*) or pro-/anti-oxidant proteins (*B*) at the end of the 24h culture was derived from mRNA values as given in Fig. 1 (*C* and *D*) and Fig. 2 (*C* and *D*), and was calculated as percentage of basal expression value before cultures. Data are the means  $\pm$  SEM for 3 independent experiments in each group. † $p < 0.05$  vs. fresh islets in the same group of rats.

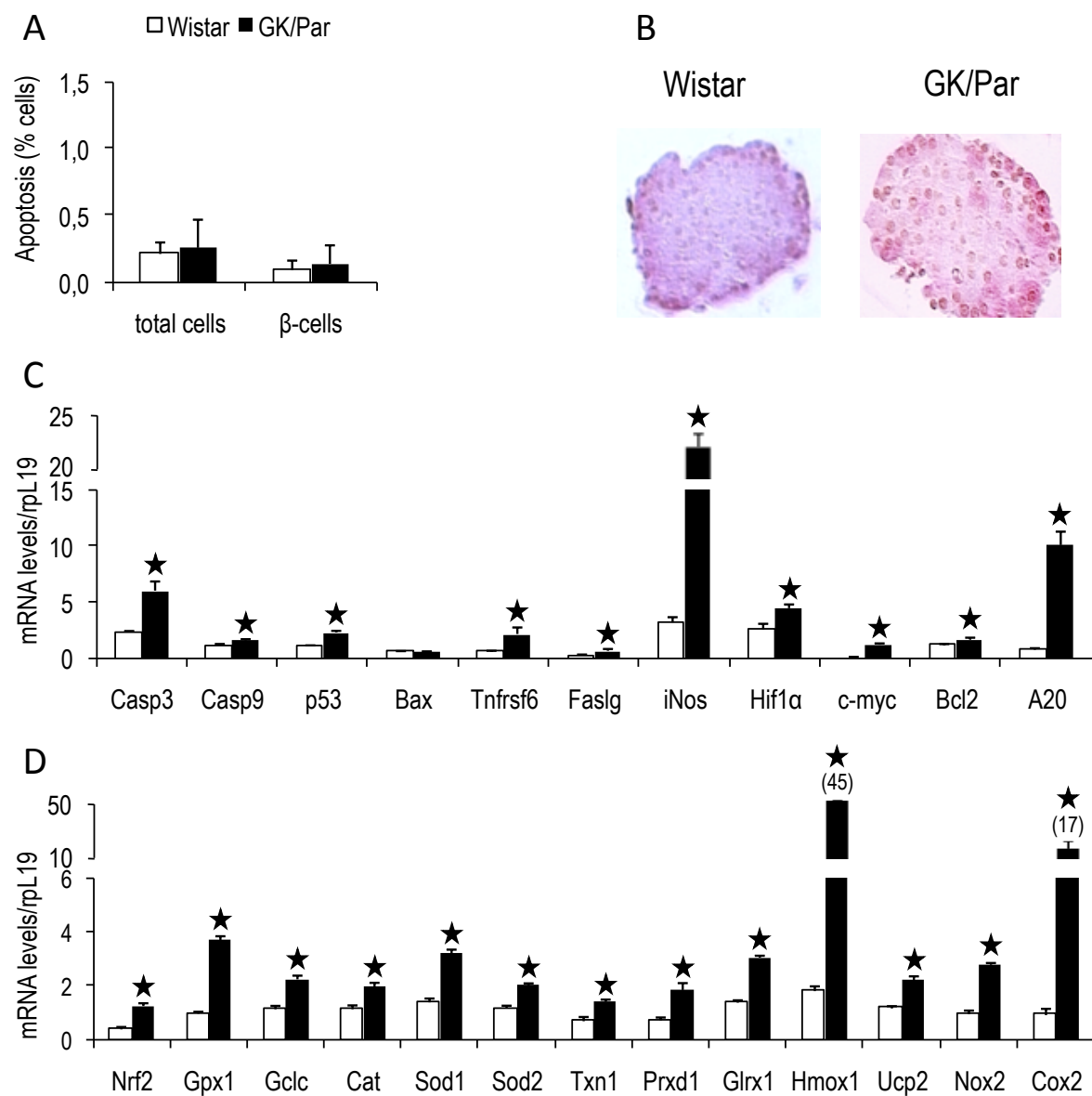


Fig. 1. β-cell death is normal in diabetic GK/Par islets.

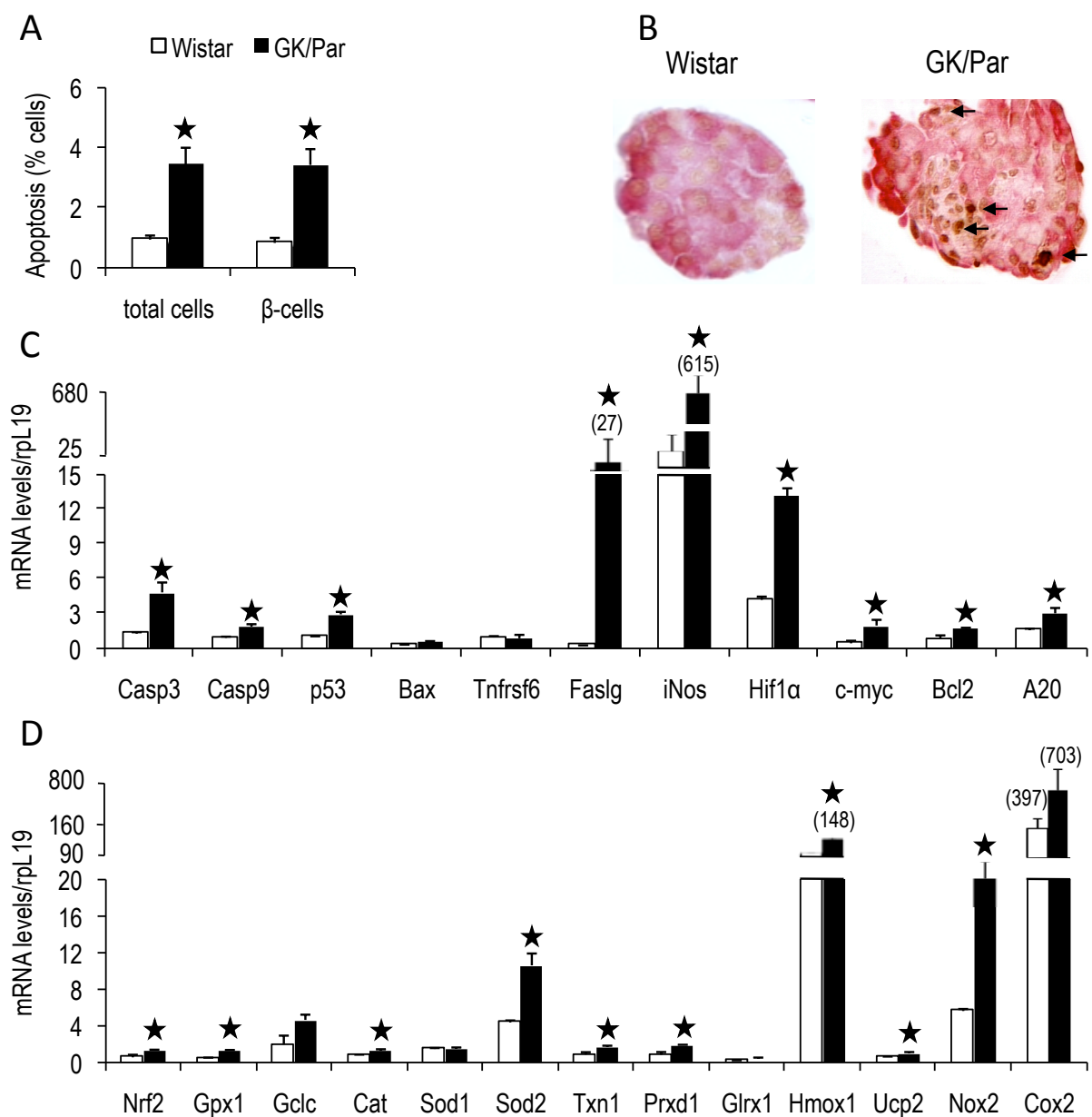


Fig. 2. Culture conditions activate  $\beta$ -cell death in both Wistar and diabetic GK/Par islets.

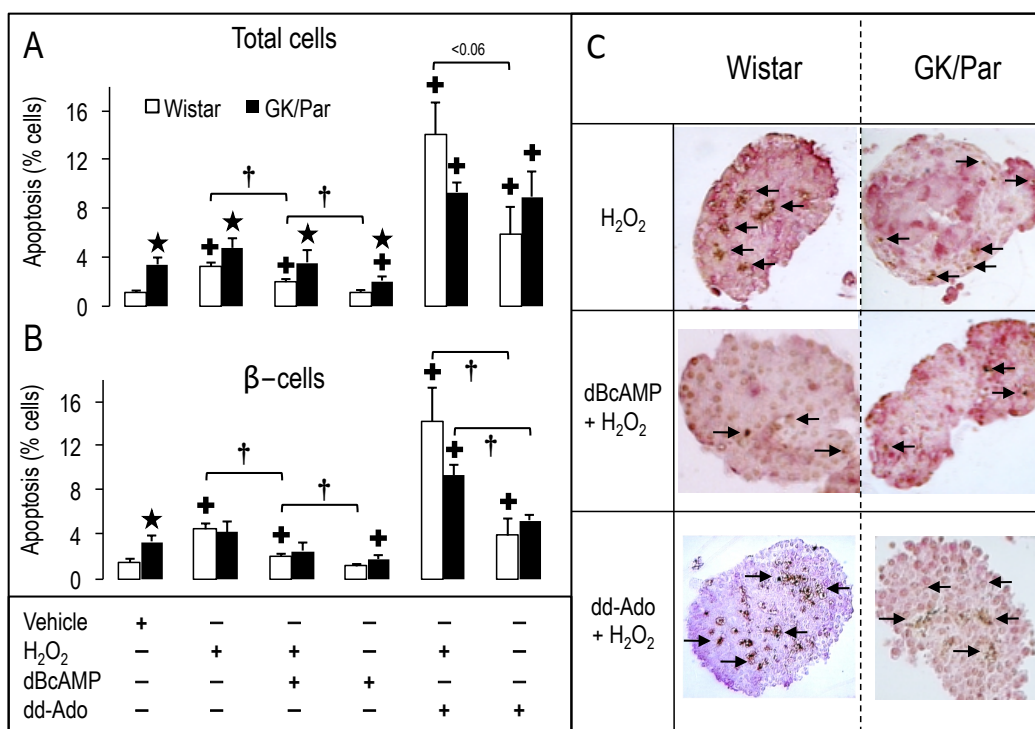


Fig. 3. Diabetic GK/Par  $\beta$ -cells are resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated cell death, in a cAMP-dependant manner.



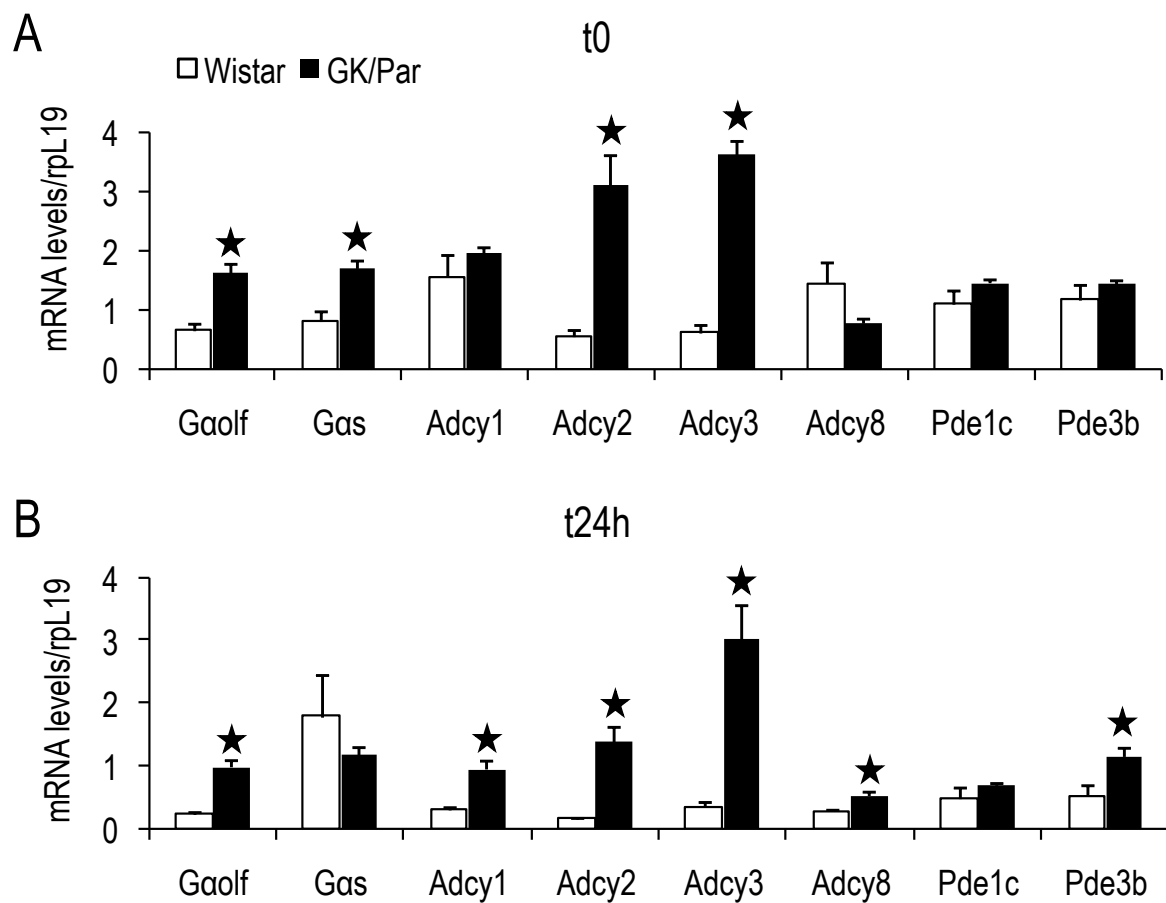


Fig. 4. Expression of cAMP-related genes is upregulated in diabetic GK/Par islets.

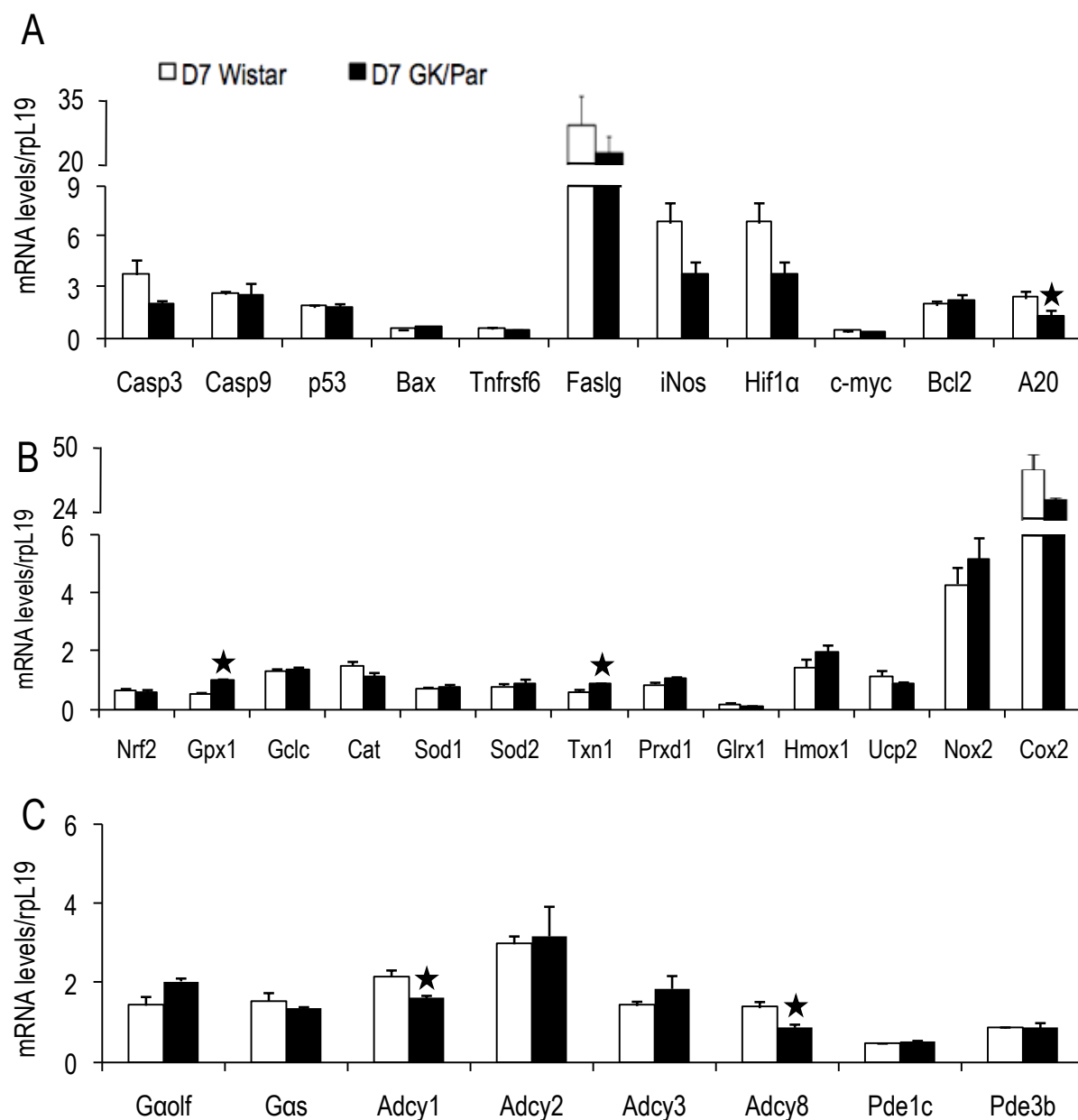


Fig. 5. Expression of survival, oxidative stress response and cAMP-related genes is upregulated in GK/Par islets only after diabetes onset.

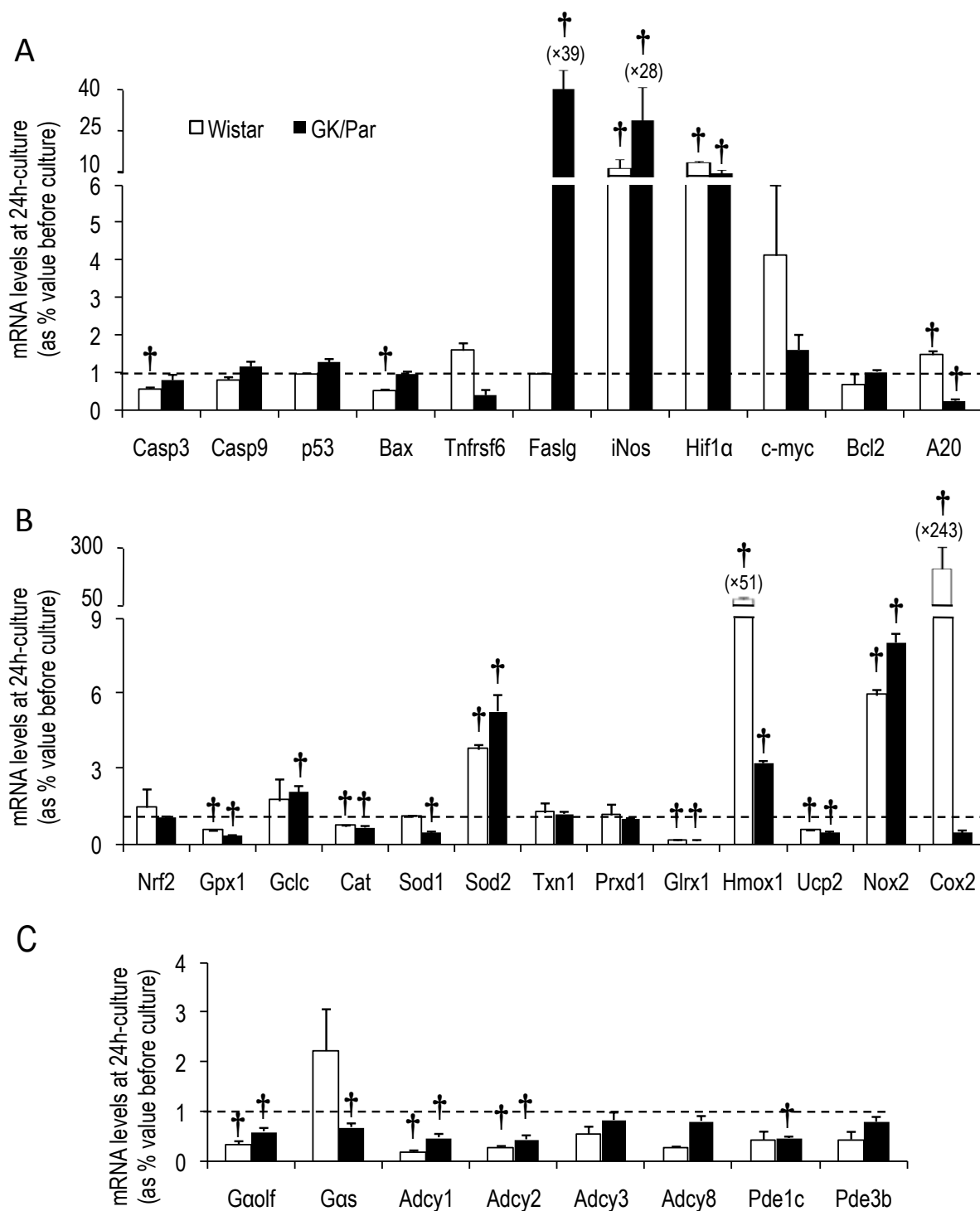
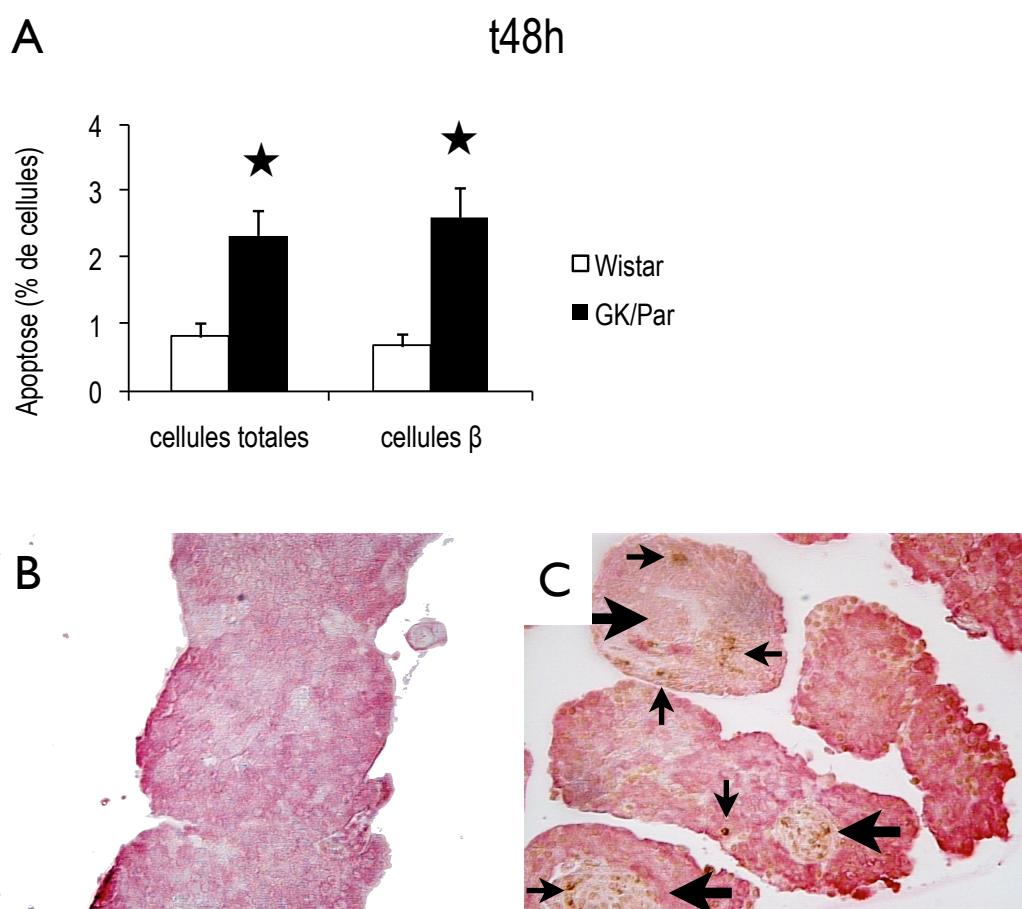


Fig. S1. Culture conditions activate stress gene response in Wistar and diabetic GK/Par islets.

## 2.4. Résultats complémentaires

## 2.4.1. Autres gènes liés à la l'apoptose après 48h de culture

Après 48h de culture (conditions de cultures similaires aux cultures de 24h, cf. *Méthodes* de l'Article 2), les cellules  $\beta$  GK/Par présentent une apoptose trois fois plus élevée (Fig. R4). Lors de ces expériences, nous avons également relevé la présence de foyers hypoxiques et/ou fibrotiques dans les îlots GK/Par. Par ailleurs, nous avons montré que les cellules  $\beta$  GK/Par présentent le même profil de résistance à l' $H_2O_2$  qu'après 24h de culture (Table R2). La comparaison des données à 24h et 48h indique que les pourcentages d'apoptose sont plus faibles à 48h. Il est possible que l'apoptose soit sous-estimée à 48h, en raison d'une augmentation de cellules nécrosées (la nécrose n'est pas marquée par notre kit de mesure de l'apoptose *Apoptag*).



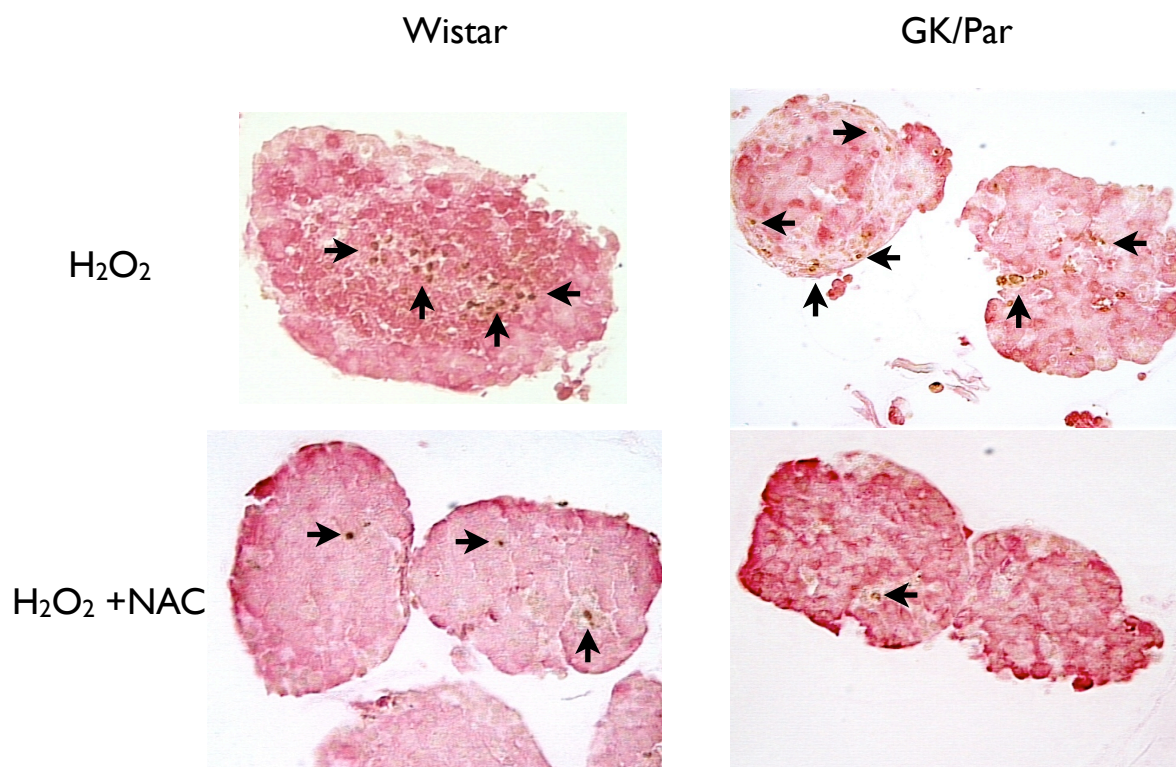
**Fig. R4. Augmentation de l'apoptose des cellules  $\beta$  GK/Par après 48h de culture.** Les îlots de rats Wistar et GK/Par ont été cultivés 48h en présence de RPMI glucose 11 mmol/l ; l'apoptose des cellules  $\beta$  a été déterminée par co-marquage insuline-TUNEL (pour plus de détails, cf. *Méthodes* Article 2). Les "petites flèches" indiquent la présence de noyaux apoptotiques ; les "grosses flèches" indiquent la présence probable de foyers hypoxiques et/ou fibrotiques dans les îlots GK/Par. Les valeurs s'appliquant à l'apoptose représentent le pourcentage de cellules  $\beta$  apoptotiques par rapport aux cellules  $\beta$  totales. B, îlots Wistar ; C, îlots GK/Par. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. Environ 300 cellules  $\beta$  et 500 cellules totales ont été comptées par îlot (2–9 îlots par section), et 19–30 différentes sections ont été analysées pour chaque expérience indépendante. Grossissement  $\times 500$  (B) ;  $\times 250$  (C, D, E). \* $p < 0,05$  vs. Wistar.

## 2.4.2. Effets anti-apoptotiques d'un antioxydant (NAC)

Après 24h ou 48h de culture, l'apoptose  $\beta$ -cellulaire induite par l' $H_2O_2$  est prévenue par un antioxydant (NAC) dans les deux groupes d'animaux (Table R2 et Fig. R5). La NAC, seule, diminue l'apoptose  $\beta$ -cellulaire spontanée (sans  $H_2O_2$ ) dans les îlots GK/Par cultivés 24h.

temps de culture	condition	apoptose Wistar (% cellules $\beta$ )	apoptose GK/Par (% cellules $\beta$ )
24h	véhicule	0,83 $\pm$ 0,17	3,43 $\pm$ 0,53* <sup>€</sup>
24h	$H_2O_2$	4,51 $\pm$ 0,52 <sup>+†</sup>	4,27 $\pm$ 0,95 <sup>†</sup>
24h	NAC	0,99 $\pm$ 0,30	0,96 $\pm$ 0,34 <sup>+</sup>
24h	$H_2O_2$ + NAC	1,43 $\pm$ 0,23	1,27 $\pm$ 0,20
48h	véhicule	0,81 $\pm$ 0,21	2,33 $\pm$ 0,37*
48h	$H_2O_2$	2,06 $\pm$ 0,32 <sup>+†</sup>	2,13 $\pm$ 0,47 <sup>†</sup>
48h	$H_2O_2$ + NAC	1,11 $\pm$ 0,34	0,85 $\pm$ 0,25

**Table R2. Modulation de l'apoptose  $\beta$ -cellulaire par des agents pro- ( $H_2O_2$ ) et/ou anti-oxydants (NAC) dans les îlots Wistar et GK/Par cultivés 24h ou 48h.** Les îlots de rats Wistar et GK/Par ont été cultivés 24h ou 48h en présence de RPMI glucose 11 mmol/l ; l'apoptose des cellules  $\beta$  a été déterminée par co-marquage insuline-TUNEL (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 2) avec ou sans N-acetyl-L-cystéine (NAC, 1 mmol/l). Dans certaines conditions, une pré-exposition à l' $H_2O_2$  (50  $\mu$ mol/l, 30 min) a été effectuée avec ou sans NAC. Les valeurs s'appliquant à l'apoptose représentent le pourcentage de cellules  $\beta$  apoptotiques par rapport aux cellules  $\beta$  totales. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 2–4 expériences indépendantes. Environ 300 cellules  $\beta$  et 500 cellules totales ont été comptées par îlot (2–9 îlots par section), et 11–32 différentes sections ont été analysées pour chaque expérience indépendante. \* $p < 0,05$  vs. Wistar ; + $p < 0,05$  vs. véhicule ; † $p < 0,05$  vs. NAC +  $H_2O_2$  ; € $p < 0,05$  vs. NAC.

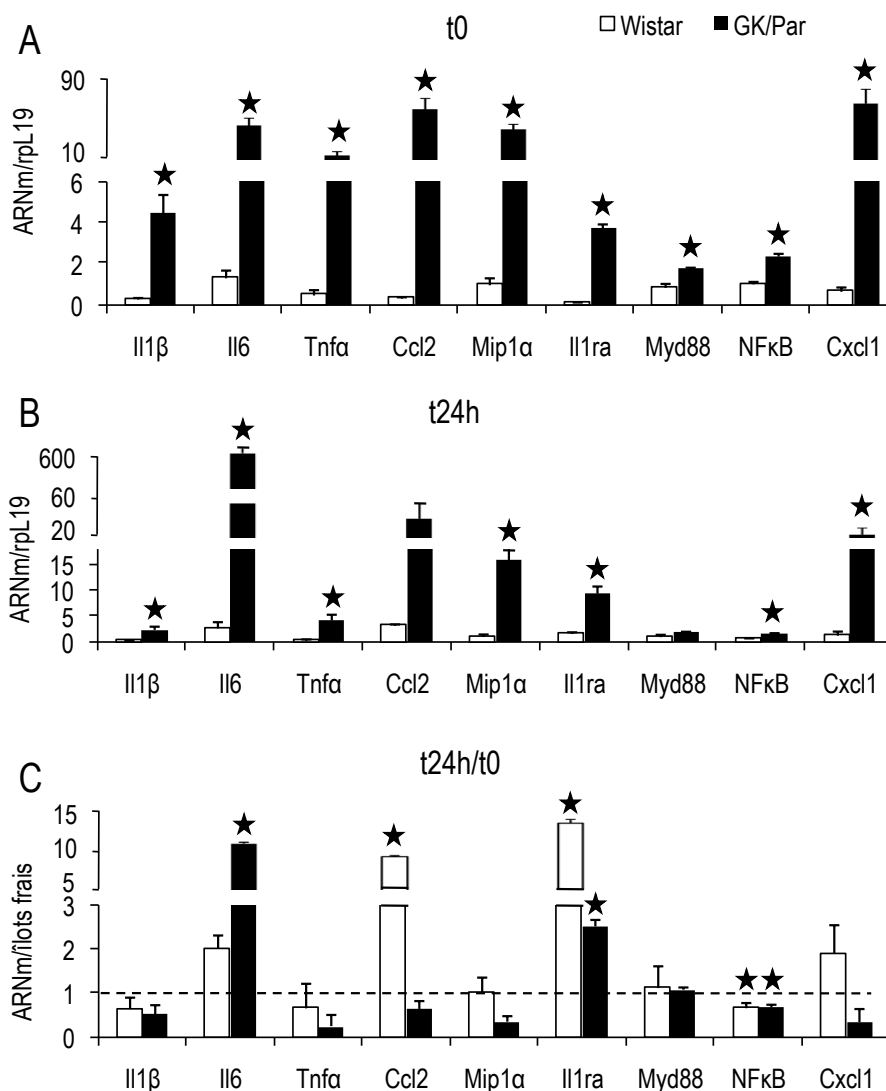


**Fig. R5. Effets préventifs d'un antioxydant (NAC) sur l'apoptose  $\beta$ -cellulaire induite par l' $H_2O_2$  après 24h de culture dans les îlots Wistar et GK/Par.** Ces images sont représentatives des données montrées en Table R2. Les flèches indiquent la présence de noyaux apoptotiques. Grossissement  $\times 250$ . NAC, N-acetyl-L-cystéine.

### 2.4.3. Évolution de l'inflammation insulaire *in vitro*

#### 2.4.3.1. Expression des gènes pro-inflammatoires

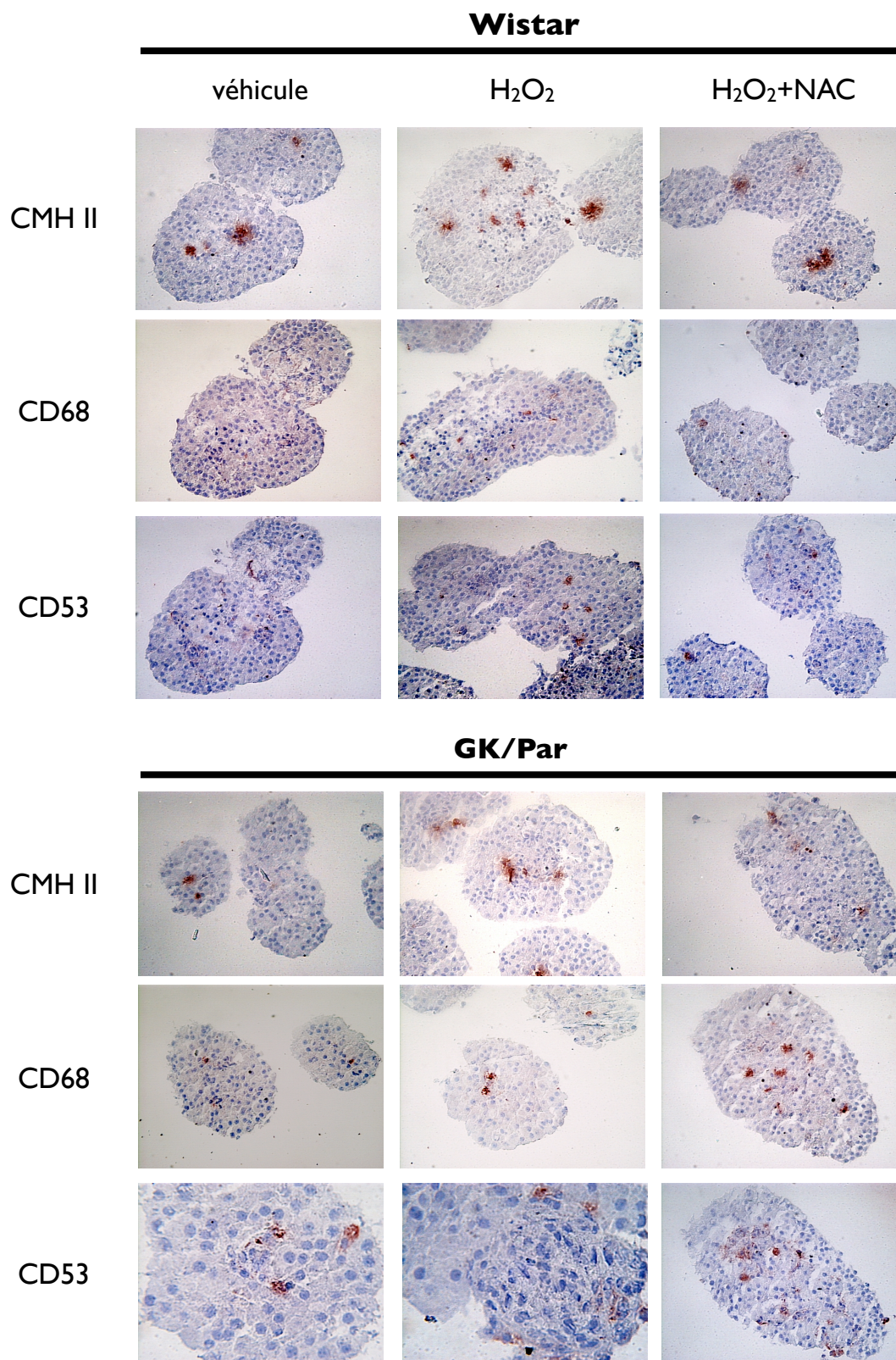
Nous avons effectué des mesures d'expression de gènes pro-inflammatoires, en parallèle des autres familles de gènes, car nous pensons qu'ils occupent un place significative dans les adaptations au stress oxydant (Articles 3 et 4). Outre l'activation de cette famille de gènes dans les îlots GK/Par fraîchement isolés (Fig. R6A et Article 4), la plupart de ces gènes restent surexprimés après 24h de culture par rapport au Wistar (Fig. R6B). Les conditions de culture activent les gènes *Il6* et *Il1ra* dans le groupe GK/Par, et les gènes *Ccl2* (ou *Mcp1*) et *Il1ra* dans le groupe Wistar (Fig. R6C). En revanche, *NF- $\kappa$ B* est diminué après les 24h de culture dans les deux groupes de rats.



**Fig. R6. Effets des conditions de culture sur l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les îlots Wistar et GK/Par.** L'ARN total des îlots a été extrait de groupes d'îlots de rats Wistar et GK/Par fraîchement isolés (panel A) ou cultivés 24h (panel B). L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 2). Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage *rpL19*. Le profil d'expression du panel C dérive des panels A et B (ratio des ARNm des îlots cultivés 24h par rapport aux îlots frais). Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 6 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  vs. Wistar.

#### 2.4.3.2. Immunolocalisation de l'inflammation *in vitro*

Après les 24h de culture, nous avons identifié des marqueurs de cellules présentatrices d'antigènes (Fig. R7). La présence du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), marqueur classique des macrophages et/ou lymphocytes B, a été mise en évidence dans les îlots cultivés Wistar et GK/Par. Les lymphocytes B sont très rarement observés à cet âge chez le rat GK/Par, et ils sont absents chez le Wistar (Ehse *et al.*, 2007b). Des macrophages (CD68) et des précurseurs de cellules myéloïdes (CD53) sont présents après culture, quelle que soit la condition d'incubation et ce, dans les deux groupes de rats.



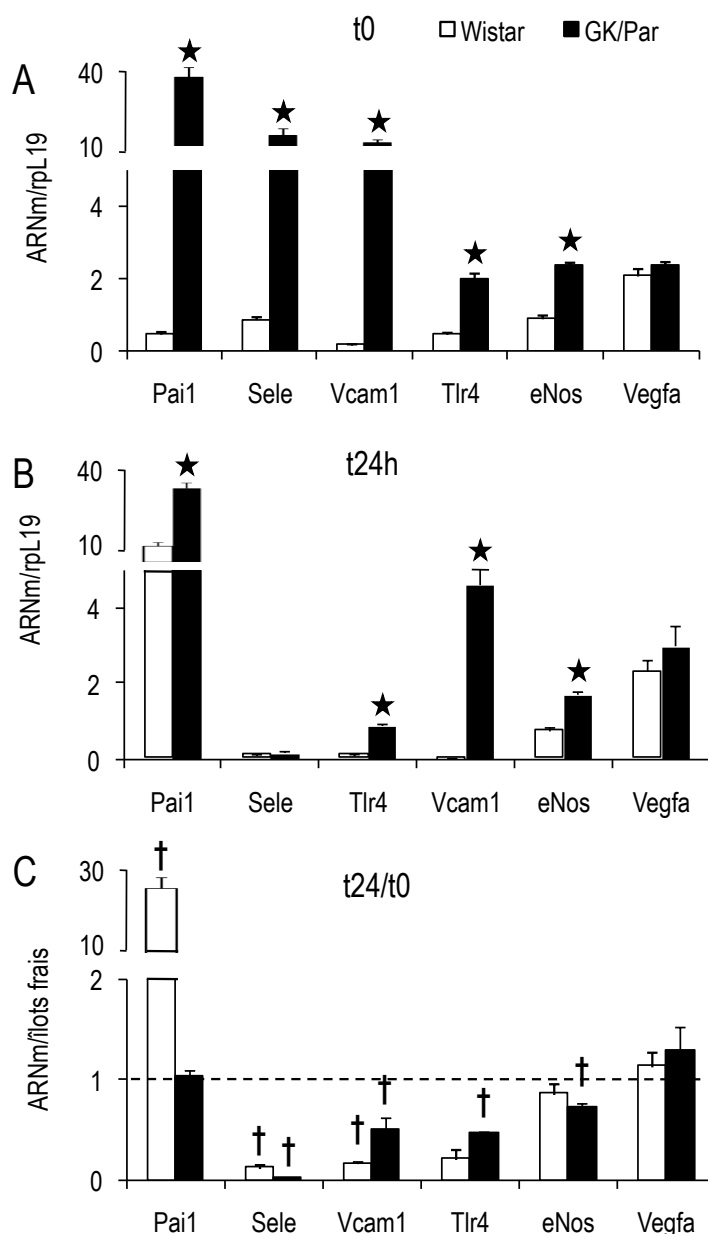
**Fig. R7. Effets des conditions de 24h de culture sur l'induction des marqueurs de l'inflammation dans les îlots Wistar et GK/Par.** Ces images sont tirées des expériences analysées en Table R2. Pour plus de détails sur les marqueurs et la préparation des sections pancréatiques, cf. Homo-Delarche et al., 2006. CD68 marque les macrophages et CD53 marque les globules blancs (lignée myéloïde). CMH II, complexe majeur d'histocompatibilité de type II ; NAC, N-acetyl-L-cysteine.



2.4.4. Évolution de l'activation endothéliale *in vitro*

2.4.4.1. Expression des gènes de l'endothélium

De nombreux gènes impliqués dans la vascularisation et l'activation endothéliale sont surexprimés dans les îlots frais GK/Par (Fig. R8A et Article 3). Les conditions de culture activent l'expression du gène Pai1 dans les îlots Wistar, diminuent celle de Sele, Vcam1 et Tlr4 dans les îlots Wistar et GK/Par, et celle de eNos dans le groupe GK/Par seulement. Néanmoins le profil global reste surexprimé après 24h de culture dans le groupe GK/Par (Fig. R8B, C). L'activation du gène Hif-1 $\alpha$  (déjà présenté dans la partie Résultats principaux, Fig. S1) dans les deux groupes de rats, reflète également l'activation endothéliale.

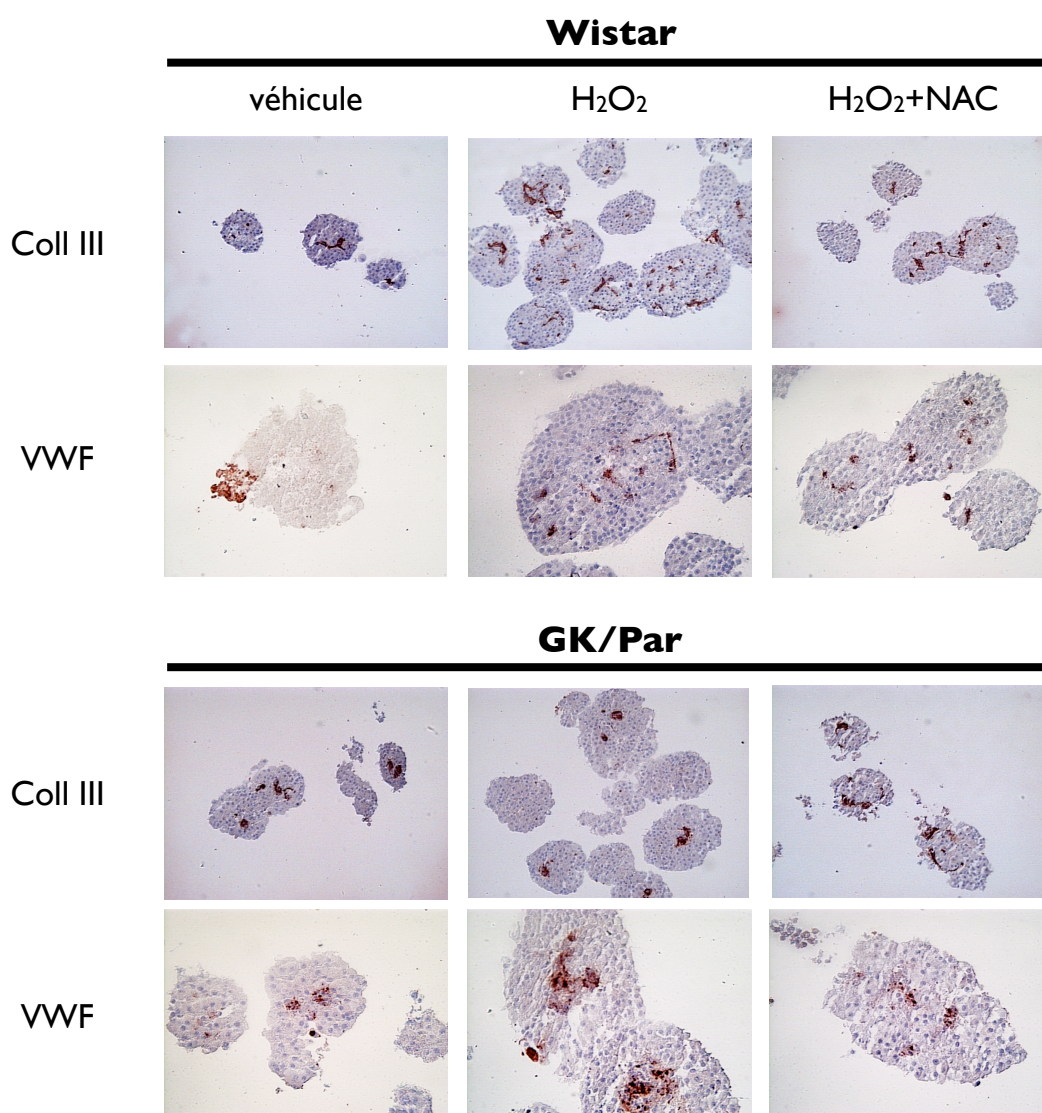


**Fig. R8. Effets des conditions de 24h de culture sur l'expression des gènes de l'activation endothéliale dans les îlots Wistar et GK/Par.** L'ARN total des îlots a été extrait de groupes d'îlots de rats Wistar et GK/Par fraîchement isolés (panel A) ou cultivés 24h (panel B). L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 2). Les résultats sont normalisés par rapport au

gène de ménage *rpL19*. Le profil d'expression du panel C dérive des panels A et B (ratio des ARNm des îlots cultivés 24h par rapport aux îlots frais). Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 6 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  vs. Wistar.

#### 2.4.4.2. Immunolocalisation de l'activation endothéliale *in vitro*

Après les 24h de culture, nous avons identifié des marqueurs de la matrice extracellulaire (MEC) et de l'endothélium. La Fig. R9 montre la présence de collagène de type III (Coll III) (MEC) et du facteur de Von Willebrand (VWF), un marqueur spécifique de la cellule endothéliale, principalement dans les îlots GK/Par cultivés. Il est à noter que la mise en culture des îlots pendant 24h induit, quelles que soient les conditions d'incubation, un aspect très particulier de ces deux marqueurs par rapport aux îlot frais (*Homo-Delarche et al., 2006*). En effet, ces marqueurs semblent s'agglutiner comme s'il y avait une redistribution de protéines de la MEC et de l'endothélium.



**Fig. R9. Effets des conditions de 24h de culture sur l'induction de marqueurs vasculaires dans les îlots Wistar et GK/Par.** Ces images sont tirées des expériences analysées en Table R2. Pour plus de détails sur les marqueurs et la préparation des sections pancréatiques, cf. *Homo-Delarche et al., 2006*. Coll III, collagène de type III ; NAC, N-acetyl-L-cystéine ; VWF, facteur de Von Willebrand. Grossissement  $\times 250$ .

## 2.4.5. Effets d'un antioxydant sur l'induction des gènes de stress

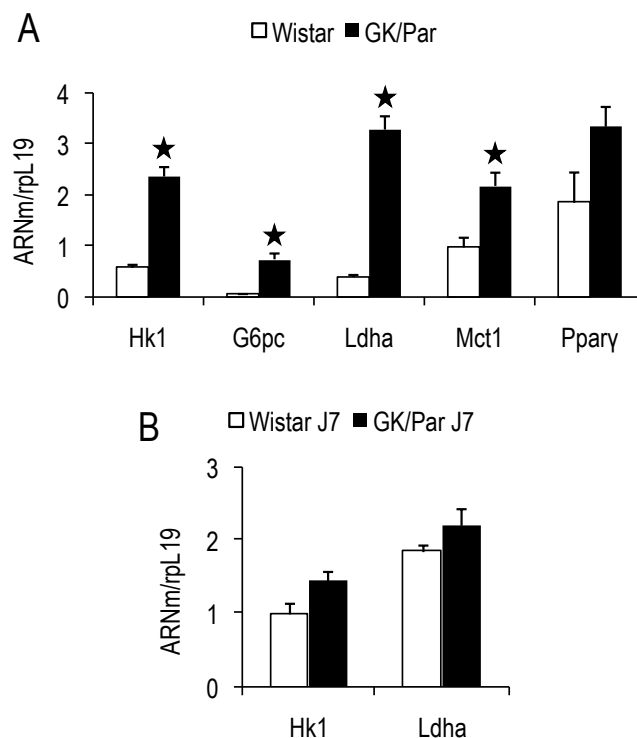
À 24h de culture, les effets préventifs de la NAC sur l'apoptose, induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sont accompagnés d'une diminution de l'expression des gènes de stress (Table R3). Nous avons noté des différences significatives dans les effets préventifs de la NAC (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NAC), ainsi que de nombreuses tendances (Nox2, Cox2, Il6, Tlr4, Pai1 ;  $p \leq 0.07$ ) dans le groupe GK/Par, essentiellement. La faible puissance statistique de ces derniers résultats résulte probablement du faible nombre d'échantillons de nos séries d'îlots cultivés ( $n=3$ ).

gène	ARNm véhicule	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC	ARNm véhicule	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC
	Wistar			GK/Par		
Nrf2	0,56 ± 0,28	0,77 ± 0,11	0,53 ± 0,30	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,91 ± 0,47
Gpx1	0,51 ± 0,02	0,44 ± 0,04	0,53 ± 0,01	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Gsr	2,2 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,8 ± 0,2	0,59 ± 0,07	0,65 ± 0,02	0,47 ± 0,12
Gclc	1,9 ± 1,0	2,2 ± 0,6	1,3 ± 0,9	4,7 ± 0,6	4,7 ± 0,4	3,4 ± 0,1
Cat	0,80 ± 0,06	0,94 ± 0,01	0,75 ± 0,10	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1*
Sod1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2
Sod2	4,4 ± 0,2	3,8 ± 0,4	3,7 ± 1,0	10,6 ± 1,3	9,3 ± 0,3	11,9 ± 1,3
Txn1	0,86 ± 0,27	1,2 ± 0,1	0,76 ± 0,31	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,4
Prxd1	0,83 ± 0,04	1,1 ± 0,0	0,61 ± 0,29	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,4
Glrx1	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,21 ± 0,07	0,44 ± 0,01	0,50 ± 0,05	0,59 ± 0,14
Ucp2	0,61 ± 0,04	0,65 ± 0,04	0,75 ± 0,10	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1
Hmox1	92,7 ± 0,9	94,6 ± 24,3	26,9 ± 5,2*	147,6 ± 3,8	149,5 ± 12,6	38,6 ± 4,0*
G6pdx	3,2 ± 0,3	3,3 ± 0,1	2,0 ± 0,3*	5,7 ± 0,5	6,2 ± 0,1	3,1 ± 0,2*
Me1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Idh1	0,70 ± 0,07	0,69 ± 0,03	0,67 ± 0,07	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,91 ± 0,10
Nox2	5,6 ± 0,2	3,7 ± 1,1	7,0 ± 1,3	22,4 ± 1,0	22,4 ± 3,7	13,5 ± 0,9
Cox2	4,2 ± 0,3	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,8	13,2 ± 0,6	13,9 ± 1,8	9,3 ± 1,6
Casp3	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	4,8 ± 0,8	4,9 ± 0,1	3,4 ± 0,4*
Casp9	0,92 ± 0,09	0,75 ± 0,01	0,66 ± 0,13	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2
p53	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,93 ± 0,10	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2*
Bax	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,49 ± 0,02

gène	ARNm véhicule	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC	ARNm véhicule	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ARNm H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC
Tnfrsf6	0,94 ± 0,12	0,54 ± 0,02	0,57 ± 0,12	0,88 ± 0,30	0,71 ± 0,12	0,65 ± 0,16
Faslg	0,26 ± 0,00	0,31 ± 0,10	0,18 ± 0,11	26,6 ± 4,4	28,3 ± 5,5	22,2 ± 4,8
Bcl2	0,80 ± 0,33	0,81 ± 0,03	0,69 ± 0,10	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,3	0,86 ± 0,08
A20	0,41 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,40 ± 0,11	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1*
Il1β	0,17 ± 0,08	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,10	2,3 ± 0,6	2,7 ± 0,8	1,6 ± 0,8
Il6	9,6 ± 4,5	8,72 ± 0,5	11,1 ± 9,6	1435 ± 388	1083 ± 190	327 ± 153
Tnfa	1,1 ± 0,6	0,69 ± 0,03	0,50 ± 0,40	18,9 ± 6,5	15,3 ± 4,5	6,2 ± 3,1
Ccl2	3,2 ± 0,2	2,2 ± 0,4	4,5 ± 0,8	42,9 ± 18,6	54,7 ± 22,3	41,1 ± 15,0
Mip1α	0,96 ± 0,49	0,80 ± 0,08	0,53 ± 0,26	15,8 ± 4,7	18,9 ± 6,3	10,1 ± 5,1
Il1ra	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,78 ± 0,59	9,4 ± 1,4	9,6 ± 0,9	4,0 ± 2,0
Myd88	0,93 ± 0,46	1,32 ± 1,18	1,31 ± 0,66	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,4 ± 0,7
NFκB	0,67 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,70 ± 0,14	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2
Cxcl1	1,2 ± 0,8	0,8 ± 0,1	1,2 ± 1,0	25,1 ± 7,5	19,8 ± 4,3	8,2 ± 4,0
Pai1	10,9 ± 1,3	7,4 ± 0,7	13,5 ± 4,5	32,31 ± 2,0	31,8 ± 4,7	19,7 ± 0,2
Tgfβ1	1,45 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,9 ± 0,1	10,5 ± 1,4	11,0 ± 1,7	9,0 ± 1,8
Sele	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,08	0,18 ± 0,03	0,27 ± 0,05	0,3 ± 0,0
Vcam1	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	4,6 ± 1,1	5,9 ± 1,7	6,2 ± 1,7
Tlr4	0,09 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,05	0,89 ± 0,04	0,88 ± 0,16	0,64 ± 0,32
eNos	0,74 ± 0,09	0,58 ± 0,06	0,61 ± 0,08	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,2
iNos	35,9 ± 10,0	23,1 ± 7,9	39,6 ± 18,2	615 ± 249	311 ± 32	9 ± 2*
Hif1α	4,2 ± 0,3	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,8	13,2 ± 0,6	13,9 ± 1,8	9,3 ± 1,6*
Vegfa	2,3 ± 0,3	1,9 ± 0,1	2,5 ± 0,6	3,0 ± 0,5	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,4

**Table R3. Effets préventifs d'un antioxydant sur l'activation de gènes de stress en réponse à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 24h de culture dans les îlots Wistar et GK/Par.** L'ARN total des îlots a été extrait de groupes d'îlots cultivés 24h dans les conditions présentées en Table R2. L'expression des différentes familles de gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 2). En jaune : gènes pro-/anti-oxydants ; en violet : gènes pro-/anti-apoptotiques ; en orange : gènes pro-/anti-inflammatoires ; en rouge : gènes de l'activation endothéliale/vascularisation. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage rpl19. Les données représentent des moyennes ± SEM de 3 expériences indépendantes.\*p<0.05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Enfin, nous avons évalué l'état de différenciation de l'îlot GK/Par, en déterminant les niveaux d'expression de différents gènes connus pour être faiblement exprimés dans l'îlot sain. Nous avons observé, dans l'îlot GK/Par, une activation de ces gènes tels que : hexokinase 1 (Hk1), glucose-6-phosphatase (G6pc), lactate-déshydrogénase A (Ldha), et transporteur de monocarboxylate 1 (Mct1) (Fig. R10). Dans l'îlot prédiabétique, au moins deux de ces gènes sont normalement exprimés (Hk1 et Ldha).



**Fig. R10. Surexpression des gènes impliqués dans la dé-différenciation  $\beta$ -cellulaire dans les îlots GK/Par.** L'ARN total des îlots a été extrait de groupes d'îlots fraîchement isolés de rats Wistar et GK/Par âgés de 2,5 mois ou de 7 jours (J7). L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 2). Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage rpL19. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 5 expériences indépendantes. \* $p < 0,05$  vs. Wistar J7.

## 2.5. Conclusions et points de discussion

Les résultats de cette seconde étude démontrent que la concentration intracellulaire en AMPc est cruciale pour protéger les cellules  $\beta$  de l'apoptose induite par le stress oxydant. Nous avons confirmé ce mécanisme dans la cellule  $\beta$  saine Wistar. En ce qui concerne l'animal DT2, nos résultats montrent non seulement qu'un mécanisme AMPc-dépendant fonctionne et protège du stress oxydant, mais aussi qu'il opère spontanément — par adaptation — dans la cellule  $\beta$ , lors du passage de la normoglycémie à l'hyperglycémie chronique. Ces résultats originaux apportent de nouveaux éléments de compréhension sur les adaptations permettant la survie de la cellule  $\beta$  diabétique, adaptations qui visent à contrer l'environnement pro-oxydant induit par l'environnement diabétique. Néanmoins, la signalisation intracellulaire cAMP-dépendante reste à approfondir. Notre étude valorise et renforce l'intérêt d'une approche thérapeutique basée sur l'utilisation des activateurs du récepteur du GLP1 pour faire face au stress oxydant  $\beta$ -pancréatique chez le patient DT2.

### 3. Microenvironnement favorable au stress oxydant dans l'îlot GK/Par. Rôle de l'IL-1

*Article 3 : Islet endothelial dysfunction and oxidative stress is reduced by IL-1Ra antagonism in the type 2 diabetic GK rat*

*Article 4 : IL-1 antagonism reduces hyperglycemia in the type 2 diabetic GK rat via islet and peripheral tissue anti-inflammatory actions*

#### 3.1. Questions posées

Des études récentes ont mis en évidence un processus inflammatoire, caractérisé par la production de cytokines/chimiokines, associée à une infiltration de cellules immunitaires (sources d'ERO), dans les deux composantes physiopathologiques du DT2 que sont la dysfonction insulaire et l'insulino-résistance. Chez le rat GK/Par, ce processus inflammatoire conduit à une fibrose insulaire et à la disparition des cellules  $\beta$  (Article 4 ; Homo-Delarche et al., 2006 ; Ehses et al., 2007a). L'inflammation est étroitement liée au stress oxydant et donc potentiellement aux adaptations qui en découlent. C'est pourquoi nous avons approfondi la caractérisation de l'inflammation insulaire du rat GK/Par et évalué le rôle de l'IL-1 dans ce processus à l'aide de l'antagoniste naturel de son récepteur : l'IL-1Ra. Ce travail nous a aussi conduit à envisager le rôle de l'inflammation induite par l'IL-1 comme facteur déterminant de l'insulino-résistance chez le rat GK/Par. Enfin, puisque notre hypothèse propose que la cellule endothéliale, cible privilégiée des attaques oxydatives, est à l'origine de ce processus inflammatoire insulaire, nous avons également étudié l'état d'activation endothéliale dans les îlots des rats GK/Par ainsi que l'effet du traitement par l'IL-1Ra sur cette éventuelle activation.

#### 3.2. Résultats principaux

##### 3.2.1. Paramètres périphériques du stress oxydant

Les paramètres circulants, chez le rat GK/Par diabétique (âgé de 2,5 mois), montrent une hyperleptinémie, une augmentation des lipides circulants (triglycérides, acides gras libres non estérifiés, cholestérol et HDL). Concomitamment, les niveaux plasmatiques d'homocystéine, un facteur athérosclérotique, sont diminués, alors que l'activité de la paraoxonase 1 (PON-1), un facteur antioxydant lié au HDL-cholestérol, est augmentée. Les niveaux de cytokines/chimiokines sont quant à eux normaux (Article 3, Table 2).

##### 3.2.2. Présence de marqueurs de l'inflammation et activation endothéliale insulaire

Dans les îlots fraîchement isolés de rats GK/Par diabétiques, nous avons mis en évidence, par RT-PCR quantitative, la surexpression de gènes de l'inflammation, en particulier ceux codant pour différentes cytokines/chimiokines, et une augmentation de leur libération après culture (Article 4, Fig. 1). L'hyperglycémie chronique est connue pour être associée à une inflammation endothéliale, reflétée par une augmentation de molécules inflammatoires (comme les molécules de l'adhésion cellulaire), de facteurs du système rénine-angiotensine, du stress oxydant, de médiateurs du tonus vasculaire, de cytokines/chimiokines et des toll-like récepteurs (TLR). Nous avons donc sélectionné 32 gènes codant pour les molécules appartenant à ces différentes familles (Article 3, Table 3). Vingt sept d'entre eux sont surexprimés dans les îlots GK/Par et concernent les familles suivantes : 1) le système fibrinolytique : Pai1 ; 2) l'adhésion cellulaire : Sele, Pecam1 et Vcam1 ; 3) le système rénine-angiotensine : Ace1 et Agtr1 ; 4) le tonus vasculaire : Cox2, eNos, Edn1, Hmox1 et Ptgis ; 5) l'angiogenèse : Hif1 $\alpha$  et Nox2 ; 6) les cytokines et facteurs de

croissance : Ilb1 $\beta$ , Il1ra, Il6, Tgf $\beta$  et Tnfa ; 7) les chimiokines : Cxcl1, Ccl2 et Ccl3 ; et 8) les voies intracellulaires et les récepteurs : Casp1, Tlr2, Tlr4, Myd88, NF $\kappa$ B et iNos. Ces résultats mettent donc en évidence que le processus inflammatoire insulaire est associé à une activation endothéliale marquée après 1,5 mois d'hyperglycémie modérée.

### 3.2.3. Effets de l'antagonisme de l'IL-1 sur l'inflammation, la dysfonction endothéliale, le stress oxydant et la fibrose

Il existe un lien étroit entre l'activation endothéliale, le stress oxydant et le mécanisme d'action des cytokines telles que l'IL-1 $\beta$  (Tran et al., 2004). L'IL-1 $\beta$  est produite, entre autre, par l'endothélium. Elle exerce des effets délétères et pléiotropiques sur les vaisseaux et est impliquée dans l'athérogenèse (Tedgui et Mallat, 2006). Son antagoniste, l'IL-1Ra, puissant agent anti-inflammatoire, a des effets bénéfiques sur l'homéostasie glucidique des patients diabétiques de type 2 et pourrait en avoir dans l'athérosclérose (Larsen et al., 2007 ; Sauter et al., 2008 ; Apostolakis et al., 2008). Nous avons donc évalué le rôle de l'IL-1 sur les modulations transcriptionnelles liées à l'activation endothéliale, au stress oxydant, ainsi que leurs répercussions sur l'inflammation, la vascularisation et la fibrose insulaire après traitement des rats GK/Par par l'IL-1Ra.

Les expériences *in vivo* montrent que le traitement par l'IL-1Ra pendant 4 semaines (du sevrage à l'âge de 2 mois), s'accompagne d'une réduction à la fois des concentrations de cytokines/chimiokines insulaires, de l'infiltration des cellules immunitaires et de l'expression de 83% des gènes sélectionnés, concernant l'activation endothéliale, le stress oxydant et la fibrose (Articles 3, Fig. 1 ; Article 4, Fig. 5). Par ailleurs, l'analyse immunohistochimique montre une diminution de l'expression des marqueurs liés à l'endothélium et/ou à la fibrose (facteur de Von Willebrand ou fibronectine, respectivement) (Article 3, Fig. 2). Les expériences révèlent que : (i) l'IL-1Ra bloque la libération de cytokines/chimiokines par les îlots GK/Par ou les îlots de souris C57BL/6 exposées à un stress métabolique (glucolipotoxicité) (Article 4, Fig. 2) ; et (ii) la régulation de cette libération par l'IL-1 $\beta$  est dépendante de MyD88 (Article 4, Fig. 3).

### 3.2.4. Rôle de l'IL-1 dans l'insulino-résistance

Les expériences *in vivo* ont également montré que l'IL-1Ra améliore l'hyperglycémie post-prandiale, diminue le ratio proinsulin/insulin et l'insulino-sensibilité (HOMA) chez le rat GK/Par (Article 4, Fig. 4). Parallèlement, outre les améliorations insulaires, nous avons mis en évidence la diminution de marqueurs pro-inflammatoires dans le foie (Article 4, Fig. 5).

**Islet endothelial dysfunction and oxidative stress is reduced by  
IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK/Par rat**

G. Lacraz<sup>1</sup>, M. Sc, M.-H. Giroix<sup>1</sup>, Chemist, Ph.D, N. Kassis<sup>1</sup>, Engineer, J. Coulaud<sup>1</sup>, Engineer Assistant, J.A. Ehses<sup>2</sup>, Ph.D, A. Galinier<sup>3</sup>, Ph.D, C. Noll<sup>4</sup>, M.Sc, M. Cornut<sup>5</sup>, Technician, F. Schmidlin<sup>6</sup>, Ph.D, J.-L Paul, MD, Ph.D<sup>7</sup>, N. Janel<sup>4</sup>, Ph.D, J.-C. Irminger<sup>5</sup>, Ph.D, M. Kergoat<sup>6</sup>, Ph.D, B. Portha<sup>1</sup>, Ph.D, M. Donath<sup>2</sup>, Ph.D, and F Homo-Delarche<sup>1</sup>, MD, Ph.D

<sup>1</sup>CNRS UMR 7059, Univ Paris Diderot, Paris, France

<sup>2</sup>Division of Endocrinology & Diabetes, University Hospital of Zürich, Zürich, Switzerland

<sup>3</sup>CNRS UMR 5241, P. Sabatier University, Institut L. Bugnard, Toulouse, France

<sup>4</sup>EA 3508, Univ Paris Diderot, Paris, France

<sup>5</sup>Department of Genetic Medicine and Development, CMU, University of Geneva, Geneva, Switzerland

<sup>6</sup>Merck Serono, Chilly-Mazarin, France

<sup>7</sup>AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Biochemistry Laboratory, Paris, France

*Running title: IL-1-induced GK/Par islet endothelial activation*

Address correspondence to:

Françoise Homo-Delarche, MD, Ph.D

Bâtiment Lamarck, case 7104

35, rue Hélène Brion

CNRS UMR 7059, room 549

Université Paris Diderot - Paris 7

75205 Paris cedex 13

France

Tel: 33 (0)1 57 27 77 99

Fax: 33 (0) 1 57 27 83 55

e-mail: [fhomodel@wanadoo.fr](mailto:fhomodel@wanadoo.fr)

e-mail: [francoise.homo-delarche@paris7.jussieu.fr](mailto:francoise.homo-delarche@paris7.jussieu.fr)



## ABSTRACT

**OBJECTIVE** Inflammation followed by fibrosis is an islet component of rodent and human type 2 diabetes. Because islet inflammation might have originated from endothelial cells (EC), we assessed the expression of selected genes involved in EC activation in Goto-Kakizaki rat from Paris colony (GK/Par) islets. We also examined islet endothelial/oxidative stress/inflammation-related gene expression, islet vascularization and fibrosis after treatment with the interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist (IL-1Ra).

**RESEARCH DESIGN AND METHODS** Gene expression was analyzed by quantitative RT-PCR on islets isolated from 2.5-month-old diabetic GK/Par and control Wistar rats. Furthermore, GK/Par rats were treated i.p. twice daily with IL-1Ra (Kineret, Amgen, 100 mg/kg/day) or saline, from 1 month of age onwards (onset of diabetes). Four weeks later, islet gene analysis and pancreas immunochemistry were performed.

**RESULTS** Thirty-two genes were selected encoding molecules involved in EC activation, particularly fibrinolysis, vascular tone, oxidative stress, angiogenesis and also inflammation. All genes except those encoding angiotensinogen and epoxyde hydrolase (that were decreased) and 12-lipoxygenase and vascular endothelial growth factor (that were unchanged) were significantly up-regulated in GK/Par islets. After IL-1Ra treatment of GK/Par rats *in vivo*, most selected genes implied in endothelium/oxidative stress/inflammation/fibrosis were significantly down-regulated. IL-1Ra also improved islet vascularization and reduced fibrosis.

**CONCLUSIONS** GK/Par rats present, at the gene level, an early islet endothelial activation, possibly triggered by several metabolic factors, and also some defense mechanisms. The beneficial IL-1Ra effects on most islet endothelial/oxidative stress/inflammation/fibrosis parameters analyzed highlights a major endothelial-related role for IL-1 in GK/Par islet alterations. Thus, metabolically-altered islet endothelium might affect  $\beta$ -cell microenvironment and contribute to progressive GK/Par  $\beta$ -cell dysfunction.

## INTRODUCTION

The endothelium plays an important role in the regulation of hemostasis, blood flow, maintenance of vascular architecture and mononuclear cell migration, all of primary significance in atherogenesis. The diabetic state is well known to be associated with macrovascular complications such as atherosclerosis and medial calcifications that lead to increased risk of cardiovascular disease (CVD) (1). In addition, a diabetic-specific microvascular disease is at work in the retina (retinopathy), kidney (nephropathy) and vasa nervorum (neuropathy) (2).

Until now, the pancreatic islets have been only rarely considered as being a possible “end-organ” of type 2 diabetes (T2D). However, the islet has been shown to undergo significant remodeling concurrently or even earlier than other end-organs in T2D (3). Indeed, some studies have demonstrated the presence of fibrosis in various spontaneous T2D animal models, and also the presence of amyloid deposits in type 2 diabetic patients (3–6). Moreover, we showed recently that inflammation is present in the islets of type 2 diabetic animal models and in humans (6, 7). In the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki (GK/Par) rat, we suggested that these islet alterations were reminiscent of microangiopathy (6, 7). Others, using electron microscopy, have described signs of microangiopathy in young but normoglycemic Zucker diabetic fatty (ZDF) rats and in the db/db mouse (8, 9).

Hyperglycemia and some other associated metabolic derangements (increased free fatty acids and/or insulin resistance), which can even precede hyperglycemia, mediate abnormal EC function *via* increased oxidative stress, disturbances of intracellular signal transduction (such as protein kinase C activation) and activation of RAGE (receptors for advanced glycation end-products) (1–3, 10–12). These molecular events lead to: 1) decreased nitric oxide (NO) availability associated with increased levels of endothelin-1 (ET-1) and angiotensin II (A-II) with resulting vasoconstriction and its consequences on blood flow and vascular smooth muscle cell (VSMC) growth; 2) activation of transcription factors such as nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and activator protein-1 (AP-1), which increases the expression of cellular adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). It also stimulates the production of cytokines, for example, IL-1 and chemokines, such as monocyte/macrophage chemoattractant protein (MCP-1), leading to local inflammation, leukocyte attraction/migration and reactive oxygen species (ROS) production; 3) increased production of pro-thrombotic/dysfibrinolytic factors, such as tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), which induce hypercoagulation and platelet aggregation (1, 13).

Overall vascular function is dependent upon the balance of pro-/anti-oxidant mechanisms, which determines endothelial function (10). Considerable evidence demonstrate that oxidative stress plays a central role in the pathology of diabetes (14–16). Among other factors including obesity and insulin resistance, hyperglycemia alone is able to directly induce oxidative stress (17–19). Diabetes starts at around 1 month of age (weaning) in GK/Par rats. After 3 months of mild hyperglycemia, GK/Par islets show an upregulation of the gene encoding thioredoxin-interacting protein (6), which is induced by hyperglycemia and inhibits thioredoxin antioxidant function (6, 20). Also, ROS are involved in the mechanism of action of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), known to be produced by EC and to target them (21–26). Therefore, based on the data presented above, we hypothesized that T2D islet inflammation might have originated from EC activation.

Here, we assessed in 2.5-month-old diabetic GK/Par rats and Wistar controls: 1) different circulating parameters linked to EC dysfunction, oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis; 2) the expression of selected genes known to be involved in EC activation in freshly isolated islets; 3) the effect of 1-month treatment with IL-1Ra on islet expression of genes linked to endothelium, oxidative stress, inflammation and extracellular matrix (ECM) proteins, and islet vascularization and fibrosis. IL-1Ra has already been used in T2D and atherosclerosis (27–30).

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

All animal experiments were conducted on fed age-matched male GK/Par and nondiabetic Wistar rats from our local colonies in accordance with accepted standards of animal care, established by the French National Center for Scientific Research. Characteristics of the nonobese GK/Par rat model of T2D maintained in our colony at the University Paris-Diderot, together with the Wistar control rats, have been previously described (31). Two and a half-month-old male rats were killed by decapitation and blood and pancreata collected for measurement of metabolic parameters, islet isolation and quantitative RT-PCR analysis or pancreas immunohistochemistry.

**Metabolic parameters.** Basal morning glycemia was determined with a glucometer. Serum insulin was assayed using a kit (Merckodia). FFA levels were quantified using an enzymatic colorimetric assay (NEFA C) (Wako Chemicals GmbH). Cholesterol, high density lipoprotein (HDL), and triglyceride serum levels were determined by using colorimetric assays (Penta Cholesterol CP kit, HDL cholesterol direct kit and Pentra Triglycerid CP kit, respectively, ABX Diagnostics). To measure glutathione, 50  $\mu$ l of red blood cells (RBC) were added to 450  $\mu$ l of a mixture (1:5 v/v) of EDTA (1%)/metaphosphoric acid (5%), and 100 or 200 islets were mixed with 5% metaphosphoric acid (300  $\mu$ l). After centrifugation (3000 g, 10 min, 4°C), reduced glutathione (GSH) and its oxidized form (GSSG) were identified in supernatants by reverse-phase HPLC with electrochemical detection (32). Total glutathione content, referred to as “equivalent GSH” (Eq GSH), is the sum of GSH and doubled GSSG concentrations (2GSH→GSSG). The glutathione redox state is:  $([\text{reduced form}]/[\text{total forms}]) \times 100$ , with  $[\text{total forms}] = [\text{oxidized form}] + [\text{reduced form}]$ . Alpha-Tocopherol was determined in heparinated plasma (100  $\mu$ l) extracted with 2-propanol (400  $\mu$ l) (33). Plasma homocysteine was assayed by using the fluorimetric HPLC method previously described (34). Paraoxonase-1 (PON-1) activity assay was performed on 5  $\mu$ l of plasma. PON-1 arylesterase activity toward phenyl acetate was quantified spectrophotometrically using 20 mM of Tris-HCl, pH 8.3 with 1 mM of CaCl<sub>2</sub> and 10 mM of phenyl acetate (Sigma-Aldrich). The reaction was performed at room temperature for 1 min by measuring the appearance of phenol at 270 nm with the use of continuously and automated recording spectrophotometer. All values were corrected for non-enzymatic hydrolysis. Serum leptin, cytokines and chemokines were assayed using Luminex™ (Millipore, Switzerland) (4).

**Islet isolation and mRNA analysis.** Pancreatic islets were isolated using collagenase (Boehringer Mannheim) and then handpicked under a stereomicroscope (35). Total RNA was isolated from islets using the RNeasy mini kit (Qiagen) and its concentration determined by optical density at 260 nm. To remove residual DNA contamination, the RNA samples were treated with RNase-free DNase (Qiagen) and purified with RNeasy mini-column (Qiagen). Total RNA (4  $\mu$ g) from each islet sample was reverse transcribed with 40 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) using random hexamer primers. The primers used were derived from rat sequences and designed using OLIGO6 (see Table 1). Quantitative RT-PCR amplification reactions were carried out in a LightCycler 1.5 detection system (Roche) using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I kit (Roche). Reverse transcribed RNA (10 ng) was used as the template for each reaction. All reactions were run in duplicate with no template control. The PCR conditions were: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s. Changes in mRNA expression were calculated using difference of C<sub>T</sub> values as compared to a housekeeping gene (rpl19 or Ef1a), and expressed relative to controls.

**In vivo IL-1Ra treatment.** IL-1Ra (kindly donated by Amgen, CA, USA) treatment of GK/Par rats was performed by twice daily subcutaneous injections (100 mg/kg/day). Treatment was initiated 3 days following weaning at 4 weeks of age, i.e., after onset of mild fed hyperglycemia (31, 36). Subcutaneous (s.c.) injection experiments were stopped 4 weeks after initiation of treatment and the animals sacrificed for islet isolation followed by quantitative RT-PCR or pancreas immunohistochemistry.

**Immunohistochemistry.** GK/Par rat pancreatic cryosections were incubated with rabbit anti-fibronectin (1/40, Novotec) or rabbit anti-von Willebrand factor (VWF, 1/100, Dako), followed

by swine anti-rabbit secondary antibody (1/100, Dako) as previously described (6). Antibody-stained surface areas were quantified blindly by measuring the surface area labeled by each marker in a given islet and expressing it to the whole surface of this islet (in 25–40 islets in 3 animals per treatment group), using an Olympus BX40 microscope.

**Statistics.** Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses used an unpaired Student's *t*-test or ANOVA as appropriate. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

**Dyslipidemia and signs of systemic oxidative stress in diabetic GK/Par rats.** Metabolic parameters for 2.5-month-old male control Wistar and diabetic GK/Par rats are summarized in Table 2. The body weights of diabetic animals were significantly lower than controls. They displayed mildly but significantly elevated fed blood glucose and insulin levels (31, 36). They also showed hyperleptinemia and significantly increased circulating levels of triglycerides, FFA, cholesterol and HDL. Their cholesterol/HDL ratio, however, was lower than in Wistar rats. The glutathione redox state was significantly lower in GK/Par than Wistar RBC, with comparable equivalent reduced glutathione (Eq GSH) contents. Plasma  $\alpha$ -tocopherol level was significantly higher in GK/Par animals than controls. Concomitantly, the plasma homocysteine level, an independent risk factor in the development of atherosclerosis (37, 38), was significantly lower. Moreover, the activity of PON-1, an HDL-associated lipolactamase, whose activity is negatively correlated with homocysteine (39), was significantly higher in diabetic than control animals. However, circulating cytokines/chemokines levels, such as chemokine GRO1/KC (the rodent equivalent of IL-8), MCP-1, MIP-1 $\alpha$  (macrophage inhibitory protein-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  and IL-6 were not significantly different at this age between the 2 groups.

**Islet endothelial activation in diabetic GK/Par rats.** Hyperglycemia is well recognized to be associated with increased arterial wall inflammation, reflected by increased expression of anti-fibrinolytic components, vascular cell adhesion molecules, renin-angiotensin system (RAS) factors, agents involved in oxidative stress, vascular tone and angiogenesis, and also of cytokines, chemokines, Toll-like receptors (TLRs) and molecules involved in their signalling (1, 13, 23, 26, 40–42). Therefore, we selected 32 genes encoding molecules belonging to these different classes. Expression of these genes is shown in Table 3. Twenty-eight of 32 of the selected genes were significantly over-expressed. These genes encoded the following molecules: 1) Anti-fibrinolysis system: PAI-1; 2) Vascular adhesion molecules: E-selectin, ICAM-1, PECAM-1 (platelet-endothelial cell-adhesion molecule) and VECAM-1; 3) RAS: angiotensin-converting enzyme-1 (ACE-1) and angiotensin receptor-1 $\alpha$  (AGTR-1 $\alpha$ ); 4) vascular tone/oxidative stress/ angiogenesis components: cyclo-oxygenase-2 (COX-2), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), endothelin-1 (ET-1), heme-oxygenase-1 (HO-1), hypoxia-induced factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), NADPH-oxidase-2 (NOX-2), prostacyclin synthase (PGIS); 5) Cytokines and growth factors: IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-6, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); 6) Chemokines: chemokine GRO1/KC, MCP-1, and MIP-1 $\alpha$ ; 7) Cellular pathways for cytokines and Toll-like receptors: caspase-1, TLR-2, TLR-4, myeloid differentiation primary response protein MyD88, NF- $\kappa$ B and inducible nitric oxide synthase (iNOS). The expression of 2 genes of 32 was found to be significantly decreased, one encoding a molecule belonging to RAS: angiotensinogen and the other encoding soluble epoxyde hydrolase (sEH), involved in vascular tone, inflammation and

angiogenesis. Finally, the gene expression for the pro-oxidant 12-lipoxygenase (12-LOX) and the pro-angiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF) was not modified.

**Beneficial effect of IL-1Ra on the expression of genes selected for endothelial activation/oxidative stress/inflammation and ECM, and on vascularization and fibrosis in GK/Par islets.** Endothelial activation, oxidative stress and mechanism of cytokine action are tightly linked (21–26). IL-1 $\beta$ , produced by EC among other cells, is involved in microangiopathy/atherogenesis (26, 43, 44). Therefore, we administered IL-1Ra, its natural antagonist, s.c. twice daily at 100 mg/kg/day to GK/Par rats, from 1 month (weaning and onset of diabetes) to 2.5 months of age. IL-1Ra-treated GK/Par rats showed a significantly lower glycemia than GK/Par saline (controls):  $8.8 \pm 0.3$  mM (n=7) and  $7.9 \pm 0.1$  mM (n=8), respectively.

GK/Par rat IL-1Ra treatment down-regulated 29 over 35 selected genes. As shown in Fig. 1A, IL-1Ra treatment decreased significantly the islet expression of genes encoding: PAI-1 (–61%), VECAM-1 (–68%, ns), ACE-1 (–74%), ET-1 (Edn1) (–54%), NOX-2 (–67%), COX-2 (–60%), iNOS (–54%), PGIS (–48%), and eNOS (–55%). However, IL-1Ra treatment did not significantly reduce islet endothelial gene expression for E-selectin and HIF- $\alpha$ .

The effects of IL-1Ra treatment on genes encoding antioxidant molecules are shown in Fig. 1B. Beta cells appear to be especially vulnerable to ROS attacks due to their low levels of antioxidant enzymes (45, 46). To compensate for such vulnerability, diabetic  $\beta$ -cells may upregulate antioxidant genes *in vivo* (47), as we recently showed in GK/Par islets (Lacruz et al, submitted). Here, IL-1Ra treatment of GK/Par rats was able to down-regulate the expression of some of these genes but not all of them. First, the expression of one of the main stress-activated mitochondrial enzyme, superoxide dismutase 2 was decreased (Sod2, –63%). This enzyme represents the first-line defense against superoxide anions generated by the mitochondria. However, IL-1Ra did not modify the expression of Sod1 gene. IL-1Ra further reduced significantly catalase (–34%), but not glutathione peroxidase 1 (Gpx1), nor thioredoxin 1 (Trx1), or peroxiredoxin 1 (Prxd1). Those genes encode molecules involved in further reduction of superoxide-derived compounds (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). IL-1Ra treatment down-regulated the expression of genes encoding  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit (Gclc, –42%) and glutathione reductase (Gsr, –31%), both of which contribute to maintain the content of reduced glutathione (GSH), the main antioxidant molecule. IL-1Ra treatment also lowered significantly the gene encoding HO-1 (Hmox1, –49%), an antioxidant induced by supra-physiological glucose concentrations (48), inflammation (49), cytokines (50, 51), and oxidative LDL (52). Finally, IL-1Ra treatment down-regulated the expression of NF-E2-related factor (Nrf2, –47%), which drives the expression of many genes which are mentioned above (53).

Concerning inflammatory genes (Fig1.C), IL-1Ra treatment in GK/Par rats reduced the mRNA expression of islet IL-1 $\beta$  (–50%), TNF- $\alpha$  (–93%), CXCL1/GRO1/KC (–91%), CCL2/MCP-1 (–92%), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (–98%), TLR-4 (–55%), MyD88 (–22%), and NF- $\kappa$ B (–48%). As shown in Figure 1D, IL-1Ra treatment was also able to down-regulate the expression of genes encoding macrophages or immature myeloid cells, which infiltrate GK/Par islets at this age (6). For example, the expression of genes encoding MHC class II (H2-Ea), CD53 and CD74 (macrophage inhibitory receptor (MIF)) were strongly reduced: –70%, –49%, and –22%, respectively). Moreover, the genes encoding the main three extracellular matrix

proteins constituting GK/Par islet fibrosis (collagen I, collagen III and fibronectin, whose genes were over-expressed in GK/Par *versus* Wistar islets (6)) were down-regulated after IL-1Ra treatment (Col1a1, -48%, Col3a1, -45%; Fn1, -49%, respectively) (Fig. 1D).

Finally, we performed immunohistochemistry for VWF, an EC marker, and for fibronectin, a main component of GK/Par islet fibrosis, also produced by EC (6). Von Willebrand factor and fibronectin islet labeling examples are shown in figure 2 (panels A and B). As previously described (6), islets of young adult GK/Par rats are extremely heterogeneous, compared to age-matched Wistar islets: they showed different degrees of endothelial alteration and fibrosis. More precisely, GK/Par islet vascularization appears more or less hypertrophied or even greatly disorganized. One month IL-1Ra treatment significantly reduced labeling of GK/Par islet alterations, as shown for both VWF and fibronectin (-53% and -69%, respectively).

## DISCUSSION

It has been recognized recently that inflammation is an islet component, both in type 2 diabetic animal models and in humans. This observation was based mainly on the presence of macrophages and/or granulocytes (4, 6). The origin of this islet inflammation in T2D is still an open question. A few studies in various spontaneous T2D animal models indicated islet vessel alterations (leakage, hemorrhage), anomalies of blood flow, microangiopathy, or even amyloid deposits along vessels in type 2 diabetic patients (for review, see (4)). Therefore, we hypothesized that type 2 diabetic islet inflammation might have originated from EC activation. Using a molecular approach, we demonstrate here for the first time that young diabetic GK/Par islets show marked islet endothelial microvessel activation associated with inflammation. Moreover, *in vivo* IL-Ra treatment reduced most of the molecular and vascular alterations, and islet fibrosis.

Endothelial dysfunction has already been described in older GK rat macrovessels (mesenteric artery, thoracic aorta and cerebral arteries) (54–58). These studies showed adhesion molecule gene overexpression, pronounced renal perivascular monocyte/macrophage infiltration, increased vascular oxidative stress, and RAS and ET-1 involvement. Moreover,  $\alpha$ -lipoic acid (a naturally occurring compound that appears to be useful in pathologies associated with oxidative stress), AGTR1 and ET-1 antagonists have been shown to provide vasoprotective effects in these macrovessels (54, 56–58). Here, we extend the observation to alterations of the islet microvascular bed in an early stage of the disease development. These findings question their possible consequences on GK/Par  $\beta$ -cell function.

As expected, young diabetic GK/Par rats showed mild hyperglycemia, hyperinsulemia and hyperlipidemia at the circulating level. It has been previously described that young male diabetic GK/Par rats exhibit increased levels of triglycerides, FFA, cholesterol and HDL (59, 60). Notably, extensive physiological screening in both sexes of congenics revealed the existence of GK/Par variants at the locus *Nidd/gk5*, independently responsible for significantly enhanced insulin secretion and lipid anomalies (59). GK/Par rats had marked hyperleptinemia, classically associated with obesity and/or hyperinsulinemia (61). Concomitantly, peripheral oxidative stress, as reflected by oxidized RBC glutathione redox state, was present in GK/Par rats. Patients with high circulating homocysteine levels, an independent risk factor of atherosclerosis development, have an impaired ability to induce cholesterol efflux from macrophages (37, 38, 62). Homocysteine was unexpectedly lower in

diabetic GK/Par rats than in controls, in possible relationship with their higher systemic cholesterol levels. PON-1 is an antioxidant agent and anti-atherogenic HDL-associated enzyme, which prevents LDL and HDL oxidation (63, 64). Homocysteine has been demonstrated to be negatively correlated to the plasma activity of PON-1 in a mouse model of homocysteine disorder (39). This is also the case in diabetic GK/Par rats, which had higher plasma PON-1 arylesterase activity than Wistar. In this regard, it should be noted that increasing PON-1 in mice attenuated diabetes-induced macrophage oxidative stress, diabetes development and decreased mortality (65). Therefore, high circulating PON-1 activity together with enhanced vitamin E in young diabetic GK/Par rats, might suggest that these rats had already installed a systemic antioxidant defense in the lipophilic plasma compartment. The latter might be characterized by some degree of leptin resistance, because of the decreasing effect of leptin on plasma PON-1 activity in Wistar rats (66), and hyperleptinemia in GK/Par rats. This might explain why, despite high circulating levels of the pro-inflammatory/pro-oxidant leptin, systemic cytokine/chemokine levels were similar in GK/Par rats and Wistar controls.

From the circulating GK/Par data above, it appears that molecular signs of islet endothelial activation and oxidative stress might not only derive from their mild chronic hyperglycemia, but merely from associated metabolic disorders. While hyperglycemia itself is well recognized to be deleterious for EC (1, 2, 15), other factors, such as increased circulating FFA and insulin resistance, which can precede hyperglycemia, might also be able to mediate EC dysfunction (1–3, 10–12). In diabetic GK/Par rats, EC activation might have a multifactorial origin: hyperglycemia, high FFA and cholesterol levels, hyperinsulinemia, insulin resistance (from 2.5 months of age onwards in GK/Par rats), elevated ET-1 and perhaps leptin, before appearance of a possible resistance state. However, it should be noted that islet capillary alterations and hemorrhage and signs of microangiopathy are present in normoglycemic Torii and ZDF rats, respectively (9, 67). Moreover, micro- and macrovascular reactivity is reduced in patients at risk for T2D and nondiabetic humans with a strong family history of diabetes show alterations in the systemic NO pathway, such as decreased NO bioavailability and increase in its stable end-products, nitrites and nitrates (68–70). In prediabetic GK/Par rats, endothelial activation might already be induced, because of their already elevated FFA and cholesterol levels (71).

Lipids alone are indeed at play in EC dysfunction (72). In healthy subjects without risk factors, post-prandial hypertriglyceridemia impairs EC function by enhanced oxidative stress (73), and patients with hypercholesterolemia exhibit more leukocyte adhesion (74). Others have found that high-fat meal in humans induces low-grade endotoxemia, leading to postprandial inflammation (75). In Wistar rats, long-term fat diet induces pancreatic injury *via* pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress (76), and in diabetic GK rats, even short-term intermittent high-fat diet induces hypertriglyceridemia, which triggers more monocyte EC adhesion than postprandial hyperglycemia (77). The role of monocytes in atherogenesis is well known (78) and macrophages from db/db mice and GK rats exhibit a pro-inflammatory phenotype associated with the pathogenesis of vascular dysfunction and atherosclerosis (79, 80). However, hyperglycemia alone is also able to induce the expression of pro-inflammatory cytokines/chemokines in monocytes and increase their adhesion to EC (81).

At the EC level, it has been recently shown that hyperglycemia-induced ROS toxicity is dependent on paracrine factors, such as cytokines (82). High levels of FFA signalling through TLR receptors, leptin and also A-II, together with hyperglycemia, are able to stimulate cytokine/chemokine release from EC and/or VSMC, consequently increasing vascular oxidative stress (61, 83, 84) (Fig. 3). Once endothelial dysfunction/oxidative stress/inflammation is triggered, inflammatory cells migrate, produce cytokines/chemokines and secrete ROS (85), which might alter  $\beta$ -cells. Also,  $\beta$ -cells are able to produce IL-1 and IL-1Ra (86) in the presence of glucose, FFA and/or leptin. A vicious cycle is therefore initiated that will alter islet blood flow and  $\beta$ -cell function (4), unless the islets are able to mount defense mechanisms.

In GK/Par islets, we showed that most of the selected 32 genes, which were up-regulated (some of them drastically), encoded deleterious molecules involved in microangiopathy/atherosclerosis. The few other genes were modulated in order to trigger defense mechanisms. As hypothesized, there was an over-expression of genes encoding: 1) the anti-fibrinolytic agent, PAI-1; 2) Cellular adhesion molecules (VECAM-1, E-selectin, PECAM-1); 3) Chemokines (CXCL1, CCL2, CCL3); 4) Cytokines and growth factors (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ ), and caspase 1, which cleaves pro-IL-1 and pro-IL-18 in active pro-inflammatory products (87); 6) TLRs (TLR-2, TLR-4), which are stimulated by FFA and involved in atherosclerosis (41), and molecules involved in TLR and IL-1 signaling: MyD88, NF- $\kappa$ B and iNOS. The GK/Par islet iNOS gene overexpression should be underlined on the basis of the following data: 1) studies using iNOS-deficient mice showed that iNOS plays an important role in the pathogenesis of vascular lesions characteristic of the early stages of diabetic retinopathy, preventing leukostasis (88); 2) granulocytes infiltrate diabetic GK/Par islets (6), express iNOS and produce ROS (85); 3) granulocytes induce cardiomyocyte injury after myocardial ischemia/reperfusion by an iNOS-derived oxidative stress and peroxynitrite-mediated mechanism (89); 4) in the aortic tissue of diabetic GK rats, superoxide production is increased but NO bioavailability decreased (55). This is associated with elevated eNOS protein expression and low levels of its cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), increased nitrosylated protein content and expression of the superoxide-generating enzyme NADPH oxidase (particularly, NOX-2). These data suggest that diabetes triggers ROS production from the NADPH oxidase, leading to BH4 oxidation, eNOS uncoupling, and NO inactivation with subsequent peroxynitrite formation (90). Moreover, increased expression of NOX-2 and eNOS RNA and protein have been observed in the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic ApoE-deficient mouse (91). Similarly, genes encoding NOX-2 and eNOS were also up-regulated in diabetic GK/Par islets, therefore suggesting eNOS uncoupling. Finally, it should be noted that: 1) eNOS expression is stimulated by hypercholesterolemia, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and hypoxia; 2) NADPH oxidase expression is stimulated by glucose, FFA and cytokines in rat pancreatic islets and a clonal  $\beta$ -cell line (92); and 3) high glucose downregulates the number of monocyctic caveolae, which mediate the intracellular lipid transport, through NADPH oxidase-induced oxidative stress (93).

The gene encoding the pro-inflammatory/pro-oxidant COX-2 enzyme was strongly up-regulated in GK/Par islets. Notably, inhibition of COX-2 gene or its deletion in macrophages protects against atherosclerosis (94). However, oxidized LDL down-regulate COX-2, indicating a coordinated and reciprocal control of cholesterol homeostasis and inflammatory pathways (94). Regarding  $\beta$ -cell function, COX-2 over-expression could be deleterious,



because its selective inhibition is able to enhance glucose-induced insulin secretion through a reduction of prostaglandin E2 (PGE2) (95).

Among other genes that were found to be up-regulated in young diabetic GK/Par islets are those encoding several vasoconstrictor agents, such as ET-1 and RAS-linked molecules. Endothelins activate NADPH oxidases, thereby increasing superoxide production and oxidative stress, and consequently leading to endothelial dysfunction (96, 97). ET-1 has also been shown to stimulate *in vitro* the release of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 from monocytes (98) and has marked vasoconstrictor effect on mouse pancreatic islet vasculature, either *in vivo* or in vascularly perfused islets (99). As already mentioned, circulating ET-1 levels are elevated in aged GK rats and ET-1 antagonists ameliorate their macrovessel alterations (58). The presence of various RAS components has been described at the islet level (100), and A-II-mediated signal through AGTR-1 involves NADPH activation, superoxide production and eNOS uncoupling (84). In the diabetic retina, A-II induces leukostasis *via* NADPH activation (101). AGT, ACE, and/or AGTR-1 mRNA and protein levels are elevated in arterial cells of type 2 diabetic patients, and RAS inhibition reduces the onset of T2D and prevented atherosclerosis (102). Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AGTR-1 (103). Moreover, in STZ-induced diabetic aortas, the AGTR-1 blocker candesartan or the ACE inhibitor captopril markedly attenuates eNOS-derived superoxide and hydrogen peroxide production, while augmenting NO bioavailability, implicating eNOS recoupling (104). In db/db mouse islets, candesartan, ameliorates  $\beta$ -cell function, decreases oxidative markers and fibrosis, and prevents EC loss (105). As expected, GK/Par islets showed an up-regulation of ACE, AGTR-1 genes but an AGT gene down-regulation, which could be linked to the local insulin inhibitory effect on AGT mRNA expression in EC (106).

In addition to the up-regulated genes with deleterious effects, we noted a few genes, whose modulation would be supposed to exert protective effects. This is the case for the gene encoding PGIS, which is stimulated by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  and inhibited by IL-6, and produces prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), a potent vasodilator agent (107). Two other over-expressed genes, also stimulated by cytokines and hypoxia, encode molecules with antioxidant and/or pro-angiogenic effects: HO-1 and HIF-1 $\alpha$ . HO-1, whose gene expression was markedly up-regulated in GK/Par islets, is a potent antioxidant agent, which is able to decrease MCP-1 but increase VEGF in EC (108), inhibit their adhesion molecules expression *via* NF- $\kappa$ B inhibition (109) and protect them from glucose-induced apoptosis (110). HO-1 induction improves pancreas graft survival by preventing pancreatitis after transplantation, and protects pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats (111, 112). The hypoxia-induced factor HIF-1 $\alpha$  regulates several pro-angiogenic genes, eNOS, HO-1, MIF, and VEGF (113). Notably, while HIF-1 $\alpha$  gene expression was mildly but significantly increased in GK/Par islets, possibly linked to vessel alterations, VEGF is the only gene that showed no change. This observation might be of importance in the context of T2D and atherosclerosis, where defects in endothelial precursor cells were recently recognized (114, 115). GK/Par rats might present a deficient angiogenesis due to lack of VEGF response and also possible eNOS uncoupling, because VEGF-induced-eNOS is an efficient pathway of angiogenesis (116, 117) as well as COX-2 (118). In this context, the lack for GK rats to increase blood flow and islet mass after 60% pancreatectomy as opposed to Wistar rats should be noted (119).

IL-1Ra, the natural IL-1 antagonist, is another molecule of interest in this study for several reasons. It has been shown to: 1) play a crucial role in the prevention of inflammatory diseases; 2) counteract deleterious effects of IL-1 members involved in insulin resistance and diabetes; 3) reduce hyperglycemia and improve  $\beta$ -cell function in type 2 diabetic patients (27, 120, 121). In addition, some haplotypes of the IL-1Ra gene have been found to be correlated with increased CVD risk in patients with or without diabetes and IL-1Ra is being to be used in atherosclerosis (29, 122, 123). Compared to Wistar, untreated GK/Par islets showed a marked IL-1Ra gene up-regulation, which was unable to counteract spontaneously *in situ* the consequences of the concomitant strong IL-1 $\beta$  gene up-regulation. However, exogenous IL-1Ra treatment of GK/Par rats was able to significantly down-regulate most selected genes for endothelial activation (except Hif1 $\alpha$  and Vcam1, but it can not be excluded that Hif1 $\alpha$  regulates Vcam1 expression, like in Hif2 $\alpha$  knockdown mice (124)), all cytokines/chemokines and their pathways, myeloid cell infiltration, and ECM proteins. As a consequence of reduced islet inflammation in IL-1Ra-treated islets, the expression of most antioxidant genes was down-regulated, particularly those known to be activated by IL-1 at the EC level (125). Consequently, IL-1Ra treatment reduced islet hyper-vascularisation and islet fibrosis, and finally ameliorated glucose homeostasis in GK/Par rats. These data highlight the primary role of IL-1 in the pathogenesis of islet microangiopathy in a spontaneous T2D model. In this regard, co-expression of IL-1Ra and VEGF improves human islet survival, which is strictly dependent upon adequate revascularization (126).

Last but not least, the drastic under-expression of the soluble epoxyde hydrolase (sEH) might represent the major attempt to compensate the defects triggered by metabolically-induced inflammation in GK/Par islets. Indeed, sEH is implicated in the metabolism of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) (see for reviews, (127–130)). These EETs are derived from arachidonic acid by cytochrome P450 epoxygenases. Their degradation by sEH generate dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs), which are less active than their parent epoxides. Decreased sEH activity would therefore be expected to increase intracellular EET levels and prolong their beneficial effects, which include: 1) potent vasodilatation: EET function as endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF); 2) marked anti-inflammatory action, reducing cytokine-induced adhesion molecules through NF- $\kappa$ B inhibition (131); 3) antioxidant effect: decreased sEH activity, which increases EET levels, correlates with changes in the expression of a set of antioxidant genes, including thioredoxin, superoxide dismutase and glutathione reductase (132); 4) beneficial effects on vessels: EETs inhibit the migration and proliferation of VSMCs and, by contrast, stimulate EC proliferation and angiogenesis, particularly in response to hypoxia (128). Very recent data showed that sEH inhibitors attenuate the progression of renal damage in diabetic GK rats and also the development of atherosclerosis in ApoE-knockout mice (133, 134).

In conclusion, it appears that both pro- and anti-vasoconstrictor, pro- and anti-oxidant, pro- and anti-inflammatory, and pro- and anti-angiogenic mechanisms are concomitantly at play in young diabetic GK/Par islets. In spite of an early endothelial dysfunction associated-inflammation/oxidative stress in GK/Par islets, protective mechanisms may thus explain long-lasting mild hyperglycemia in GK/Par rats.

## REFERENCES

1. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA: Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation* 108:1527-1532, 2003
2. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820, 2001
3. Hayden MR, Sowers JR: Isletopathy in Type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling, and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 9:891-910, 2007
4. Ehnes JA, Calderari S, Irminger JC, Serradas P, Giroix MH, Egli A, Portha B, Donath MY, Homo-Delarche F: Islet inflammation in type 2 diabetes (T2D): from endothelial to beta-cell dysfunction. *Current Immunology Reviews* 3:216-232, 2007
5. Clark A, Nilsson MR: Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? *Diabetologia* 47:157-169, 2004
6. Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger JC, Gangnerau MN, Coulaud J, Rickenbach K, Dolz M, Halban P, Portha B, Serradas P: Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes* 55:1625-1633, 2006
7. Ehnes JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Gueripel X, Ellingsgaard H, Schneider MK, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY: Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2356-2370, 2007
8. Nakamura M, Kitamura H, Konishi S, Nishimura M, Ono J, Ina K, Shimada T, Takaki R: The endocrine pancreas of spontaneously diabetic db/db mice: microangiopathy as revealed by transmission electron microscopy. *Diabetes Res Clin Pract* 30:89-100, 1995
9. Li X, Zhang L, Meshinchi S, Dias-Leme C, Raffin D, Johnson JD, Treutelaar MK, Burant CF: Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 55:2965-2973, 2006
10. Rojas A, Figueroa H, Re L, Morales MA: Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects. *Arch Med Res* 37:436-448, 2006
11. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M: Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 112:1049-1057, 2003
12. Calles-Escandon J, Cipolla M: Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev* 22:36-52, 2001
13. Staels B: PPARgamma and atherosclerosis. *Curr Med Res Opin* 21 Suppl 1:S13-20, 2005
14. Ceriello A, Motz E: Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:816-823, 2004
15. Brownlee M: The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625, 2005
16. Schalkwijk CG, Stehouwer CD: Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 109:143-159, 2005
17. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790, 2000
18. Ahmed FN, Naqvi FN, Shafiq F: Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 1084:481-489, 2006
19. Meigs JB, Rutter MK, Sullivan LM, Fox CS, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW: Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 30:1219-1225, 2007
20. Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL, Lee RT: Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem* 279:30369-30374, 2004
21. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E: Cytokine regulation of endothelial cell function. *Faseb J* 6:2591-2599, 1992
22. Tran PO, Parker SM, LeRoy E, Franklin CC, Kavanagh TJ, Zhang T, Zhou H, Vliet P, Oseid E, Harmon JS, Robertson RP: Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem* 279:53988-53993, 2004
23. Stocker R, Keaney JF: Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84:1381-1478, 2004

24. Brigelius-Flohe R, Banning A, Kny M, Bol GF: Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch Biochem Biophys* 423:66-73, 2004
25. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J: NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72:1493-1505, 2006
26. Tedgui A, Mallat Z: Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86:515-581, 2006
27. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Ehres JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY: Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356:1517-1526, 2007
28. Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K: The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 149:2208-2218, 2008
29. Apostolakis S, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA: IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6:150-158, 2008
30. Crossman DC, Morton AC, Gunn JP, Greenwood JP, Hall AS, Fox KA, Lucking AJ, Flather MD, Lees B, Foley CE: Investigation of the effect of Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes (The MRC-ILA-HEART Study). *Trials* 9:8, 2008
31. Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix MH, Bailbe D, Gangnerau MN, Dolz M, Tourrel-Cuzin C, Movassat J: The GK rat beta-cell: A prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol*, 2008
32. Melnyk S, Pogribna M, Pogribny I, Hine RJ, James SJ: A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection. *J Nutr Biochem* 10:490-497, 1999
33. Galinier A, Carriere A, Fernandez Y, Caspar-Bauguil S, Periquet B, Periquet A, Penicaud L, Casteilla L: Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS Lett* 580:6391-6398, 2006
34. Fortin LJ, Genest J, Jr.: Measurement of homocyst(e)ine in the prediction of arteriosclerosis. *Clin Biochem* 28:155-162, 1995
35. Giroix MH, Vesco L, Portha B: Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinology* 132:815-822, 1993
36. Portha B: Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 21:495-504, 2005
37. Lentz SR: Does homocysteine promote atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1385-1386, 2001
38. Sharma M, Rai SK, Tiwari M, Chandra R: Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 574:49-60, 2007
39. Hamelet J, Ait-Yahya-Graison E, Matulewicz E, Noll C, Badel-Chagnon A, Camproux AC, Demuth K, Paul JL, Delabar JM, Janel N: Homocysteine threshold value based on cystathionine beta synthase and paraoxonase 1 activities in mice. *Eur J Clin Invest* 37:933-938, 2007
40. Barlic J, Murphy PM: Chemokine regulation of atherosclerosis. *J Leukoc Biol* 82:226-236, 2007
41. Vink A, de Kleijn DP, Pasterkamp G: Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol* 15:515-521, 2004
42. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M: Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10679-10684, 2004
43. Dejana E, Breviario F, Erroi A, Bussolino F, Mussoni L, Gramse M, Pintucci G, Casali B, Dinarello CA, Van Damme J, et al.: Modulation of endothelial cell functions by different molecular species of interleukin 1. *Blood* 69:695-699, 1987
44. Mantovani A, Bussolino F, Introna M: Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 18:231-240, 1997
45. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB: CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199:393-398, 1981

46. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M: Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20:463-466, 1996
47. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC: Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51:413-423, 2002
48. Jonas JC, Guiot Y, Rahier J, Henquin JC: Haeme-oxygenase 1 expression in rat pancreatic beta cells is stimulated by supraphysiological glucose concentrations and by cyclic AMP. *Diabetologia* 46:1234-1244, 2003
49. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA: Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2:87-90, 1996
50. Hibbs JB, Jr., Westenfelder C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menlove RL, McMurry MP, Kushner JP, et al.: Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 89:867-877, 1992
51. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS: Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274:H883-891, 1998
52. Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ: Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest* 100:1209-1216, 1997
53. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW: Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278:8135-8145, 2003
54. Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H, Muller D, Park JK, Luft FC, Mervaala EM: Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension* 37:433-439, 2001
55. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F: Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 511:53-64, 2005
56. Harris AK, Hutchinson JR, Sachidanandam K, Johnson MH, Dorrance AM, Stepp DW, Fagan SC, Ergul A: Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes* 54:2638-2644, 2005
57. Sena C, Nunes E, Gomes A, Santos M, Proença T, Martins M, Seiça R: Supplementation of Coenzyme Q<sub>10</sub> and alpha-tocopherol lowers glycated hemoglobin level and lipid peroxidation in pancreas of diabetic rats. *Nutrition Research* 28:113-121, 2008
58. Sachidanandam K, Portik-Dobos V, Harris AK, Hutchinson JR, Muller E, Johnson MH, Ergul A: Evidence for vasculoprotective effects of ETB receptors in resistance artery remodeling in diabetes. *Diabetes* 56:2753-2758, 2007
59. Wallis RH, Wallace KJ, Collins SC, McAteer M, Argoud K, Bihoreau MT, Kaisaki PJ, Gauguier D: Enhanced insulin secretion and cholesterol metabolism in congenic strains of the spontaneously diabetic (Type 2) Goto Kakizaki rat are controlled by independent genetic loci in rat chromosome 8. *Diabetologia* 47:1096-1106, 2004
60. Argoud K, Wilder SP, McAteer MA, Bihoreau MT, Ouali F, Woon PY, Wallis RH, Ktorza A, Gauguier D: Genetic control of plasma lipid levels in a cross derived from normoglycaemic Brown Norway and spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetologia* 49:2679-2688, 2006
61. Beltowski J: Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 189:47-60, 2006
62. Holven KB, Aukrust P, Retterstol K, Otterdal K, Bjerkeli V, Ose L, Nenseter MS, Halvorsen B: The antiatherogenic function of HDL is impaired in hyperhomocysteinemic subjects. *J Nutr* 138:2070-2075, 2008
63. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN: Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104:129-135, 1993
64. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN: Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581-1590, 1998

65. Rozenberg O, Shiner M, Aviram M, Hayek T: Paraoxonase 1 (PON-1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties. *Free Radic Biol Med* 44:1951-1959, 2008
66. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A: Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 170:21-29, 2003
67. Masuyama T, Komeda K, Hara A, Noda M, Shinohara M, Oikawa T, Kanazawa Y, Taniguchi K: Chronological characterization of diabetes development in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Biochem Biophys Res Commun* 314:870-877, 2004
68. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A: Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 48:1856-1862, 1999
69. Piatti PM, Monti LD, Zavaroni I, Valsecchi G, Van Phan C, Costa S, Conti M, Sandoli EP, Solerte B, Pozza G, Pontiroli AE, Reaven G: Alterations in nitric oxide/cyclic-GMP pathway in nondiabetic siblings of patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2416-2420, 2000
70. Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, Devlin H, Hurley S, Varo N, Schonbeck U, Patti ME, Creager MA: Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 47:2456-2461, 2006
71. Homo-Delarche F, Giroix MH, Lacraz G, Calderari S, Cornut M, Ehses JA, Schmidlin F, Coulaud J, Gangnerau MN, Serradas P, Irminger JC: The prediabetic period is characterized by islet microangiopathy in the Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 51 (Suppl1):S308, Abstract 771, 2008
72. Nitenberg A, Cosson E, Pham M: Post-prandial endothelial dysfunction: role of glucose, lipids and insulin. *Diabetes Metab* 32:2S18-12S23, 2006
73. Bae JH, Bassenge E, Kim KB, Kim YN, Kim KS, Lee HJ, Moon KC, Lee MS, Park KY, Schwemmer M: Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis* 155:517-523, 2001
74. Lee IT, Lin TM, Lee WJ, Ou HC, Chien YH, Lee WL, Tang YJ, Yang CH, Sheu WH: Hypercholesterolemia, not metabolic syndrome, related to adhesion of monocytes to cultured endothelium in nondiabetic subjects. *Metabolism* 54:1467-1471, 2005
75. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ: A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 86:1286-1292, 2007
76. Yan MX, Li YQ, Meng M, Ren HB, Kou Y: Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun* 347:192-199, 2006
77. Motojima K, Azuma K, Kitahara Y, Miura K, Mita T, Hirose T, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H: Repetitive postprandial hypertriglyceridemia induces monocyte adhesion to aortic endothelial cells in Goto-Kakizaki rats. *Endocr J* 55:373-379, 2008
78. Osterud B, Bjorklid E: Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* 83:1069-1112, 2003
79. Kimura I, Nagamori A, Honda R, Kobayashi S: Glycated serum stimulation of macrophages in GK- and streptozotocin-rats for the proliferation of primary cultured smooth muscle cells of the aorta. *Immunopharmacology* 40:105-118, 1998
80. Li SL, Reddy MA, Cai Q, Meng L, Yuan H, Lanting L, Natarajan R: Enhanced proatherogenic responses in macrophages and vascular smooth muscle cells derived from diabetic db/db mice. *Diabetes* 55:2611-2619, 2006
81. Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R: High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 52:1256-1264, 2003
82. Busik JV, Mohr S, Grant MB: Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *Diabetes* 57:1952-1965, 2008
83. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz MW: Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res* 100:1589-1596, 2007
84. Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S: Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* 112:417-428, 2007

85. Dedon PC, Tannenbaum SR: Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys* 423:12-22, 2004
86. Donath MY, Storling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T: Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev* 29:334-350, 2008
87. Lamkanfi M, Kanneganti TD, Franchi L, Nunez G: Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 82:220-225, 2007
88. Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, Ball S, Berkowitz BA, Kern TS: Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 50:1987-1996, 2007
89. Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL: Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4556-4560, 1998
90. Bedard K, Krause KH: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313, 2007
91. Ding H, Hashem M, Triggle C: Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS. *Eur J Pharmacol* 561:121-128, 2007
92. Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da Rocha M, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR: 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* 50:359-369, 2007
93. Hayashi T, Juliet PA, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi A: High glucose downregulates the number of caveolae in monocytes through oxidative stress from NADPH oxidase: implications for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1772:364-372, 2007
94. Linton MF, Fazio S: Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 4:116-123, 2004
95. Fujita H, Kakei M, Fujishima H, Morii T, Yamada Y, Qi Z, Breyer MD: Effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor treatment on glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 363:37-43, 2007
96. Iglarz M, Clozel M: Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 50:621-628, 2007
97. Dammanahalli KJ, Sun Z: Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:2-6, 2008
98. Helset E, Sildnes T, Seljelid R, Konopski ZS: Endothelin-1 stimulates human monocytes in vitro to release TNF-alpha, IL-1beta and IL-6. *Mediators Inflamm* 2:417-422, 1993
99. Lai EY, Persson AE, Bodin B, Kallskog O, Andersson A, Pettersson U, Hansell P, Jansson L: Endothelin-1 and pancreatic islet vasculature: studies in vivo and on isolated, vascularly perfused pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1616-1623, 2007
100. Leung PS: The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol* 580:31-37, 2007
101. Chen P, Guo AM, Edwards PA, Trick G, Scicli AG: Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1619-1629, 2007
102. Hodroj W, Legedz L, Foudi N, Cerutti C, Bourdillon MC, Feugier P, Beylot M, Randon J, Bricca G: Increased insulin-stimulated expression of arterial angiotensinogen and angiotensin type 1 receptor in patients with type 2 diabetes mellitus and atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:525-531, 2007
103. Daugherty A, Rateri DL, Lu H, Inagami T, Cassis LA: Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. *Circulation* 110:3849-3857, 2004
104. Oak JH, Cai H: Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice. *Diabetes* 56:118-126, 2007
105. Shao J, Iwashita N, Ikeda F, Ogihara T, Uchida T, Shimizu T, Uchino H, Hirose T, Kawamori R, Watada H: Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 344:1224-1233, 2006

106. Kamide K, Rakugi H, Nagai M, Takiuchi S, Matsukawa N, Higaki J, Kawano Y, Ogihara T, Tuck ML: Insulin-mediated regulation of the endothelial renin-angiotensin system and vascular cell growth. *J Hypertens* 22:121-127, 2004
107. Ristimaki A, Viinikka L: Modulation of prostacyclin production by cytokines in vascular endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 47:93-99, 1992
108. Ryter SW, Alam J, Choi AM: Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650, 2006
109. Seldon MP, Silva G, Pejanovic N, Larsen R, Gregoire IP, Filipe J, Anrather J, Soares MP: Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation via inhibition of NF-kappaB RelA phosphorylation at serine 276. *J Immunol* 179:7840-7851, 2007
110. Sacerdoti D, Colombrita C, Ghattas MH, Ismaeil EF, Scapagnini G, Bolognesi M, Li Volti G, Abraham NG: Heme oxygenase-1 transduction in endothelial cells causes downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and of genes involved in inflammation and growth. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51:363-370, 2005
111. Becker T, Zu Vilsendorf AM, Terbish T, Klempnauer J, Jorns A: Induction of heme oxygenase-1 improves the survival of pancreas grafts by prevention of pancreatitis after transplantation. *Transplantation* 84:1644-1655, 2007
112. von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK, Hopt UT, Pannen BH: Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas* 36:377-384, 2008
113. Hirota K, Semenza GL: Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 59:15-26, 2006
114. Adams B, Xiao Q, Xu Q: Stem cell therapy for vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 17:246-251, 2007
115. Fadini GP: An underlying principle for the study of circulating progenitor cells in diabetes and its complications. *Diabetologia* 51:1091-1094, 2008
116. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S: Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9:1370-1376, 2003
117. Duda DG, Fukumura D, Jain RK: Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 10:143-145, 2004
118. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, Sonoda KH, Saijo Y, Nukiwa T, Strieter RM, Ishibashi T, Kuwano M, Ono M: Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest* 115:2979-2991, 2005
119. Svensson AM, Ostenson CG, Bodin B, Jansson L: Lack of compensatory increase in islet blood flow and islet mass in GK rats following 60% partial pancreatectomy. *J Endocrinol* 184:319-327, 2005
120. Dinarello CA: Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 4:378-385, 2004
121. Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E: IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett* 580:6289-6294, 2006
122. Marculescu R, Endler G, Schillinger M, Iordanova N, Exner M, Hayden E, Huber K, Wagner O, Mannhalter C: Interleukin-1 receptor antagonist genotype is associated with coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:3582-3585, 2002
123. van Minkelen R, Wettinger SB, de Visser MC, Vos HL, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bertina RM, Doggen CJ: Haplotypes of the interleukin-1 receptor antagonist gene, interleukin-1 receptor antagonist mRNA levels and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 2008
124. Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, Iwata F, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y: The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2alpha through VCAM-1 in endothelial cells. *Blood* 112:1482-1492, 2008
125. Xu Y, Kiningham KK, Devalaraja MN, Yeh CC, Majima H, Kasarskis EJ, St Clair DK: An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *DNA Cell Biol* 18:709-722, 1999
126. Jia X, Cheng K, Mahato RI: Coexpression of vascular endothelial growth factor and interleukin-1 receptor antagonist for improved human islet survival and function. *Mol Pharm* 4:199-207, 2007



127. Michaelis UR, Fleming I: From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. *Pharmacol Ther* 111:584-595, 2006
128. Larsen BT, Campbell WB, Gutterman DD: Beyond vasodilatation: non-vasomotor roles of epoxyeicosatrienoic acids in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 28:32-38, 2007
129. Spector AA, Norris AW: Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C996-1012, 2007
130. Fleming I: Vascular cytochrome p450 enzymes: physiology and pathophysiology. *Trends Cardiovasc Med* 18:20-25, 2008
131. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK: Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 285:1276-1279, 1999
132. Pang ST, Dillner K, Wu X, Pousette A, Norstedt G, Flores-Morales A: Gene expression profiling of androgen deficiency predicts a pathway of prostate apoptosis that involves genes related to oxidative stress. *Endocrinology* 143:4897-4906, 2002
133. Olearczyk JJ, Quigley JE, Mitchell BC, Yamamoto T, Kim IH, Newman JW, Luria A, Hammock BD, Imig JD: Administration of a substituted adamantly-urea inhibitor of soluble epoxide hydrolase protects the kidney from damage in hypertensive Goto-Kakizaki rats. *Clin Sci (Lond)*, 2008
134. Ulu A, Davis BB, Tsai HJ, Kim IH, Morisseau C, Inceoglu B, Fiehn O, Hammock BD, Weiss RH: Soluble epoxide hydrolase inhibitors reduce the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-knockout mouse model. *J Cardiovasc Pharmacol* 52:314-323, 2008

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Borsig and D. Bailbé for technical assistance. This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (B.P, F.H.D, M.-H.G), the Swiss National Science Foundation (M.Y.D), the European Foundation for the Study of Diabetes (EASD/MSD for F.H.D. and M.Y.D), the Juvenile Diabetes Research Foundation (M.Y.D). G. Lacraz received a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Ecole Doctorale 394, Physiologie/ Physiopathologie).

M.Y.D is a consultant for Amgen, XOMA, Novartis, and Merck. M.Y.D is listed as the inventor on a patent (WO6709) filed in 2003 for the use of an interleukin-1 receptor antagonist for the treatment of or prophylaxis against type 2 diabetes. The patent is owned by the University of Zurich, and M.Y.D. has no financial interest in the patent.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. IL-1Ra treatment reduces the expression of most of the selected genes for endothelial activation, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in GK/Par islets.** Pancreatic islets were isolated from GK/Par rats following 1 month-treatment with IL-1Ra by s.c. injections (GK/Par Saline,  $n=6$ ; GK/Par IL-1Ra (100 mg/kg/day),  $n=5$ ). For each animal, total RNA was extracted from isolated islets and quantitative RT-PCR was performed for the indicated genes, and expressed relative to GK/Par Saline. \* $p<0.05$  using Student's *t*-test.

**Fig. 2. IL-1Ra treatment improves vascularization and reduced fibrosis in GK/Par islets.** Immunohistochemistry was performed for von Willebrand factor (VWF) (A) and fibronectin (B) in pancreas of untreated Wistar and GK/Par rats, and of s.c. saline- or IL-1Ra-treated-GK/Par rats. As shown in panel A, VWF-labeled islets from untreated GK/Par rats are extremely heterogeneous in terms of vascularization and extent of fibrosis, when compared to Wistar controls. In saline- and IL-1Ra-treated GK/Par rats, immunolabeled islet area for VWF or fibronectin was quantified for each islet and expressed as to the corresponding islet surface ( $n=3$  GK/Par rats for both treatment groups,  $n=25-40$  islets). Islets analyzed for quantification showed unchanged islet area between treatment groups. \* $p<0.05$  using Student's *t*-test.

**Fig. 3. Proposed model illustrating the islet endothelial dysfunction and oxidative stress surrounding  $\beta$ -cells in GK/Par rats.** Elevated glucose, FFA and possibly cytokines induce endothelial activation at the islet level by eliciting reactive oxygen species (ROS) production and cytokine/chemokine release by endothelial cells and vascular smooth muscle cells. Once released, chemokines (CCL2, CCL3, CXCL1) attract/retain immune cells (monocytes, neutrophils), which further induce ROS and cytokine production around  $\beta$ -cells. In addition, cytokines as well as metabolic factors (high glucose and FFA) may act directly on  $\beta$ -cells to increase intracellular cytokines and ROS production with consecutive antioxidant defense response. Antagonizing IL-1 by IL-1Ra may inhibit endothelial activation/dysfunction and subsequent immune cells attraction/activation. IL-1Ra may also blunt IL-1 signaling in  $\beta$ -cells and subsequent ROS production and antioxidant defense response. CCL2 (MCP-1); CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ); CXCL1 (GRO1/KC); FFA, free fatty acids; IL-1, interleukin-1; IL-1Ra, interleukin-1 receptor antagonist; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

**Table 1. Primer oligonucleotide sequences of selected genes**

Gene		Sequences
Agtr1a	Forward:	CTGGCAGAAATGCAATCTCATCA
Agtr1a	Reverse:	GCCCTTTGGGAGTTGAACAGAA
Ace1	Forward:	GCGGAGTCGATGCTGGAGAA
Ace1	Reverse:	GTGGCCCATCTCGTGGTGTA
Agt	Forward:	CTCCCAGAGCCAACCTTTGA
Agt	Reverse:	CAGCATCTTGTACATGCGGAAA
Casp 1	Forward:	CCTGTGCGATCATGTCACTAA AA
Casp 1	Reverse:	GCCAGGTAGCAGTCTTCATTACAA
GRO1/KC	Forward:	GGAAGAAGGGCGGAGAGATGA
GRO1/KC	Reverse:	CCTCTCACACATTCTCACCCCTAA
Cox2	Forward:	CGCTTCTCCCTGAAACCTTACA

Cox2	Reverse:	GGAGAATGGAGCTCCAAGTTCTA
eNos	Forward:	CACCCGGACAACCTCATCA
eNos	Reverse:	CTGCTCATTTCCTCAAGTGCTTCA
Edn1	Forward:	GCCAGTGTGCTCACCAAAAAGA
Edn1	Reverse:	GGACAGGGTTTTCCCTTCTTGAA
Ephx2	Forward:	ACCCATCGGTGACCTCCAA
Ephx2	Reverse:	AAGGCCACGTCAGAAATGAAA
Sele/Cd62	Forward:	GCCAGCCCTCTACCAGAATGA
Sele/Cd62	Reverse:	CCCAAATTCCAGAGTGACGAAGA
Hmox1	Forward:	GAGACGCCCCGAGGAAA
Hmox1	Reverse:	GGGCCAACACTGCATTTACA
Hif1 $\alpha$	Forward:	GGCGACATGGTTTACATTTCTGATAT
Hif1 $\alpha$	Reverse:	GCTCCGCTGTGTGTTTAGTTCTTT
iNos	Forward:	CGCTACACTTCCAACGCAACA
iNos	Reverse:	CGGATTCTGGAGGGATTTC
Icam1/CD54	Forward:	CGGGAGATGAATGGTACCTACAA
Icam1/CD54	Reverse:	CCGCAATGATCAGTACCAACA
Il1ra	Forward:	GAGGAACAATTTTTGCAGGGTGTA
Il1ra	Reverse:	CCCAGAGGGCAGAGGCAATA
Il1 $\beta$	Forward:	CTGGTACATCAGCACCTCTCAA
Il1 $\beta$	Reverse:	GAGACTGCCATTCTCGACAA
Il6	Forward:	GCCACTGCCTTCCCTACTTCA
Il6	Reverse:	GACAGTGCATCATCGCTGTTCA
Alox12	Forward:	GGGCCACTGCTGTTTCGTAAGA
Alox12	Reverse:	GCCCTGAACCCATCGGTAA
Mip1 $\alpha$ /Ccl3	Forward:	CCAAGTCTTCTCAGCGCCATA
Mip1 $\alpha$ /Ccl3	Reverse:	GCAGATCTGCCGGTTTCTCTTA
Mcp1/Ccl2	Forward:	CTGGACCAGAACCAAGTGAGATCA
Mcp1/Ccl2	Reverse:	GTGCTTGAGGTGGTTGTGGAAA
Myd88	Forward:	CGGAGGAGATGGGTTTCGAGTA
Myd88	Reverse:	CGATGCGGTCCTTCAGTTCATA
Nox2	Forward:	CTGGACATCCTGGTGGTTTTCA
Nox2	Reverse:	GGACCGCATCATGGTGAAGAA
Nfkb/Rela	Forward:	CTGGCCATGGACGATCTGTTT
Nfkb/Rela	Reverse:	CCCTCGCACTTGTAACGGAAA
Nrf2	Forward:	CCACGTTGAGAGCTCAGTCTTCA
Nrf2	Reverse:	GACTGTAACTCGGGAATGGAAA
Pai1/Serpine1	Forward:	CCGACCAAGAGCAGCTCTCTGTA

Pai1/Serpine1	Reverse:	GTGCCGAACCACAAAGAGAAA
Pecam1/ Cd31	Forward:	GGCCCTGTCACGTTTCAGTTTTA
Pecam1/ Cd31	Reverse:	CCTGCTCCTTGCTAGTTTGTTC
Ptgis	Forward:	CGCTGGCTACCTGACCCTGTA
Ptgis	Reverse:	GCCAGTTTGGGGAGCATCA
Tlr4	Forward:	CGCTTTCAGCTTTGCCTTCA
Tlr4	Reverse:	GCCAGAGCGGCTACTCAGAAA
Tlr2	Forward:	Rn02133647_s1 These were purchased from AB, this is the assay number, the rest is proprietary.
Tlr2	Reverse:	Rn02133647_s1
Tgfβ1	Forward:	GAGCCCGAGGCGGACTACTA
Tgfβ1	Reverse:	CCCGAATGTCTGACGTATTGAAGA
Tnfa	Forward:	GGGGCCTCCAGAACTCCA
Tnfa	Reverse:	GGAGCCCATTTGGGAACTTCT
Vcam1/CD106	Forward:	GCTCTTGTTCCTCGCTAA
Vcam1/CD106	Reverse:	GTGGGTTCTTTCGGAGCAA
Vegfa	Forward:	CCAGGAGTACCCCGATGAGATAGA
Vegfa	Reverse:	GGTGAGGTTTGATCCGCATGA

**Table 2. Metabolic data for control Wistar and diabetic GK/Par male rats.** Glucose, insulin, leptin, lipids, cytokine and chemokine levels were determined in serum.  $\alpha$ -Tocopherol and homocysteine levels, and paraoxonase-1 (PON-1) activity was determined in plasma. Glutathione redox state (% of reduced glutathione (GSH)) and GSH (Eq GSH) content were determined in red blood cells (RBC). Glucose, insulin, leptin:  $n=7$ ; lipids:  $n=9$ ; cytokines/chemokines:  $n=7$ ;  $\alpha$ -tocopherol, glutathione redox state and GSH content ( $n=7-13$  per group) and homocysteine and PON-1:  $n=7$  and  $n=8$ , respectively. All parameters were assayed under fed conditions. FFA, free fatty acids; GRO1/KC/CXCL1, rodent equivalent of IL-8; HDL, high density lipoproteins; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-6, interleukin-6; MCP-1/CCL2, monocyte/macrophage chemoattractant protein; MIP-1 $\alpha$ /CCL3, macrophage inhibitory protein;. \* $p<0.05$  versus age-matched Wistar group, as analyzed by Student's  $t$ -test.

Parameters	Wistar	GK/Par
Body weight (g)	384 $\pm$ 9.7	277 $\pm$ 8*
Glucose (mM)	5.9 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.4*
Insulin (pM)	184 $\pm$ 43	440 $\pm$ 115*
Leptin (pM)	250 $\pm$ 33	360 $\pm$ 17*
Triglycerides (mM)	1.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1*
Free fatty acids (mM)	0.5 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.0*
Cholesterol (mM)	1.8 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.15*
HDL (mM)	1.1 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.2*
Cholesterol/HDL ratio	1.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.1*
$\alpha$ -Tocopherol ( $\mu$ M)	13.5 $\pm$ 0.6	22.0 $\pm$ 1.1*

RBC glutathione redox state	93.5 ± 1.0	80.1 ± 3.1*
RBC Eq GSH content (mM)	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.3
α-Tocopherol (μM)	13.5 ± 0.6	22.0 ± 1.1*
Homocysteine (μM)	9.9 ± 0.6	6.0 ± 0.3*
PON-1 (%)	100 ± 3.8	116 ± 3.1*
GRO/KC (pg/ml)	312 ± 70	337 ± 37
MCP-1 (pg/ml)	153 ± 16	219 ± 45
MIP-1α (pg/ml)	6.4 ± 0.8	7.6 ± 2.5
IL-1β (pg/ml)	20.3 ± 5.4	16.3 ± 2.7
IL-6 (pg/ml)	78.9 ± 21.3	224 ± 113

**Table 3. Activation of genes encoding factors involved in endothelial activation and inflammation in GK/Par islets.** Total RNA was extracted from 2.5-month-old male Wistar and GK/Par freshly isolated rat islets and quantitative RT-PCR was performed for the indicated genes and normalized to a housekeeping gene (rpL19 or Ef1a). Data are means ± SEM of 5–6 different islet isolations per group except for caspase-1 and epoxide hydrolase-2 ( $n=3$ ). \* $p<0.05$  using Student's  $t$ -test.

Protein names	Acronyms	mRNA levels		
		Wistar (W)	GK/Par	Fold of W
<b><i>Dysfibrinolysis</i></b>				
Plasminogen activator inhibitor-1	PAI-1	0.4 ± 0.1	31.5 ± 3.2	↑ x 70*
<b><i>Cellular adhesion molecules</i></b>				
E-selectin (CD62)	E-SELE	0,8 ± 0.1	11.8 ± 2.3	↑ x 14*
Intercellular adhesion molecule-1 (CD54)	ICAM-1	0.8 ± 0.2	5 ± 0.7	↑ x 6*
Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)	PECAM-1	2.5 ± 0.5	4 ± 0.3	↑ x 2*
Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106)	VCAM-1	0.1 ± 0.0	9.3 ± 1.1	↑ x 62*
<b><i>Vascular tone/oxidative stress/angiogenesis</i></b>				
Angiotensin-converting enzyme-1	ACE-1	3.4 ± 0.9	7.3 ± 0.4	↑ x 2*
Angiotensin receptor-1α	AGTR-1	1.4 ± 0.2	2.9 ± 0.3	↑ x 2*
Angiotensinogen	AGT	3.5 ± 0.7	1.6 ± 0.2	↓ x 0.5*
Cyclo-oxygenase-2	COX-2	0.9 ± 0.2	17.3 ± 4.1	↑ x 19*
Endothelial nitric oxide synthase	eNOS	0.9 ± 0.1	2.4 ± 0.1	↑ x 3*
Endothelin-1	ET-1	0.5 ± 0.2	1.4 ± 0.1	↑ x 3*
epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	sEH	1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	↓ x 10*
Heme-oxygenase-1	HO-1	1.8 ± 0.2	45.5 ± 0.1	↑ x 25*
Hypoxia-induced factor-1α	HIF-1α	2.6 ± 0.1	4.5 ± 0.6	↑ x 2*
12-Lipoxygenase	12-LOX	1.8 ± 0.2	45.5 ± 0.1	↑ x 25*
NADPH-oxidase-2	NOX-2	0.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	↑ x 3*

Prostacyclin synthase	PGIS	1.7 ± 0.2	8.8 ± 0.7	↑ x 5*
Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	→ x 1
<b>Cytokines/growth factors</b>				
Caspase-1 or IL-1-converting enzyme	Caspase-1	1.0 ± 0.0	2.3 ± 0.0	↑ x 2.3*
Interleukin-1β	IL-1β	0.3 ± 0.1	4.5 ± 0.9	↑ x 15*
Interleukin-1 receptor antagonist	IL-1Ra	0.1 ± 0.0	3.7 ± 0.2	↑ x 34*
Interleukin-6	IL-6	1.3 ± 0.4	48.9 ± 8.1	↑ x 38*
Transforming growth factor-β	TGF-β	1.2 ± 0.1	7.2 ± 0.5	↑ x 7*
Tumor necrosis factor-α	TNF-α	0.5 ± 0.3	16.4 ± 4.1	↑ x 33*
<b>Chemokines</b>				
Chemokine GRO/KC (rodent analog of IL-8)	KC or CXCL-1	0.6 ± 0.2	73.1 ± 15.5	↑ x 113*
Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1 or CCL2	0.3 ± 0.0	66.3 ± 11.9	↑ x 204*
Macrophage inflammatory protein-1α	MIP-1α or CCL3	1.0 ± 0.3	44.7 ± 5.6	↑ x 46*
<b>Toll-like receptor/intracellular pathways</b>				
Inductible nitric oxide synthase	iNOS	3.2 ± 0.5	21.9 ± 1.9	↑ x 7*
Myeloid differentiation primary response protein MyD88	MyD88	0.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1	↑ x 2*
Nuclear receptor κ B (p65)	NF-κB	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1	↑ x 2*
Toll-like receptor-2	TLR-2	1.0 ± 0.1	4.4 ± 1.1	↑ x 4*
Toll-like receptor-4	TLR-4	1.0 ± 0.1	3.6 ± 0.3	↑ x 4*

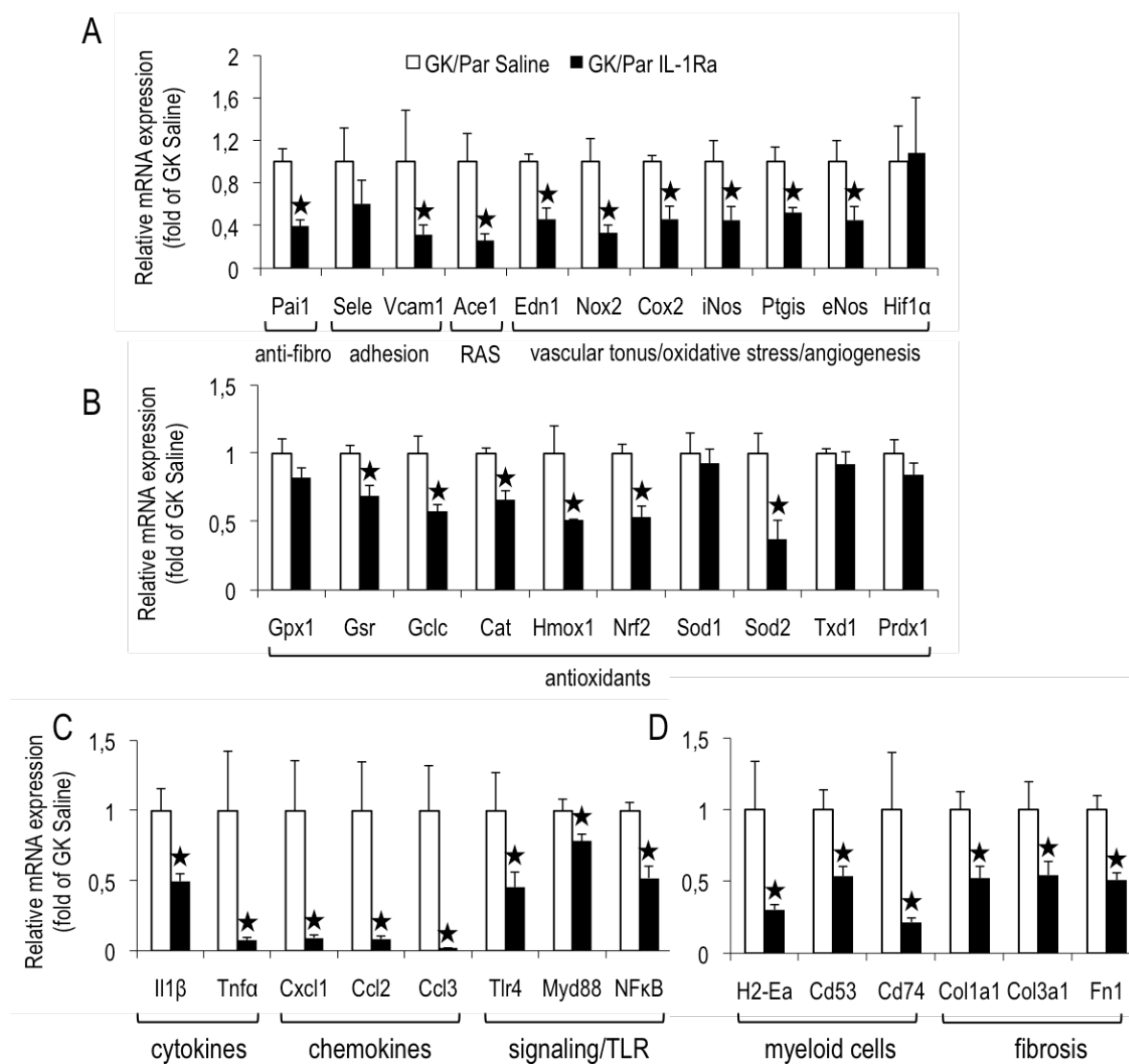


Fig. 1. IL-1Ra treatment reduces the expression of most of the selected genes for endothelial activation, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in GK/Par islets.

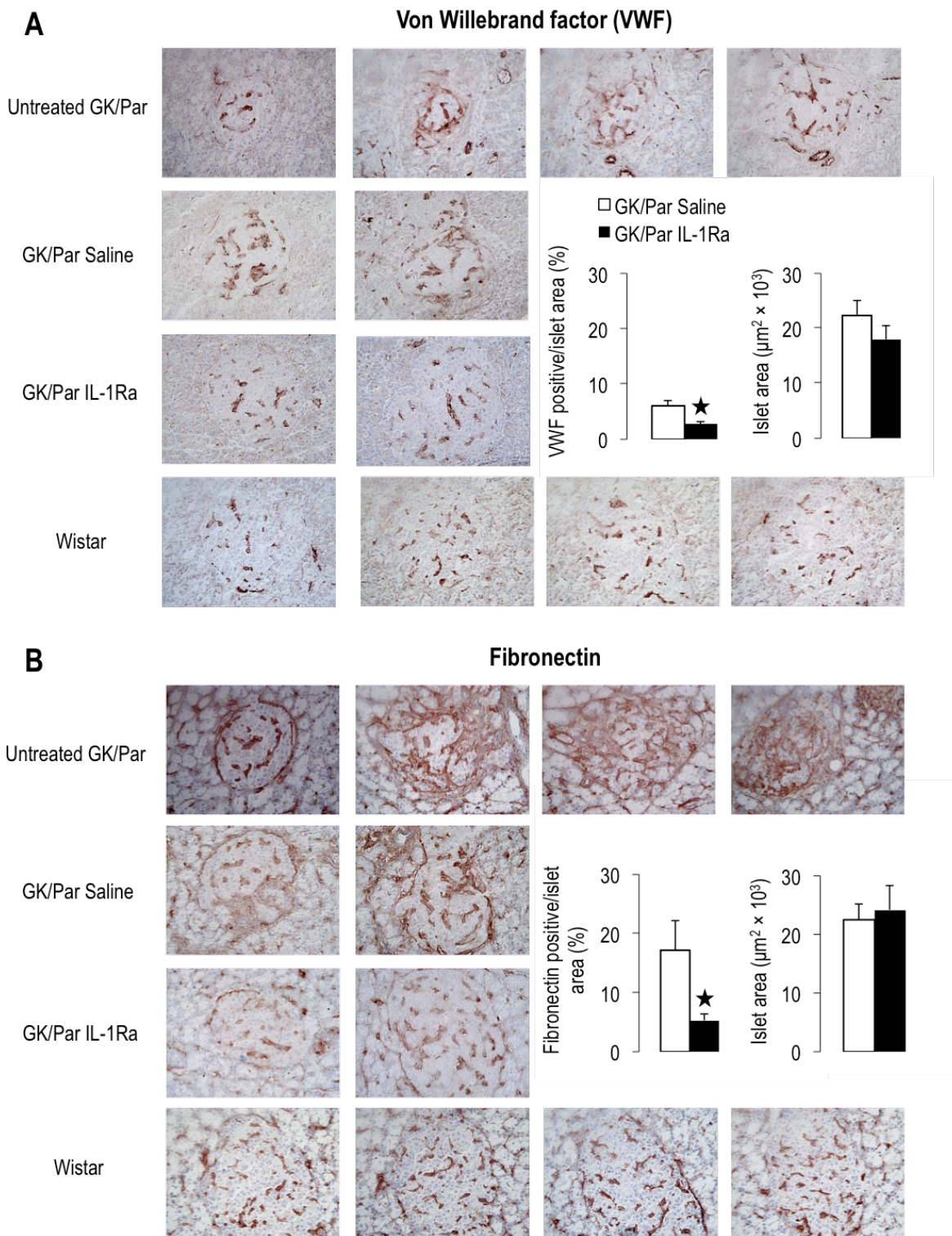


Fig. 2. IL-1Ra treatment improves vascularization and reduced fibrosis in GK/Par islets.



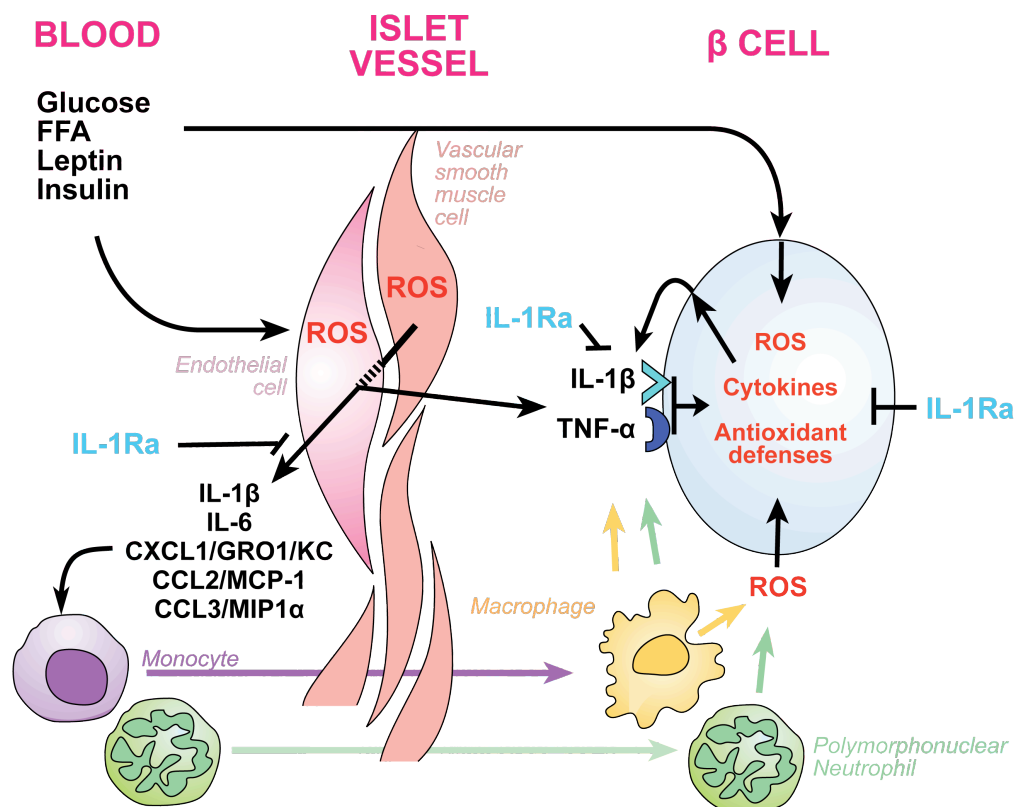


Fig. 3. Proposed model illustrating the islet endothelial dysfunction and oxidative stress surrounding  $\beta$ -cells in GK/Par rats.

**ABBREVIATIONS**

ACE-1, angiotensin-converting enzyme-1  
AGTR-1 $\alpha$ , angiotensin receptor-1 $\alpha$   
A-II, angiotensin-II  
AP-1, activator protein-1  
CVD, cardiovascular disease  
Bh4, tetrahydrobiopterin  
Cat, catalase  
Col1a1, collagen I  
Col3a3, collagen III  
COX-2, cyclo-oxygenase-2  
DHETs, dihydroxyeicosatrienoic acids  
EC, endothelial cells  
ECM, extracellular matrix  
EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor  
EETs, epoxyeicosatrienoic acids  
EPC, endothelial precursor cells  
eNOS, endothelial nitric oxide synthase  
ET-1, endothelin-1  
Fn, fibronectin  
Gclc,  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit  
Gpx1, glutathione peroxidase 1  
GSH, reduced glutathione  
GSSG, oxidized glutathione  
Gsr, glutathione reductase  
HDL, high density lipoproteins  
HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-induced factor-1 $\alpha$   
Hmox1, heme-oxygenase-1  
ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1  
iNOS, inducible nitric oxide synthase  
IL-1, interleukin-1  
IL-1Ra, receptor antagonist  
LDL, low density lipoproteins  
12-LOX, 12-lipoxygenase  
MCP-1 (CCL2), monocyte/macrophage chemoattractant protein  
MHC II, major histocompatibility complexes class II  
MIP-1 $\alpha$  (CCL3), macrophage inhibitory protein-1 $\alpha$   
NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B  
NO, nitric oxide  
NOX-2, NADPH-oxidase-2  
Nrf2, NF-E2-related factor  
PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1  
PECAM-1, platelet-endothelial cellular adhesion molecule-1  
PGE2, prostaglandin E2  
PGI2, prostacyclin  
PGIS, prostacyclin synthase  
PON-1, paraoxonase-1  
Prxd1, peroxiredoxin-1  
RAGE, receptors for advanced glycation end-products  
RAS, renin-angiotensin system  
RBC, red blood cells  
ROS, reactive oxygen species

sEH, soluble epoxyde hydrolase  
SOD, superoxide dismutase  
T2D, type 2 diabetes  
TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$   
TLRs, toll-like receptors  
TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$   
Txd1, thioredoxin 1  
VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1  
VEGF, vascular endothelial growth factor  
VSMC, vascular smooth muscle cell  
VWF, von Willebrand factor  
ZDF, Zucker diabetic fatty

**IL-1 antagonism reduces hyperglycemia in the type 2 diabetic GK rat by reduction in islet and peripheral tissue inflammation**

J. A. Ehses<sup>1</sup>, M.-H. Giroix<sup>\*2</sup>, G. Lacraz<sup>\*2</sup>, F. Schmidlin<sup>3</sup>, J. Coulaud<sup>2</sup>, N. Kassis<sup>2</sup>, J.-C. Irminger<sup>4</sup>, M. Kergoat<sup>3</sup>, B.Portha<sup>2</sup>, F. Homo-Delarche<sup>2</sup>, and M. Y. Donath<sup>1</sup>.

\* These authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Division of Endocrinology, Diabetes, & Nutrition, and Center for Integrated Human Physiology, University Hospital of Zürich, 8045 Zürich, Switzerland.

<sup>2</sup>CNRS UMR 7059, Paris-Diderot University, Paris, France.

<sup>3</sup>Merck Santé, Chilly Mazarin, France.

<sup>4</sup>Department of Genetic Medicine and Development, University Medical Center, Geneva, Switzerland.

*Running title:* **IL-1Ra reduces inflammation in GK rat**

Nonstandard abbreviations used: Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR).

Address correspondence to:

Dr. Jan A. Ehses  
University Hospital of Zürich  
Div. of Endocrinology, Diabetes,  
& Nutrition  
Rämistrasse 100  
Zürich 8091  
Switzerland  
Phone: +41 44 255 4197  
Fax: +41 44 255 9741  
Email: [jan.ehses@usz.ch](mailto:jan.ehses@usz.ch)

Dr. Marc Y. Donath  
University Hospital of Zürich  
Div. of Endocrinology, Diabetes  
& Nutrition  
Rämistrasse 100  
Zürich 8091  
Switzerland  
Phone: +41 44 255 3627  
Fax: +41 44 255 9741  
Email: [marc.donath@usz.ch](mailto:marc.donath@usz.ch)

## ABSTRACT

Recent studies implicate inflammatory processes, characterized by local cytokine/chemokine production with subsequent immune cell infiltration, in islet dysfunction as well as in insulin resistance in type 2 diabetes. Here, we characterized tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat with a focus on the pancreatic islet, and investigated a role for IL-1. GK rat islets, previously characterized by increased macrophage infiltration, displayed increased expression of several inflammatory markers including IL-1 $\beta$ . In the periphery, increased expression of IL-1 $\beta$  was observed primarily in the liver. Specific blockade of IL-1 activity by the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) reduced the release of inflammatory cytokines/chemokines from GK/Par islets *in vitro*, and from mouse islets exposed to metabolic stress. Islets from mice deficient in IL-1 $\beta$  or MyD88 challenged with glucose and palmitate *in vitro* also produced significantly less IL-6 and chemokines. *In vivo*, treatment of GK/Par rats with IL-1Ra decreased hyperglycemia, reduced the proinsulin/insulin ratio, and improved insulin sensitivity as determined by the homeostasis model for the assessment of insulin resistance (HOMA-IR). In addition, islet-derived pro-inflammatory cytokines/chemokines and islet immune cell infiltration were reduced by IL-1Ra treatment. Treated GK/Par rats also exhibited fewer markers of inflammation in the liver. We conclude that IL-1 $\beta$  activity contributes to both islet and peripheral tissue inflammation, impacting on both  $\beta$ -cell function and insulin sensitivity in the GK/Par rat.

## INTRODUCTION

Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes are associated with chronic activation of the innate immune system (1–3). Indeed, data suggest the presence of an inflammatory phenotype in both pancreatic islets and insulin target tissues in animal models and human type 2 diabetes (1–3). With respect to the pancreatic islet, laser-captured  $\beta$ -cells from patients with type 2 diabetes compared to non-diabetic controls have elevated levels of IL-1 $\beta$  (4) and various chemokines (5). Further, islets from patients with type 2 diabetes are infiltrated with macrophages, and human islets exposed to metabolic stress (elevated glucose and palmitate) release increased levels of chemokines (6). Finally, treatment of type 2 diabetes patients with the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), reduced hyperglycemia and improved  $\beta$ -cell function (7). However, whether IL-1 regulates other islet-derived cytokines/chemokines, and subsequent immune cell attraction in type 2 diabetes or animal models of this disease is unknown. Furthermore, the contribution to IL-1 to insulin resistance and peripheral tissue inflammation has been neglected. Thus, it remains to be determined whether elevated IL-1 activity contributes to the overall inflammatory tissue profile in type 2 diabetes.

With respect to animal models, data suggest the presence of an islet inflammatory phenotype in the high-fat fed B6 mouse and in the GK rat (Paris colony, referred to as GK/Par), both models of type 2 diabetes (6, 8). These animals are both characterized by increased islet-associated immune cells, and increased islet cytokine/chemokine expression or release (8, 9). Indeed, based on gene expression arrays from islets of the GK/Par colony compared to Wistar controls, 35% of all upregulated genes were involved in the inflammatory and immune response (8). The GK rat is a spontaneous, non-obese model of type 2 diabetes originally established by inbreeding nondiabetic Wistar rats selected on glucose intolerance (9). The GK/Par rat colony is characterized by an early  $\beta$ -cell defect, followed by insulin

resistance developing later in life. GK/Par animals have decreased  $\beta$ -cell mass during fetal development, however mild hyperglycemia only develops post-weaning at 4 weeks of age (10). Post-weaning, GK/Par animals present with impaired  $\beta$ -cell glucose-stimulated insulin secretion and increased hepatic glucose production, while muscle and adipose tissue insulin resistance develops at 2-months of age or later (11–13). Thus, similar to islets from human type 2 diabetes, GK/Par rat islets are characterized by increased macrophage infiltration, fibrosis, and impaired insulin secretory function (8, 10, 14, 15).

In order to investigate the role of IL-1 in tissue inflammation in the GK/Par rat, we initially characterized both islet and peripheral tissue inflammation in this model. Thereafter, we investigated the islet-specific anti-inflammatory effects of IL-1Ra on GK/Par and age-matched Wistar rats, and mouse islets exposed to metabolic stress. Finally, GK/Par rats were treated with IL-1Ra over 4 weeks with a focus on both islet and peripheral tissue inflammation in the context of glucose homeostasis. With these data, we show that IL-1Ra exerts anti-inflammatory effects primarily at the level of the islet and liver, and concomitantly reduces hyperglycemia in the GK/Par rat.

## RESULTS

Characterization of sera from male Wistar control and type 2 diabetic GK/Par rats at 2-months of age revealed increased fed levels of glucose, insulin, proinsulin, proinsulin/insulin ratio, leptin, and free fatty acids, in addition to increased alkaline phosphatase activity in the GK/Par rat (Table 1). Circulating IL-6, chemokine KC, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  levels were not significantly different between Wistar and GK/Par rats at this age. Thus, as supported by previously published data (10) and both an increased proinsulin/insulin ratio and an increased HOMA-IR value (Table 1), 2-month old GK/Par rats display both  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance compared to Wistar controls.

***Characterization of islet and peripheral tissue inflammation in the GK/Par rat.*** We have previously published that 2-month old GK/Par rat islets are infiltrated with macrophages relative to Wistar controls (6, 8). Here, we went on to characterize GK/Par rat islet inflammation in 2-month old males further with a focus on inflammatory cytokines and chemokines. Indeed, IL-1 $\beta$  mRNA was increased 16-fold in isolated GK/Par islets vs. Wistar control islets (Figure 1A). Overall, there was a striking mRNA upregulation of numerous cytokines and chemokines in GK/Par islets. In line with this, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B) expression were also increased approximately 2-fold, together with increased Toll-like receptor (TLR)-2 and -4 expression in GK/Par islets (Figure 1A). To evaluate whether increased islet cytokine/chemokine mRNA expression translated to increased protein production, we measured the release of IL-6, KC, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  from GK/Par islets *ex vivo* compared to age-matched Wistar control islets. The release of all these inflammatory factors was higher in conditioned media from GK/Par islets compared to Wistar islets (Figure 1B). We were unable to measure IL-1 $\beta$  protein, which is not surprising given the difficulty in measuring these cytokines in the presence of serum (16). Therefore, the use of IL-1Ra *in vitro* was used to prove the presence of biologically active IL-1 in GK/Par islets (Figure 2 and below). Overall, GK/Par islets from 2-month old animals are characterized by an inflammatory profile relative to age-matched Wistar control islets.

Interestingly, insulin sensitive tissues were not characterized by as strong inflammation in the 2-month old male GK/Par rat (Figure 1C). Only the liver displayed

increased IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA in the GK/Par rat, while the macrophage marker CD68 was increased in liver and epididymal adipose tissue (Figure 1C). GK/Par and Wistar quadriceps skeletal muscle displayed no differences in the inflammatory markers assessed (Figure 1C). Further, evaluation of mRNA from younger 1-month old GK/Par liver, adipose, and muscle tissue showed no differences in IL-1 $\beta$  mRNA compared to Wistar controls (data not shown).

**IL-1 regulates GK/Par islet and metabolic stress-induced islet cytokine/chemokine release.** Interleukin-1 $\beta$  is known to regulate the expression of numerous cytokines and chemokines (7, 16). We reduced IL-1 activity in pancreatic islets *in vitro* with the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). IL-1Ra partially blocked the release of IL-6, KC, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  between 35–50 % from GK/Par islets with no significant effect on Wistar islets (Figure 2). Thus, islet IL-1 activity contributes to the overall increased cytokine and chemokine release seen in the type 2 diabetic GK/Par islets.

Similar to the GK/Par rat, we have previously shown that chemokine KC and IL-6 are increasingly produced by islets from high fat (HF) diet fed mice or islets exposed to metabolic stress (elevated glucose and palmitate) (6). Since IL-1 $\beta$  signaling is transduced *via* the IL-1 receptor in a MyD88-dependent manner (17, 18), we investigated the effect of metabolic stress on islet cytokine/chemokine release in MyD88 +/+ , +/- , and -/- mouse islets. As seen in Figure 3A, elevated palmitate alone (0.5 mM), or in combination with high glucose (33 mM), stimulated islet chemokine KC and IL-6 release in a MyD88-dependent manner. Further, IL-1 $\beta$  stimulated release of these two factors was also MyD88-dependent (Figure 3B). To prove that IL-1 is involved in this inflammatory response to metabolic stress and that this is not just due to a developmental defect in the MyD88-/- islets, we treated wild type islets with increased levels of glucose and palmitate alone or in combination, in the absence or presence of IL-1Ra (Figure 3C). Indeed, IL-1Ra was able to inhibit both palmitate and palmitate plus glucose stimulated KC release, while also inhibiting IL-6 release under the latter conditions. Finally, to investigate whether these effects of IL-1Ra were due to inhibition of IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , we performed experiments on IL-1 $\beta$ -/- mouse islets. While IL-1Ra was able to inhibit metabolic stress-induced KC and IL-6 release from wild type islets (B6) over 50%, IL-1Ra was ineffective in IL-1 $\beta$ -/- mouse islets (Figure 3D). Therefore, similar to GK/Par islets, metabolic stress induced islet chemokine KC and IL-6 release is IL-1-dependent; specifically, metabolic stress acts in an IL-1 $\beta$ -MyD88-dependent manner to induce islet cytokine and chemokine release. Thus, using two *in vitro* models, we have shown that IL-1 contributes to islet release of cytokines and chemokines.

**IL-1Ra treatment reduces GK/Par rat hyperglycemia.** To investigate if IL-1Ra treatment could prevent islet inflammation *in vivo*, we treated 1-month old GK/Par rats with human recombinant IL-1Ra *via* both mini-osmotic pumps and by daily s.c. injections. GK/Par animals present with mild hyperglycemia post-weaning (1-month of age) (19), and therefore pumps were implanted 2-3 days following weaning (SI Figure 1). We initially implanted mini-osmotic pumps to release IL-1Ra or saline (sham) continuously over time (on average 6.75 mg/kg/day of IL-1Ra) for 4 weeks. Basal fed plasma glucose (7.9  $\pm$  0.1 mM sham ( $n=6$ ), 7.9  $\pm$  0.2 mM IL-1Ra ( $n=7$ )) and body weights were consistent between groups (42.5  $\pm$  1.6 g sham ( $n=6$ ), 39.9  $\pm$  1.7 g IL-1Ra ( $n=7$ ); at -5 days before implantation). Elevated circulating human IL-1Ra was detected at the end of treatment in animals treated with IL-1Ra only (not shown). IL-1Ra treatment decreased fed hyperglycemia over the 4 weeks of treatment, with no

effects on body weight (SI Figure 1A, B). Fed plasma glucose values after 4 weeks of treatment were  $7.9 \pm 0.2$  mM for the sham ( $n=6$ ), and  $7.3^* \pm 0.2$  mM for the IL-1Ra group ( $n=7$ ;  $*p<0.05$ ). At the end of treatment, fed circulating insulin and proinsulin were both significantly reduced, with a trend towards an improved proinsulin/insulin ratio, and a decreased HOMA-IR in IL-1Ra treated animals (SI Figure 1C).

Animals were rapidly growing during the treatment period, therefore not allowing us to match IL-1Ra dose to body weight using the mini-osmotic pumps. Thus, we administered IL-1Ra s.c. twice daily at 50 mg/kg for 4 weeks. Before treatment, fed plasma glucose was lower in this set of animals compared to the pump experiment:  $6.8 \pm 0.2$  mM and  $7.1 \pm 0.2$  mM for twice daily injected GK/Par saline controls ( $n=7$ ), and 50 mg/kg IL-1Ra-injected ( $n=8$ ) groups respectively. Body weight between groups was  $36.4 \pm 2.0$  g and  $42.6^* \pm 1.6$  g, for groups in the same order as above at -5 days before treatment onset ( $*p<0.05$ ). Consistent with the mini-osmotic pump experiment, glycemia was reduced by IL-1Ra treatment over the 4-week treatment period (Figure 4A, B). At the end of treatment, fed plasma glucose values were  $8.8 \pm 0.3$  mM GK/Par saline control ( $n=7$ ) and  $7.9^* \pm 0.1$  mM for 50 mg/kg IL-1Ra ( $n=8$ ;  $*p<0.05$ ). Further, at the end of treatment, the IL-1Ra treated group had reduced fed circulating proinsulin, and a dramatically decreased proinsulin/insulin ratio compared to GK/Par saline controls (Figure 4E, F). There was little effect on fed insulin levels at the end of treatment (Figure 4D), however C-peptide levels were significantly reduced by IL-1Ra treatment:  $1616 \pm 83$  pM for GK/Par saline control ( $n=4$ ) and  $1429 \pm 43$  pM for IL-1Ra treated ( $n=5$ );  $*p<0.05$ ). Finally, calculated HOMA-IR indicated increased insulin sensitivity in IL-1Ra treated animals, although no significant differences were observed during an insulin tolerance test (Figure 4G, H). Thus, as reported previously in humans and rodent models of type 2 diabetes (7, 20), IL-1Ra treatment of the type 2 diabetic GK/Par rat reduced fed hyperglycemia. This was likely *via* improving both  $\beta$ -cell insulin processing and insulin sensitivity.

**IL-1Ra has both islet and peripheral tissue anti-inflammatory actions.** Next, we examined the islet inflammatory profile after 1-month of IL-1Ra treatment, either with pump implantation or daily injections. In the mini-osmotic pump experiment, IL-6, KC, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  protein release were examined in conditioned media from isolated islets cultured for 48h. Consistent with *in vitro* IL-1Ra effects, GK/Par rat treatment with IL-1Ra decreased islet IL-6, KC, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  protein release (SI figure 1D). After 4 weeks of daily s.c. injections of IL-1Ra, GK/Par islets were isolated and subjected to real-time mRNA analysis in order to examine a wider profile of inflammatory factors (Figure 5A). IL-1Ra treatment reduced the mRNA expression of islet IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , chemokine KC, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MyD88, p65 NF- $\kappa$ B, and TLR4. When comparing mRNA expression to GK/Par untreated islets (Figure 1A), cytokine and chemokine expression was reduced at least 50% in all cases (Figure 5A). Finally, IL-1Ra treatment also enhanced insulin gene expression (INS1 and INS2) (Figure 5A).

Given the reduced expression of islet inflammatory markers, we performed immunohistochemistry for macrophages (CD68), mature granulocytes, myeloid precursors (CD53), and MHC class II protein expression in GK/Par islets (Figure 5B–D). We found significantly reduced CD68 $^+$ , MHC class II $^+$ , and CD53 $^+$  cells associated with IL-1Ra treated GK/Par islets when quantifying this response (Figure 5B–D). Further, islet area among analyzed sections was not different between treatment groups (Figure 5C). Finally, there was



no difference in the percent of  $\beta$ -cell area/pancreas area in GK/Par saline control and high IL-1Ra treated animals ( $0.40 \pm 0.05\%$  vs.  $0.50 \pm 0.11\%$   $\beta$ -cell area/pancreas area, respectively). Thus, IL-1Ra treatment reduces GK/Par rat islet inflammation by reducing both islet cytokine/chemokine expression and islet immune cell infiltration.

Since IL-1Ra treatment of GK/Par rats by mini-osmotic pumps and by s.c. injections showed improved insulin sensitivity based on the HOMA-IR, we analyzed inflammatory gene expression in liver, adipose, and skeletal muscle tissue after s.c. IL-1Ra treatment (Figure 5E). IL-1Ra treatment most clearly reduced TNF- $\alpha$ , MCP-1, and CD68 expression in the liver, with reduced TNF- $\alpha$  expression also seen in adipose tissue (Figure 5E). In line with the reduced liver inflammation, elevated alkaline phosphatase activity in the GK/Par rat was significantly reduced by s.c. IL-1Ra treatment:  $416 \pm 15$  ( $n=4$ ) for saline control and  $372^* \pm 12$  for IL-1Ra injected ( $n=5$ ;  $*p<0.05$ ). Furthermore, mRNA expression of liver PEPCK, the rate-limiting enzyme involved in gluconeogenesis, was reduced due to s.c. IL-1Ra treatment (relative mRNA level:  $1.00 \pm 0.03$  and  $0.81^* \pm 0.08$  for GK/Par saline control ( $n=4$ ) and IL-1Ra treated groups, respectively;  $*p<0.05$ ). Thus, while the GK/Par rat is not characterized by strong peripheral tissue inflammation, IL-1Ra treatment primarily reduced liver inflammatory markers, possibly explaining the improved insulin sensitivity.

Finally, we profiled circulating lipids in GK/Par rats following treatment with IL-1Ra. There were no significant effects on lipids (FFA, triglycerides, Chol/HDL ratio, data not shown).

## DISCUSSION

The GK/Par rat colony is characterized by an early  $\beta$ -cell defect, followed by insulin resistance developing later in life (19). Indeed, the presence of islet inflammation is an early event in the GK/Par model, as increased islet cytokine/chemokine mRNA is already evident at 1-week of age (21) (F. Homo-Delarche, manuscript in preparation). At 2-months of age, both the islet and liver tissues show increased IL-1 $\beta$  mRNA expression, correlating tissue inflammation with tissue dysfunction in the GK/Par rat.

Interestingly, and in contrast to obese models of insulin resistance and type 2 diabetes (1), insulin target tissues did not show strongly increased expression of inflammatory markers in the GK/Par rat relative to Wistar controls. This may be due to the non-obese nature of this model, or to the time course of insulin resistance development in the GK/Par rat. Peripheral insulin resistance in muscle and adipose tissue presents after 2-months of age in the GK/Par rat (19), and we therefore speculate that increased peripheral inflammation will be seen in aging animals.

Subcutaneous IL-1Ra (twice daily 50 mg/kg) reduced fed glycemia in the GK/Par rat over 4 weeks of treatment. While not completely preventing hyperglycemia in these animals, consistent reductions in blood glucose within the range of that previously reported with GLP-1 and exendin-4 treatment in the GK/Par colony were observed (22). The effect of IL-1Ra on hyperglycemia has already been reported in high fat fed mice and humans (7, 20). IL-1Ra is a weak antagonist requiring a 500-fold molar excess to block IL-1 action, and has a short half-life of 4–6h in humans (23). It is therefore expected that a more potent and specific inhibitor of IL-1 activity will more greatly reduce hyperglycemia in the GK/Par colony.

Locally increased production of IL-1 in the islet and in insulin-sensitive tissues can affect  $\beta$ -cell proinsulin/insulin secretion and insulin resistance directly, and/or induce

recruitment of immune cells that subsequently impair tissue specific actions. The direct cytotoxic effects of IL-1 $\beta$  on the islet are well documented (24). IL-1 activity is also known to increase the expression of other cytokines and chemokines in various tissues (25, 26). Here, we show that IL-1 activity contributes to the overexpression of many islet cytokines and chemokines and secondary islet immune cell infiltration. *In vitro* IL-1Ra was able to reduce IL-6, KC, MCP-1, and MIP-1 $\alpha$  protein release from GK/Par rat islets, indicating that IL-1 activity directly promotes cytokine/chemokine release from islet cells. This was confirmed in the setting of metabolic stress, where the latter stimulates islet cytokine/chemokine release in an IL-1-dependent manner. As expected, *in vivo* IL-1Ra treatment reduced both islet cytokine/chemokine expression/release and immune cell infiltration. Indeed, the number of macrophages, MHC class II expressing cells, and granulocytes associated with GK/Par islets were all markedly reduced by IL-1Ra, nearing levels observed in the control Wistar rat (6). Thus, IL-1Ra may have dual beneficial effects. First, IL-1Ra may directly protect from the cytotoxic effects of IL-1 $\beta$ . Second, it may act by decreasing the expression and release of IL-1-induced chemokines by islet cells, and subsequently reducing immune cell infiltration and/or activation characteristic of the GK/Par islets. It remains to be determined to which degree the beneficial affects of IL-1Ra are due to the direct effects of IL-1 on  $\beta$ -cells and/or on insulin sensitive tissues, or due to inhibiting chemokine release and immune cell attraction.

The trigger of islet inflammation in the GK/Par rat is unknown. Based on treatment of animals with phlorizin, and exacerbation of  $\beta$ -cell dysfunction by HF diet feeding, it is hypothesized that glucolipotoxicity contributes to  $\beta$ -cell dysfunction in adult GK animals (27, 28). Indeed, metabolic stress can increase islet chemokine release in an IL-1-dependent manner. Further, we have found that lipid infusion into prediabetic BB rats also exacerbates  $\beta$ -cell dysfunction while concomitantly increasing expression of islet cytokines and chemokines (J. Ehses, A. Giacca; manuscript in preparation). The GK/Par rat is characterized by increased circulating free fatty acids, triglycerides, and hyperglycemia (Table 1). Therefore, we propose that the hyperglycemic and hyperlipidemic environment of metabolic stress in the GK/Par rat may contribute to the islet inflammatory profile in these animals.

The present study shows that IL-1Ra treatment improves GK/Par hyperglycemia by improving both  $\beta$ -cell insulin processing (reducing the proinsulin/insulin ratio) and insulin sensitivity. These effects were paralleled by reductions in islet inflammation and anti-inflammatory effects on the liver. Our recent clinical study of IL-1Ra treatment in human type 2 diabetes failed to show improvements in insulin sensitivity (7). However, it is likely that these patients were under-dosed given that IL-1Ra is a weak antagonist (31). Therefore, it is expected that more potent and specific inhibitors of IL-1 activity will also improve insulin resistance in human type 2 diabetes. Thus, blocking IL-1 activity in type 2 diabetes may improve both  $\beta$ -cell function and insulin resistance by protecting cells from the direct toxic effects of IL-1 and/or by antagonizing the IL-1 induced inflammatory response.

## MATERIALS AND METHODS

For detailed materials and methods please see the supporting information.

**Animals.** Experiments on the nonobese GK/Par rat model and Wistar controls were performed at the University Paris-Diderot, France. Animal experimentation was performed in

accordance with accepted standards of animal care as established in the French National Center for Scientific Research guidelines. MyD88<sup>-/-</sup> mice backcrossed on C57BL/6J mice were kindly provided by Dr. S. Akira (Osaka University, Japan) (18), IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> mice on a C57BL/6J background were kindly provided by Dr. Iwakura (University of Tokyo) as previously described (29, 30). C57BL/6J mice were from Harlan, Netherlands. All mice were specific-pathogen-free laboratory mice from the Institute of Labortierkunde of the veterinary facility of the University of Zurich (Zurich, Switzerland). Experiments were performed according to Swiss veterinary law and institutional guidelines.

**Pancreatic islet isolation.** Two-month old male Wistar and GK rat islets were isolated by collagenase digestion, as previously described (14). Mouse islets were isolated as previously detailed (6).

**RNA extraction and real-time PCR.** Total rat islet RNA was prepared as described (8). Liver, adipose, and muscle tissue RNA was extracted according to manufacturer's instructions (Qiagen, Switzerland). Commercially available rat primers (Applied Biosystems, CA, USA) were used and real-time PCR was performed using the ABI 7000 system (Applied Biosystems). Changes in mRNA expression were calculated using difference of C<sub>T</sub> values as compared to a housekeeping gene (18S) and expressed relative to controls.

**Cytokines and chemokines.** Rat and mouse islets were plated on ECM dishes and conditioned media were removed and assayed (Luminex™, Millipore, Switzerland). Released cytokines/chemokines were normalized to total islet protein content as previously described (6).

**Free fatty acid preparation.** In some experiments islets were treated with 0.5 mM palmitate (Sigma) as previously described (6). Dissolved palmitic acid was tested for endotoxin using the standard LAL test (Cambrex, Charles City, IA, USA), and found to contain levels in the range of 50 pg/mL, 100 000-fold lower than that required to elicit a response by LPS (5  $\mu$ g/mL) in mouse islets based on dose-response experiments (not shown;  $n=5$ ). Further, control BSA preparations had an equivalent amount of endotoxin, and islet media concentrations of endotoxin were below the limit of detection.

**In vivo IL-1Ra treatment.** IL-1Ra (kindly donated by Amgen, CA, USA) treatment of GK rats was performed by twice daily subcutaneous injections (50 mg/kg/injection). Treatment was initiated 2–3 days following weaning (4 weeks old), after onset of mild fed hyperglycemia (19). Non-fasting glycemia was determined with a glucose analyzer (Beckman, CA, USA) 2–3 times a week at 9–10 am. Subcutaneous (s.c.) injection experiments were stopped at 4-weeks after initiation of treatment. Prior to rat sacrifice an intraperitoneal (i.p.) insulin tolerance test (0.35 U/kg) was performed as previously described (31). At sacrifice organs (livers, epididymal adipose tissues, quadriceps muscles, and pancreata) were harvested for immunohistochemistry, islet isolations, and for total RNA isolation.

**Serum parameters.** Serum insulin, proinsulin, and C-peptide were assayed according to the manufacturer's instructions (Mercodia, Sweden). Leptin and cytokines were assayed using Luminex technology™ (Millipore). FFA levels were quantified according to the manufacturer's instructions (Wako Chemicals GmbH, Germany). Ketone  $\beta$ -hydroxybutyrate levels were measured using the Liquid Color kit from Stanbio Laboratory, TX, USA. Triglycerides and alkaline phosphatase activity were determined according to the manufacturer's instructions (Pentra Triglycerid CP kit, and Alp CP kit all from ABX Diagnostics, Montpellier, France).

HOMA-IR was calculated as described (32).

**Immunohistochemistry.** GK rat pancreatic cryosections were incubated with anti-CD68, anti-MHC class II, anti-CD53, and anti-granulocyte antibodies as previously described (8). Immune cells associated with islets were quantified blindly in 25–40 islets in 3 animals per treatment group. Percentage of  $\beta$ -cell area relative to pancreatic area was assessed by staining for insulin as previously published (33).

**Statistics.** Data are expressed as means  $\pm$  S.E. with the number of individual experiments presented in the figure and table legends. All data were analyzed using the nonlinear regression analysis program PRISM (GraphPad, CA, USA), and significance was tested using the Student's t-test and analysis of variance (ANOVA) with Newman Keuls post-hoc test for multiple comparison analysis. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Borsig and D. Bailbe for technical assistance. We thank Dr. S. Akira for kindly donating the MyD88 $-/-$  mice (Osaka University, Osaka, Japan). This work was supported by grants from the Swiss National Science Foundation (M.Y.D), the European Foundation for the Study of Diabetes (EASD/MSD for F.H.D. and M.Y.D), the Juvenile Diabetes Research Foundation (M.Y.D.) and the University Research Priority Program “Integrative Human Physiology” at the University of Zürich (J.A.E. and M.Y.D).

## REFERENCES

- Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-9.
- Kolb, H. & Mandrup-Poulsen, T. (2005) An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48, 1038-50.
- Donath, M. Y., Schumann, D. M., Faulenbach, M., Ellingsgaard, H., Rütli, S., et al. (2008) Islet inflammation in type 2 diabetes: From metabolic stress to therapy. *Diabetes Care* 31, S161-4.
- Boeni-Schnetzler, M., Thorne, J., Parnaud, G., Marselli, L., Ehses, J. A., et al. (2008) Increased IL-1 $\beta$  mRNA expression in beta-cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1 $\beta$  in human islets by glucose and auto-stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* June 29, 2008.
- Marselli, L., Sgroi, D. C., Thorne, J., Dahiya, S., Torri, S., et al. (2007) Evidence of inflammatory markers in beta cells of type 2 diabetic subjects. *Diabetologia* 50, S178.
- Ehses, J. A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J. A., et al. (2007) Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356-2370.
- Larsen, C. M., Faulenbach, M., Vaag, A., Volund, A., Ehses, J. A., et al. (2007) Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356, 1517-26.
- Homo-Delarche, F., Calderari, S., Irminger, J. C., Gangnerau, M. N., Coulaud, J., et al. (2006) Islet Inflammation and Fibrosis in a Spontaneous Model of Type 2 Diabetes, the GK Rat. *Diabetes* 55, 1625-33.
- Goto, Y., Suzuki, K. I., Sasaki, M., Ono, T. & Abe, S. (1988) in *Lessons from Animal Diabetes II*, eds. Shafrir, E. & Reynold, A. E. (Libbey, London), pp. 301-303.
- Portha, B., Lacraz, G., Kergoat, M., Homo-Delarche, F., Giroix, M. H., et al. (2008) The GK rat beta-cell: A prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol*.
- Portha, B., Giroix, M. H., Serradas, P., Gangnerau, M. N., Movassat, J., et al. (2001) Beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50 Suppl 1, S89-S93.
- Bisbis, S., Bailbe, D., Tormo, M. A., Picarel-Blanchot, F., Derouet, M., et al. (1993) Insulin resistance in the GK rat: decreased receptor number but normal kinase activity in liver. *Am J Physiol* 265, E807-13.
- Picarel-Blanchot, F., Berthelie, C., Bailbe, D. & Portha, B. (1996) Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. *Am J Physiol* 271, E755-62.

14. Giroix, M. H., Vesco, L. & Portha, B. (1993) Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinology* 132, 815-22.
15. Ehses, J. A., Calderari, S., Irminger, J. C., Serradas, P., Giroix, M. H., et al. (2007) Islet inflammation in type 2 diabetes (T2D): From endothelial to beta-cell dysfunction. *Current Immunol Rev* 3, 216-232.
16. Dinarello, C. A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-147.
17. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-80.
18. Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., et al. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-50.
19. Portha, B. (2005) Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 21, 495-504.
20. Sauter, N. S., Schulthess, F. T., Galasso, R., Castellani, L. W. & Maedler, K. (2008) The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 149, 2208-18.
21. Homo-Delarche, F., Giroix, M. H., Lacraz, G., Calderari, S., Cornut, M., et al. (2008) The prediabetic period is characterized by islet microangiopathy in the Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 51, S308.
22. Tourrel, C., Bailbe, D., Lacorne, M., Meile, M. J., Kergoat, M., et al. (2002) Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51, 1443-52.
23. Donath, M. Y. & Mandrup-Poulsen, T. (2008) The use of interleukin-1-receptor antagonists in the treatment of diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4, 240-1.
24. Bendtzen, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J. H., Dinarello, C. A., et al. (1986) Cytotoxicity of human p17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232, 1545-7.
25. Dinarello, C. A. (1994) The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J* 8, 1314-25.
26. Dinarello, C. A. (2000) The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 343, 732-4.
27. Gaisano, H. Y., Ostenson, C. G., Sheu, L., Wheeler, M. B. & Efendic, S. (2002) Abnormal expression of pancreatic islet exocytotic soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in Goto-Kakizaki rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 143, 4218-26.
28. Briaud, I., Kelpke, C. L., Johnson, L. M., Tran, P. O. & Poitout, V. (2002) Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 51, 662-8.
29. Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., et al. (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187, 1463-75.
30. Maedler, K., Schumann, D. M., Sauter, N., Ellingsgaard, H., Bosco, D., et al. (2006) Low concentration of interleukin-1beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* 55, 2713-22.
31. Movassat, J., Bailbe, D., Lubrano-Berthelier, C., Picarel-Blanchot, F., Bertin, E., et al. (2008) Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E168-75.
32. Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11, 183-90.
33. Ellingsgaard, H., Ehses, J. A., Hammar, E. B., Van Lommel, L., Quintens, R., et al. (2008) Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13163-8.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Pancreatic islet and peripheral tissue inflammation in the type 2 diabetic GK/Par rat.** Total RNA was extracted from 2-month old male Wistar and GK/Par freshly isolated rat islets, and real-time PCR was performed for the indicated genes and normalized to a housekeeping gene (18S) (A). Shown in parentheses are the fold increases in GK/Par islets vs. Wistar controls. Wistar and GK/Par rat islets were isolated and cultured for 48h at 20 islets/dish, and conditioned media were assayed for the indicated cytokine/chemokine (B). Data were normalized for total islet protein. Data represent 3 different (A) and 4 different (B) islet isolations with islets pooled from 2-3 animals each time, and experiments performed in triplicate. Real-time PCR was performed on cDNA from liver, adipose, and muscle tissue from 2-month old male Wistar and GK/Par rats. Data are representative of 4 animals per strain and are shown as fold increases vs. Wistar controls (C). Where \*represents  $p < 0.05$  as determined by Student's t-test.

**Figure 2: IL-1Ra inhibits GK/Par islet cytokine and chemokine release *in vitro*.** Isolated Wistar and GK/Par islets were plated at 20 islets/well and treated *in vitro* without (-) or with 1000 ng/ml IL-1Ra (+) for 48h. Thereafter, conditioned media were removed and assayed for IL-6 (A), chemokine KC (B), MCP-1 (C), and MIP-1 $\alpha$  (D), and data were normalized for total islet protein. Data are presented relative to GK/Par untreated. Data represent 3 different islet isolations with islets pooled from 2-3 animals each time, and experiments performed in quadruplicate. Where \*represents  $p < 0.05$  as determined by ANOVA with Newman Keuls post-hoc analysis.

**Figure 3: Metabolic stress stimulates pancreatic islet chemokine KC and IL-6 release in an IL-1 $\beta$ -MyD88-dependent manner.** Pancreatic islets were isolated from MyD88 $+/+$ ,  $+/-$ , and  $-/-$  mice and stimulated in culture for 48h with 11 mM glucose, 33 mM glucose, 0.5 mM palmitate, or both (33 mM + 0.5 mM;  $n=3-5$ ). Conditioned media were removed and assayed for KC and IL-6. MyD88  $+/-$  and  $-/-$  islets were stimulated with 2 ng/ml IL-1 $\beta$  in culture for 48h (B;  $n=3-5$ ) and conditioned media were assayed. Mouse B6 wild type islets were cultured in the absence (control) or presence of 500 ng/ml IL-1Ra (C;  $n=3-10$ ), and conditioned media were assayed. B6 wild type and IL-1 $\beta$   $-/-$  islets were cultured for 48h in the presence of 11 mM glucose, or 33 mM glucose plus 0.5 mM palmitate, with and without 500 ng/ml IL-1Ra (D;  $n=5-8$ ). IL-1Ra was only able to suppress KC and IL-6 release in B6 wild type islets (D). Each n value represents separate islet isolations from n individual animals, with experiments performed in triplicate. Where \* and # represent  $p < 0.05$  vs.  $+/+$  and  $+/-$  respectively as determined by ANOVA with Newman Keuls post-hoc analysis (A and B). \*represents  $p < 0.05$  vs. stimulated control as determined by Student's t-test (C). \*represents  $p < 0.05$  vs. B6 stimulated 33 mM glucose + 0.5 mM palmitate control as determined by ANOVA with Newman Keuls post-hoc analysis (D).

**Figure 4: IL-1Ra treatment reduces hyperglycemia, reduces the circulating proinsulin/insulin ratio, and improves insulin sensitivity in the GK/Par rat.** Four-week old male GK/Par rats were injected s.c. twice daily with saline ( $n=7$ ; GK saline) or 50 mg/kg/injection IL-1Ra ( $n=8$ ; GK IL-1Ra) for 4 weeks as shown in scheme. Animal groups had similar starting blood glucose values (see text). Delta ( $\Delta$ ) fed blood glucose (A), area under the curve (AUC) for  $\Delta$  fed blood glucose values over 4 weeks of treatment (B), and  $\Delta$  body weight (C) during treatment are shown. At the end of treatment circulating fed insulin (D), proinsulin (E), and proinsulin/insulin ratio (F) were determined. HOMA-IR was calculated (G), and an insulin tolerance test (0.35 U/kg) was performed at the end treatment with saline and IL-1Ra (H). Where n represents the total number of animals treated in 2 separately conducted experiments, and \*represents  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  as determined by Student's t-test.

**Figure 5: IL-1Ra treatment reduces tissue inflammation in the GK/Par rat.** Pancreatic islets were isolated from GK/Par rats following treatment with IL-1Ra by s.c. injections (A; GK saline  $n=6$ , GK IL-1Ra  $n=5$ ). Total RNA was extracted from isolated islets and real-time PCR was performed for the indicated genes and normalized to 18S and expressed relative to GK saline controls (A). Immunohistochemistry was performed for CD68, MHC class II, CD53, and granulocytes associated with islets and quantified (B,  $n=3$  for both treatment groups). Islets analyzed for immune cell quantification showed unchanged islet area between treatment groups (C). Representative images are shown in (D). Real-time PCR was performed on cDNA samples from liver, adipose, and muscle tissue from GK saline ( $n=4$ ) and IL-1Ra treated animals ( $n=5$ ) (E). Where  $n$  represents the number of animals analyzed, and \* represents  $p<0.05$  as determined by Student's t-test.

## TABLE LEGENDS

**Table 1: Serum parameters in 2-month old male Wistar and GK/Par rats.** Where \*represents  $p<0.05$  as analyzed by Student's t-test ( $n=4-10$  animals). All parameters were assayed under fed conditions. FFAs = free fatty acids, ketone  $\beta$ -HBA = ketone  $\beta$ -hydroxybutyric acid.

Parameter	Wistar	GK/Par
Glucose (mM)	5.9 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.4*
Insulin (pM)	184 $\pm$ 43	440 $\pm$ 115*
Proinsulin (pM)	32.4 $\pm$ 5.4	115 $\pm$ 14*
Proinsulin/Insulin ratio	0.18 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.03*
HOMA-IR	4.6 $\pm$ 1.1	15.6 $\pm$ 4.1*
Leptin (pM)	250 $\pm$ 33	360 $\pm$ 17*
Triglycerides (mM)	1.5 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1*
FFAs (mM)	0.47 $\pm$ 0.04	0.68 $\pm$ 0.05*
Ketone $\beta$ -HBA (mM)	0.23 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.03
Alkaline Phosphatase (U/L)	212 $\pm$ 13	315 $\pm$ 21*
IL-6 (pg/mL)	78.9 $\pm$ 21.3	224 $\pm$ 113
GRO/KC (pg/mL)	312 $\pm$ 70	337 $\pm$ 37
MCP-1 (pg/mL)	153 $\pm$ 16	219 $\pm$ 45
MIP-1 $\alpha$ (pg/mL)	6.4 $\pm$ 0.8	7.6 $\pm$ 2.5

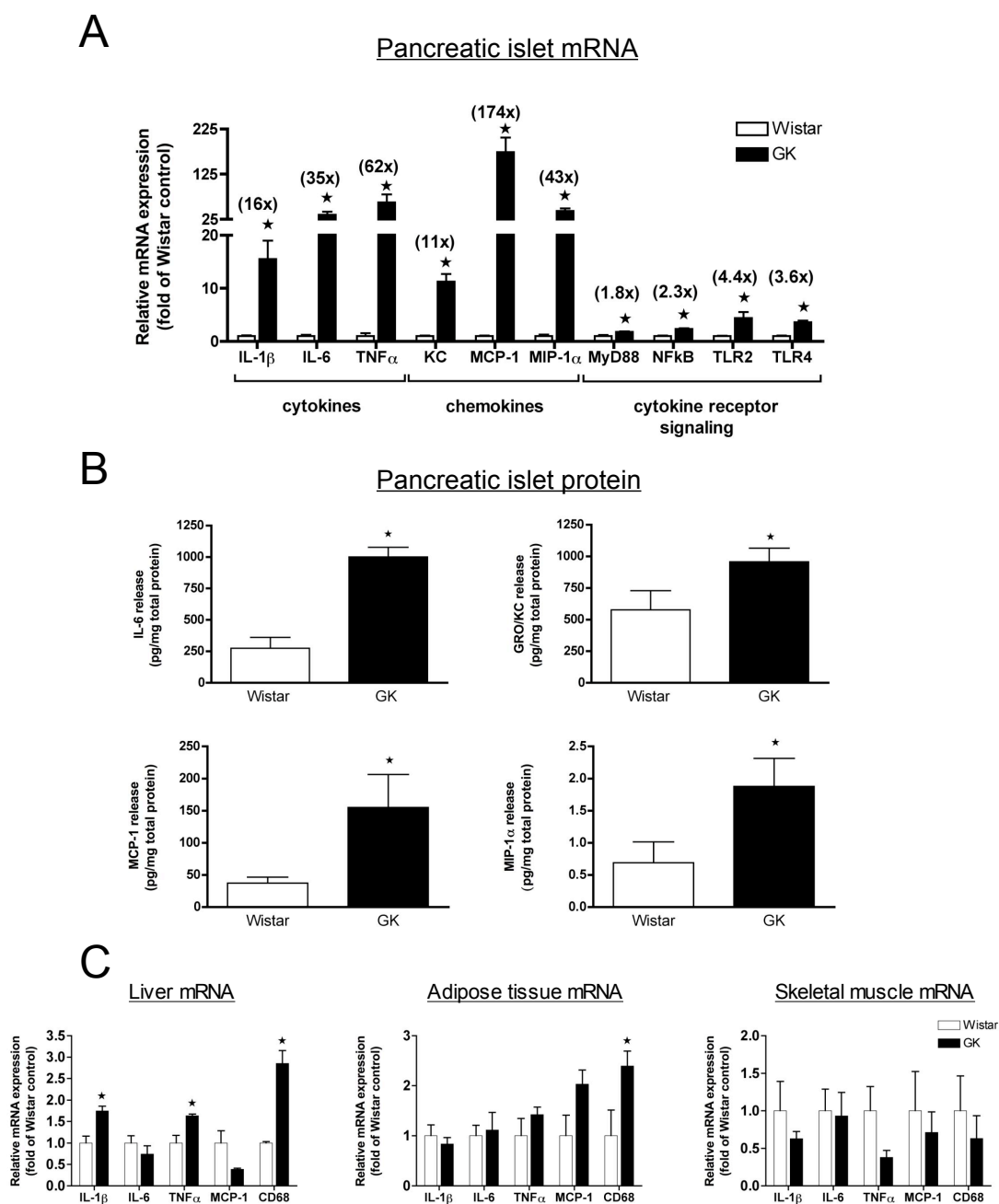


Figure 1: Pancreatic islet and peripheral tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat.



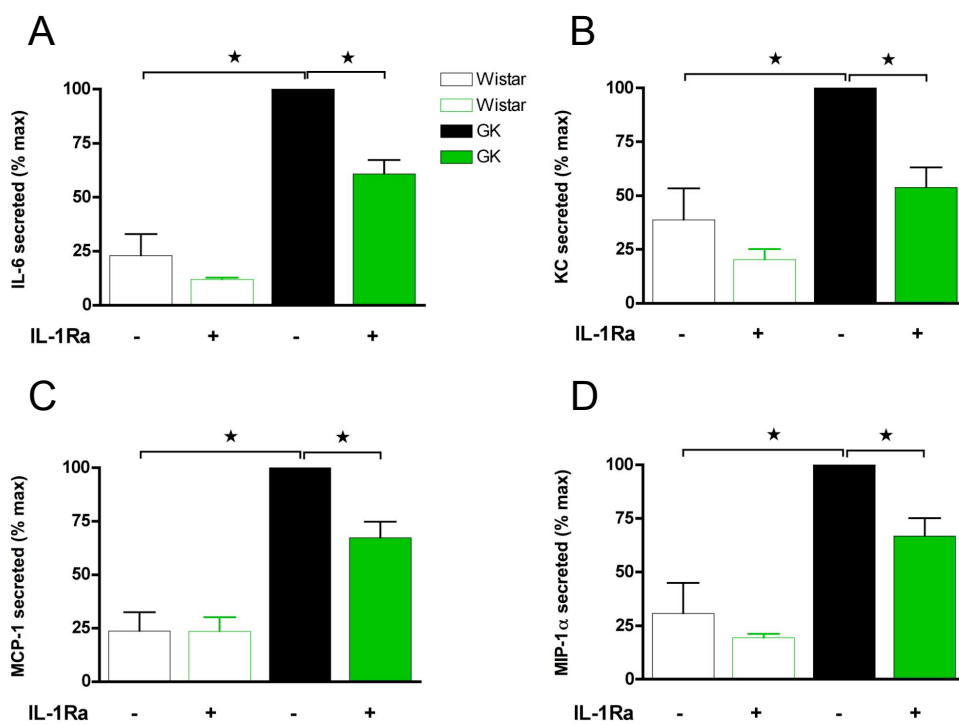


Figure 2: IL-1Ra reduces GK rat islet cytokine and chemokine release *in vitro*.

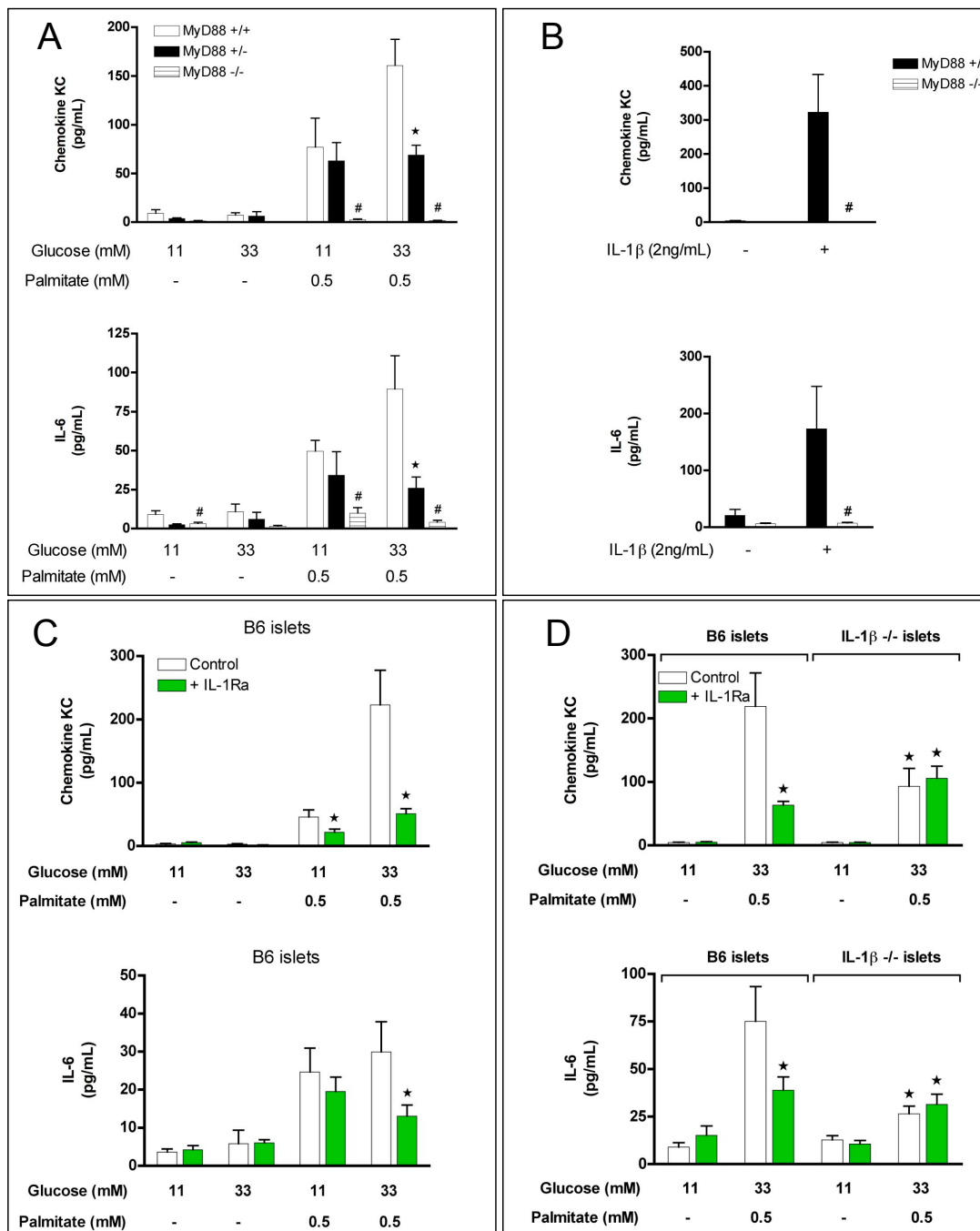


Figure 3: Metabolic stress stimulates pancreatic islet chemokine KC and IL-6 Release in an IL-1β-MyD88-dependent manner.

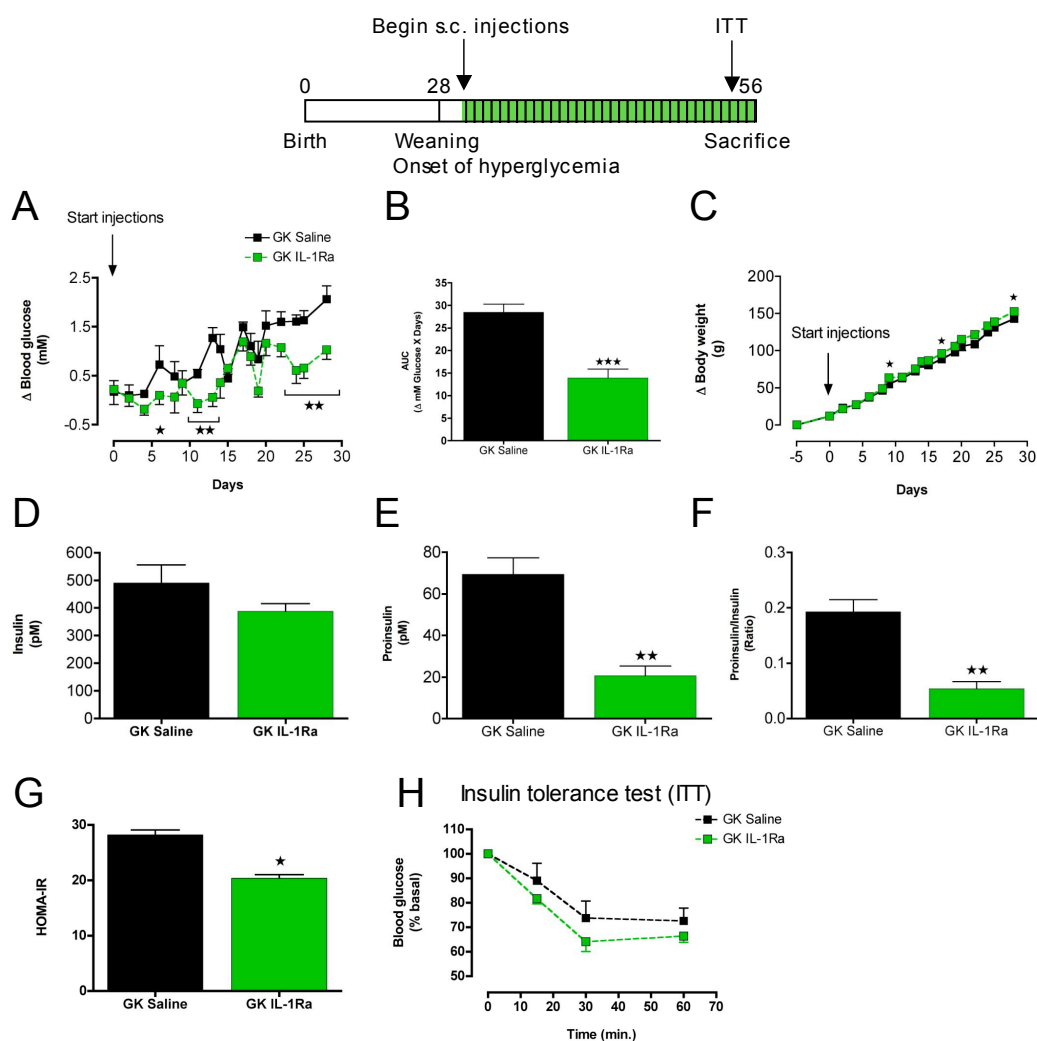


Figure 4: IL-1Ra treatment reduces hyperglycemia, reduces the proinsulin/insulin ratio, and improves insulin sensitivity in the GK rat.

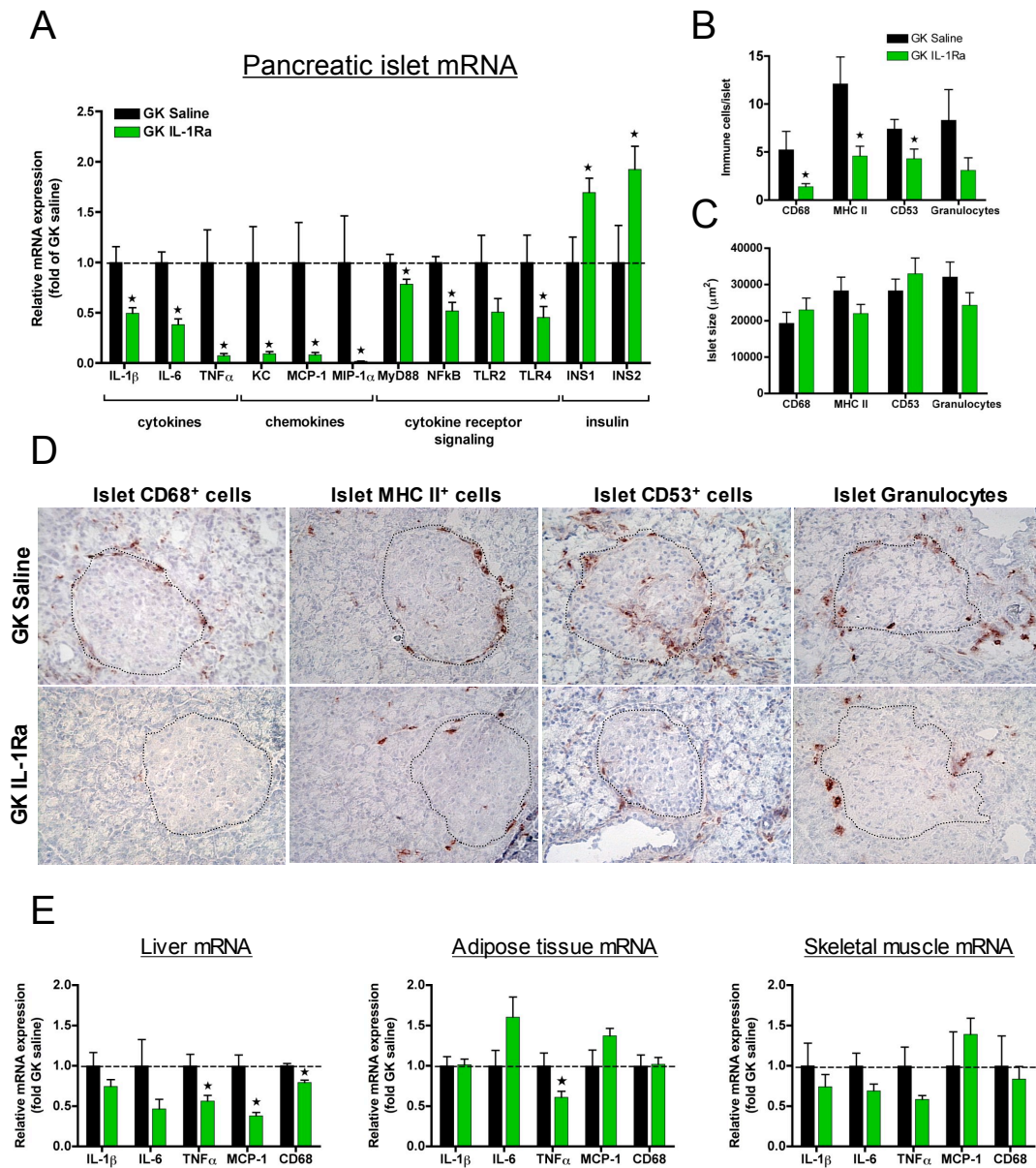


Figure 5: IL-1Ra treatment reduces tissue islet inflammation in the GK rat.

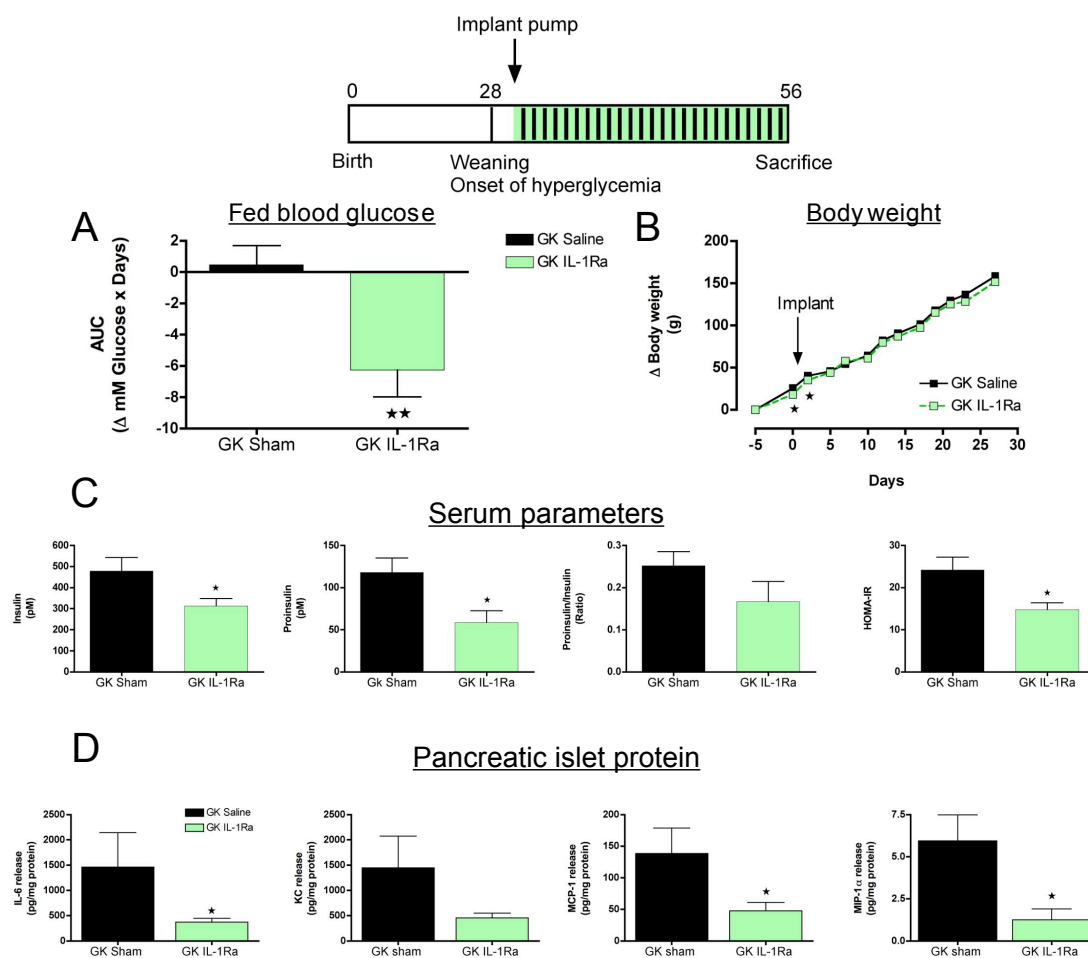


Figure S1: IL-1Ra administered by mini-osmotic pumps in the GK rat.

## **SUPPORTING INFORMATION**

### **MATERIALS AND METHODS**

**Animals.** Characteristics of the nonobese GK rat model of type 2 diabetes maintained in our colony at the University Paris-Diderot, together with the Wistar control rats, have been previously described (1, 2). Animal experimentation was performed in accordance with accepted standards of animal care as established in the French National Center for Scientific Research guidelines.

Specific-pathogen-free laboratory mice were from the Institute of Labortierkunde of the veterinary facility of the University of Zurich (Zurich, Switzerland). Experiments were performed according to Swiss veterinary law and institutional guidelines. Male mice aged 8-10 weeks were used for all experiments and C57BL/6J mice (Harlan, Netherlands) were used as controls. Male MyD88<sup>-/-</sup> mice backcrossed on C57BL/6J mice for 10 generations were kindly provided by Dr. S. Akira (Osaka University, Japan) (3). Male IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> mice on a C57BL/6J background were kindly provided by Dr. Iwakura (University of Tokyo) as previously described (4, 5). MyD88<sup>-/-</sup> mice were genotyped by PCR using the following primer sets: wtMyD88fw 5'-catggtggtggtgttctg-3', wtMyD88rv 5'-gggaaagtccttctcatcgc-3', MyD88neofw 5'-aaacgccggaactttcg-3', MyD88neorv 5'-gcttgccgaatatcatggtg-3'.

**Pancreatic islet isolation.** Two-month old male Wistar and GK rat islets were isolated by collagenase digestion, as previously described (6). Briefly, after animal sacrifice pancreata were digested with collagenase, and islets were handpicked under a stereomicroscope. Rat islets were cultured in RPMI 1640 medium containing 11 mM glucose, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 40  $\mu$ g/ml gentamycin and 10% FCS. For RNA extraction, islets were cultured in suspension for 4 h before extraction, while islets used for protein cytokine/chemokine release were plated on extracellular matrix (ECM)-coated 3-cm dishes for 48h (20 islets/2 ml of culture medium).

Mouse islets were isolated by collagenase digestion, followed by Histopaque™ gradient centrifugation (7). Mouse islets were cultured in the same medium as described above (hereafter referred to as islet media). Islets were initially cultured overnight in suspension and plated the following day. In all mouse islet experiments, islets were plated in 96-well plate ECM-coated dishes. Islet number and size were controlled for by plating 5 equally sized islets/well (as defined by J.A.E). Islets were allowed to adhere and spread on the ECM dishes for 48h before initiation of experiments.

**RNA extraction and real-time PCR.** Total rat islet RNA was extracted as described and reverse transcribed using random hexamers (2). Liver, adipose, and muscle tissue RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Switzerland). Commercially available rat primers (Applied Biosystems, CA, USA) were used and real-time PCR was performed using the ABI 7000 system (Applied Biosystems). Changes in mRNA expression were calculated using difference of C<sub>T</sub> values as compared to a housekeeping gene (18S), and expressed relative to controls.

**Cytokines and chemokines.** Rat and mouse islets were plated on ECM dishes and conditioned media were removed following 48h without or with stimulatory and/or inhibitory conditions. Media were assayed for IL-6, chemokine KC, MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  using mouse and rat Luminex™ kits (Millipore, Switzerland). Released cytokines/chemokines were normalized to total islet protein content as previously described (8).

**Free fatty acid preparation.** In some experiments islets were treated with 0.5 mM palmitate

(Sigma) as previously described (7). The sodium salt of palmitic acid was dissolved at 10 mM in RPMI-1640 medium containing 11% fatty acid-free BSA (Sigma, St. Louis, MI, USA) under an N<sub>2</sub>-atmosphere. For control incubations, 11% BSA was prepared, as described above. Before use, the effective free fatty acid concentrations were controlled with a commercially available kit (Wako, Germany). Dissolved palmitic acid was tested for endotoxin using the standard LAL test (Cambrex, Charles City, IA, USA), and found to contain levels in the range of 50 pg/ml, 100 000-fold lower than that required to elicit a response by LPS (5 µg/ml) in mouse islets based on dose-response experiments (not shown; n=5). Further, control BSA preparations had an equivalent amount of endotoxin, and islet media concentrations were below the limit of detection.

***In vivo IL-1Ra treatment.*** IL-1Ra (kindly donated by Amgen, CA, USA) treatment of the GK rats was performed using mini-osmotic pumps (Alzet 2004 model; CA, USA; 0.25 µl/hr, 100 mg/ml), or by twice daily subcutaneous injections (50 mg/kg/injection twice daily). Treatment was initiated 2-3 days following weaning (4 weeks old), after onset of mild fed hyperglycemia (9). Thereafter, non-fasting glycemia was determined with a glucose analyzer (Beckman, CA, USA) 2-3 times a week at 9-10 am.

Mini-osmotic pump experiments were terminated at 4-weeks and islets were isolated for determination of cytokine/chemokine release *in vitro*. Subcutaneous (s.c.) injection experiments were also stopped at 4-weeks after initiation of treatment. Prior to rat sacrifice an intraperitoneal (i.p.) insulin tolerance test (0.35 U/kg) was performed as previously described (10). At sacrifice organs (livers, epididymal adipose tissues, quadriceps muscles, and pancreata) were harvested for immunohistochemistry, islet isolations, and for total RNA isolation.

***Serum parameters.*** Serum insulin, proinsulin, and C-peptide were assayed according to the manufacturer's instructions (Mercodia, Sweden). Leptin and cytokines were assayed using Luminex technology™ (Millipore). FFA levels were quantified using an enzymatic colorimetric assay at 550 nm (NEFA C) from Wako Chemicals GmbH, Germany. Ketone levels were measured by the quantification of β-hydroxybutyrate, using the β-hydroxybutyrate LiquidColor kit from Stanbio Laboratory, TX, USA. Triglycerides and alkaline phosphatase activity were determined using enzymatic colorimetric assays according to the manufacturer's instructions (Pentra Triglycerid CP kit, and Alp CP kit all from ABX Diagnostics, Montpellier, France). Absorbance was measured on a Cobas Mira Chemstation (ABX Diagnostics). HOMA-IR was calculated as described (11).

***Immunohistochemistry.*** GK rat pancreatic cryosections were incubated with anti-CD68, anti-MHC class II, anti-CD53, and anti-granulocyte antibodies as previously described (2). Staining was visualized using appropriate peroxidase-coupled secondary antibodies and subsequent incubation with 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma, France). Immune cells associated with islets were quantified blindly in 25-40 islets in 3 animals per treatment group. Images and islet morphometry were completed using a Sony color video camera (CDD-IRIS-/RGB) with biocom visiolab 1000 and Histolab software (Biocom, France). Percentage of β-cell area relative to pancreatic area was assessed by staining for insulin as previously published (12).

***Statistics.*** Data are expressed as means ± S.E. with the number of individual experiments presented in the figure and table legends. All data were analyzed using the nonlinear regression analysis program PRISM (GraphPad, CA, USA), and significance was tested

using the Student's t-test and analysis of variance (ANOVA) with Newman Keuls post-hoc test for multiple comparison analysis. Significance was set at  $p < 0.05$ .

**Figure S1. IL-1Ra administered mini-osmotic pumps in the GK/Par rat.** Four-week old male GK/Par rats were implanted with Alzet 2004 mini-osmotic pumps containing saline (GK saline,  $n=6$ ) or IL-1Ra (GK IL-1Ra,  $n=7$ ) for 4 weeks. This resulted in an average dose of IL-1Ra of 6.75 mg/kg/day. Area under the curve (AUC) for delta ( $\Delta$ ) fed blood glucose values over 4 weeks of treatment is shown in (A),  $\Delta$  body weight is shown in (B). At the end of treatment circulating fed insulin, proinsulin, proinsulin/insulin ratio, and HOMA-IR were determined (C). After treatment, isolated islets were plated at 20 islets/well in quadruplicate, and conditioned media were removed after 48h and assayed for the indicated cytokine/chemokine and normalized to total islet protein (D,  $n=4$  for GK saline and  $n=4$  for GK IL-1Ra). Where  $n$  represents the animal number, and \* represents  $p < 0.05$  as determined by Student's t-test.

## REFERENCES

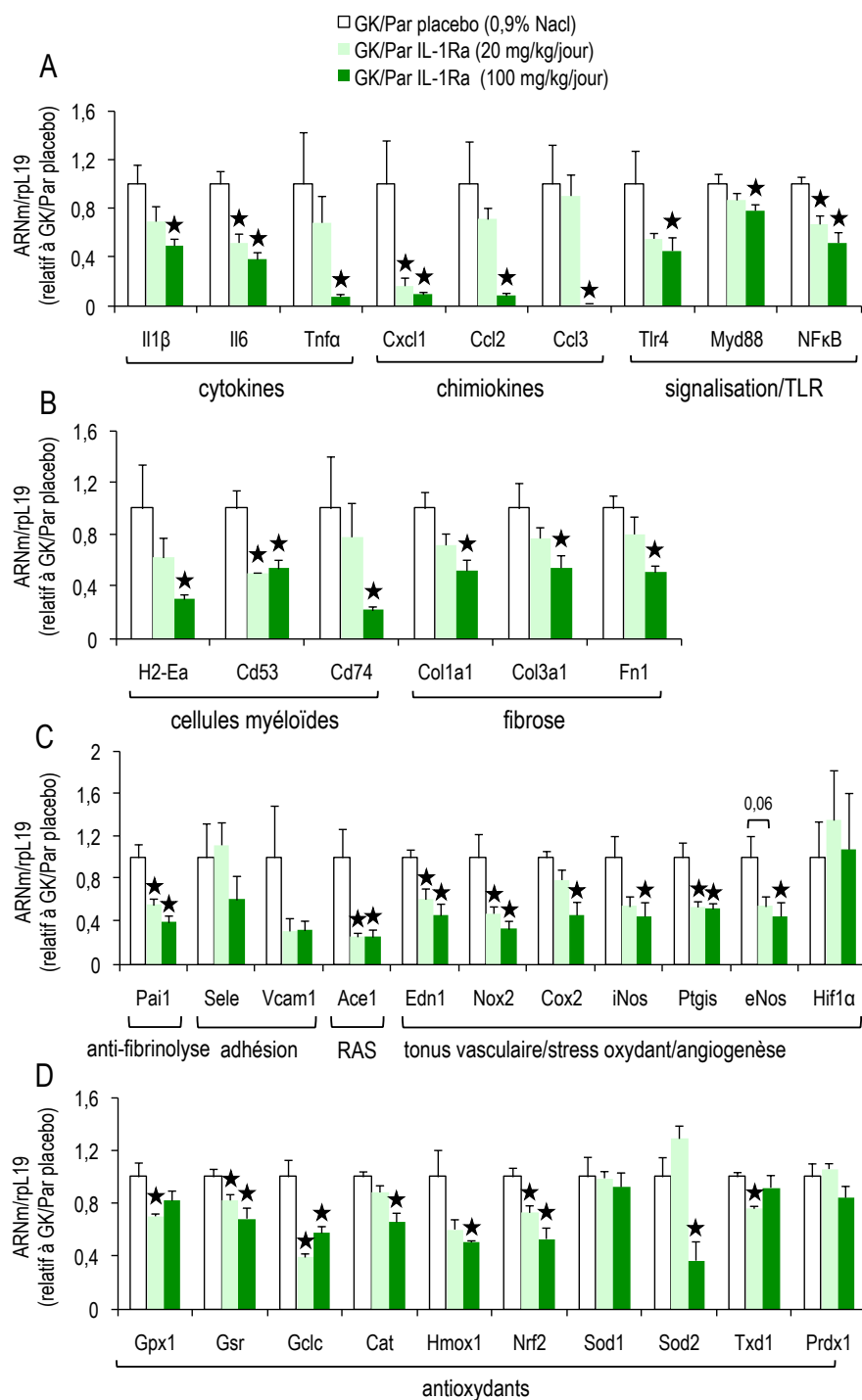
1. Portha, B., Giroix, M. H., Serradas, P., Gangnerau, M. N., Movassat, J., et al. (2001) Beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50 Suppl 1, S89-S93.
2. Homo-Delarche, F., Calderari, S., Irminger, J. C., Gangnerau, M. N., Coulaud, J., et al. (2006) Islet Inflammation and Fibrosis in a Spontaneous Model of Type 2 Diabetes, the GK Rat. *Diabetes* 55, 1625-33.
3. Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., et al. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-50.
4. Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., et al. (1998) Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187, 1463-75.
5. Maedler, K., Schumann, D. M., Sauter, N., Ellingsgaard, H., Bosco, D., et al. (2006) Low concentration of interleukin-1beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* 55, 2713-22.
6. Giroix, M. H., Vesco, L. & Portha, B. (1993) Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinology* 132, 815-22.
7. Ehses, J. A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J. A., et al. (2007) Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356-2370.
8. Ehses, J. A., Calderari, S., Irminger, J. C., Serradas, P., Giroix, M. H., et al. (2007) Islet inflammation in type 2 diabetes (T2D): From endothelial to beta-cell dysfunction. *Current Immunol Rev* 3, 216-232.
9. Portha, B. (2005) Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 21, 495-504.
10. Movassat, J., Bailbe, D., Lubrano-Berthelie, C., Picarel-Blanchot, F., Bertin, E., et al. (2008) Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E168-75.
11. Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11, 183-90.
12. Ellingsgaard, H., Ehses, J. A., Hammar, E. B., Van Lommel, L., Quintens, R., et al. (2008) Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl. Acad Sci U S A* 105, 13163-8.



### 3.5. Résultats complémentaires

#### 3.5.1. Effets transcriptionnels de l'IL-1Ra à faible dose dans l'îlot GK/Par

Les Articles 3 et 4 ne présentent pas les effets de l'IL-1Ra à 20 mg/kg/jour. Cette dose est déjà efficace pour diminuer l'activation de certains gènes que nous avons sélectionné dans les différentes familles impliquées dans les altérations insulaires (Fig. R11).

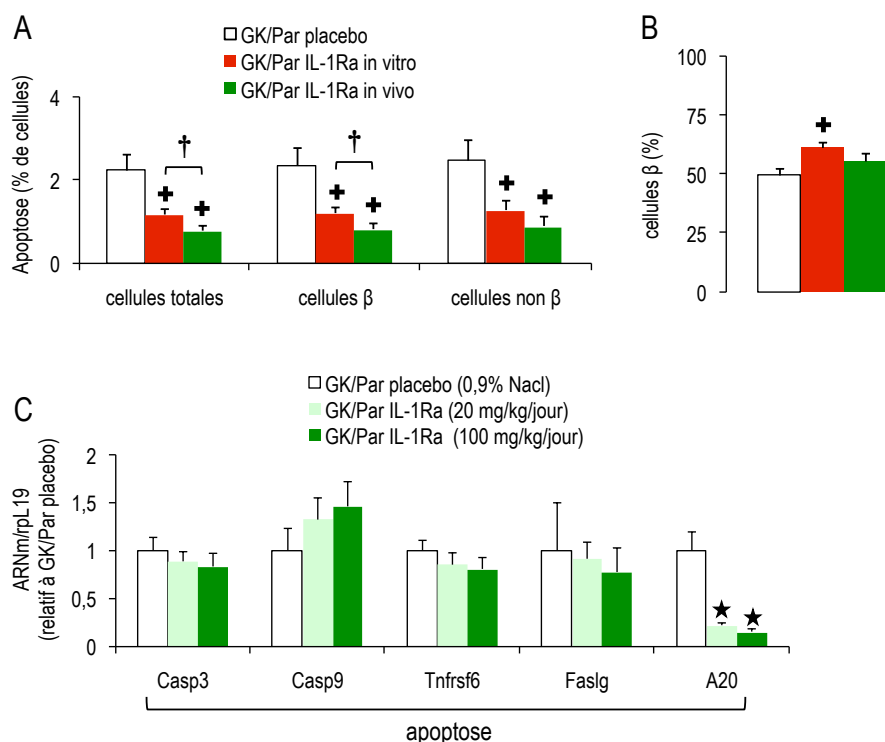


**Fig. R11. Effet préventif d'un traitement par l'IL-1Ra, chez le rat GK/Par, sur l'activation insulaire des gènes codant pour des cytokines/chimiokines, des récepteurs et molécules de signalisation associés aux cytokines (A) ; des marqueurs de cellules**

myéloïdes et de fibrose (B) ; des molécules anti-fibrinolytiques, de l'adhésion cellulaire, du système rénine-angiotensine (RAS), du stress oxydant, de l'angiogenèse et du tonus vasculaire (C) ; et antioxydantes (D). L'ARN total des îlots a été extrait de groupes d'îlots fraîchement isolés de rats GK/Par traités *in vivo* pendant 4 semaines par un placebo (solution saline, 0,9% NaCl) ou par l'IL-1Ra (deux doses : 20 ou 100 mg/kg/jour). L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 3 et 4). Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage *rpL19*. Les données représentent les moyennes par rapport au groupe placebo  $\pm$  SEM de 4–5 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  vs. GK/Par placebo. TLR, toll-like receptor.

### 3.5.2. Effets de l'IL-1Ra sur l'apoptose

Après 24h de culture, nous avons, par ailleurs, quantifier l'apoptose dans les îlots provenant de rats GK/Par traités avec une solution saline, en présence (GK/Par IL-1Ra *in vitro*) ou non (GK/Par placebo) d'IL-1Ra, ou provenant de rats traités par l'IL-1Ra *in vivo* (Fig. R12A). L'IL-1Ra *in vitro* ou *in vivo* diminue l'apoptose des cellules  $\beta$  et non  $\beta$ . Ces résultats sont associés à une augmentation du pourcentage de cellule  $\beta$  dans les conditions *in vitro* (Fig. R12B), et à une prévention de l'activation du gène de stress A20 dans les îlots frais (non cultivés) issus de rats traités *in vivo* (Fig. R12C).

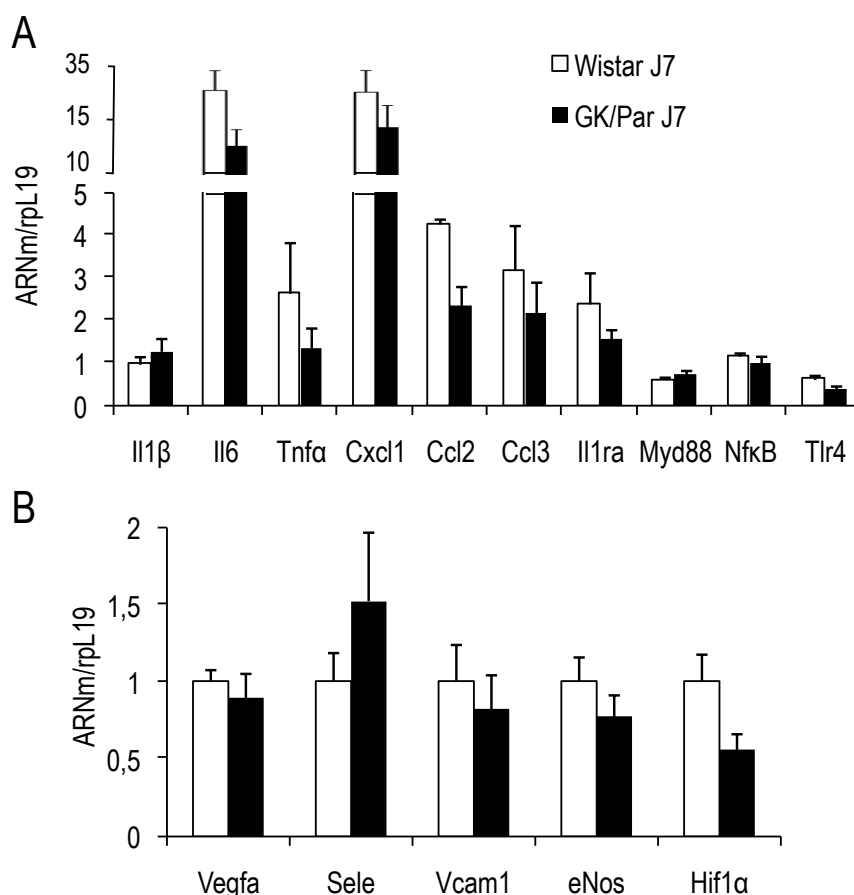


**Fig. R12. Effets d'un traitement *in vitro* ou *in vivo* par l'IL-1Ra sur l'apoptose après 24h de culture dans les îlots GK/Par.** Les îlots de rats GK/Par traités *in vivo* par un placebo (solution saline, 0,9%) ou l'IL-1Ra (100 mg/kg/jour) ont été cultivés 24h en présence de RPMI glucose 11 mmol/l ; l'apoptose des cellules  $\beta$  a été déterminée par co-marquage insuline-TUNEL (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 2). Dans certaines conditions, les îlots GK/Par placebo ont été traités *in vitro* par l'IL-1Ra (500 ng/ml). Les valeurs s'appliquent

à l'apoptose représentent le pourcentage de cellules  $\beta$  apoptotiques par rapport aux cellules  $\beta$  totales. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 2 expériences indépendantes. Environ 300 cellules  $\beta$  et 500 cellules totales ont été comptées par îlot (2–9 îlots par section), et 17–27 différentes sections ont été analysées pour chaque expérience indépendante. \* $p < 0,05$  vs. GK/Par placebo ; \* $p < 0,05$  vs. véhicule ; † $p < 0,05$  vs. GK/Par IL-1Ra in vitro.

### 3.5.3. Expression des gènes de l'inflammation et de l'activation endothéliale dans les îlots GK/Par avant l'installation du diabète

Les différents gènes sélectionnés et impliqués dans l'inflammation insulaire et l'activation endothéliale à l'âge de 2,5 mois sont normalement exprimés dans les îlots prédiabétiques GK/Par (Fig. R13). Néanmoins, il est à noter que l'utilisation de membranes "Oligo GEArrays", ciblées sur l'endothélium, l'angiogénèse et les marqueurs des maladies cardiovasculaires mettent en évidence des altérations d'expression d'autres gènes liés de l'endothélium à 7 jours (*Homo-Delarche et al., 2008*).



**Fig. R13. Absence d'induction insulaire des gènes de l'inflammation et de l'activation endothéliale avant l'installation du diabète chez le rat GK/Par.** L'ARN total des îlots a été extrait de groupes d'îlots fraîchement isolés de rats Wistar et GK/Par âgés de 7 jours (J7). L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 3 et 4). Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage rpL19. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes.

### 3.6. Conclusions et points de discussion

Après 1,5 mois d'exposition à l'hyperglycémie relativement peu élevée, mais associée à une hyperlipidémie, le rat GK/Par présente une altération endothéliale marquée au niveau insulaire. Il est probable que des altérations de la vascularisation favorisent/entretiennent un microenvironnement de stress oxydant assorti d'une inflammation, autour de la cellule  $\beta$  GK/Par diabétique, pouvant contribuer à sa dysfonction. Les effets bénéfiques de l'IL-1Ra sur l'expression des gènes de l'activation endothéliale, l'inflammation, du stress oxydant, de la vascularisation et de la fibrose mettent en lumière le rôle précoce et délétère de l'IL-1 dans l'îlot GK/Par. L'IL-1 $\beta$  apparaît donc comme un candidat important dans le mécanisme pathogène qui conduit au stress oxydant induit par la glucolipotoxicité, et à ses adaptations en terme de défenses antioxydantes chez le rat GK/Par.

#### 4. Étude du stress oxydant dans des tissus extrapancréatiques cibles de l'insuline chez le rat *anti-obèse* Lou/C et chez le rat diabétique GK/Par

##### Article 5 : Liver mitochondrial properties from the obesity-resistant Lou/C rat

###### 4.1. Questions posées

Bien que les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques (notamment sur le vieillissement) de la restriction calorique restent à éclaircir, l'hypothèse la plus reconnue s'accorde à dire que ces effets passeraient par une résistance contre le stress oxydant (Sohal et Weindruch, 1996 ; Yu, 1996 ; Merry, 2000). Récemment, au sein du laboratoire du Pr. X. Leverve, il a été montré que le rat Lou/C, modèle animal de restriction calorique spontanée, présente une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale diminuée dans le muscle squelettique (Garait et al., 2005). Néanmoins, cette faible production est normalisée en réponse à un régime hyperlipidique.

Lors de ma 1<sup>ère</sup> année de thèse, nous avons poursuivi l'exploration du phénotype particulier du rat Lou/C, en étudiant les particularités mitochondriale du foie, organe central dans la régulation de l'homéostasie glucidique. L'impact d'une modulation de la prise alimentaire sur les propriétés mitochondriales a été étudié selon différentes approches nutritionnelles comme : (i) l'ajustement des apports caloriques du rat Wistar sur ceux du Lou/C (*Wistar restraints*) ; et (ii) la mise en régime hyperlipidique d'un groupe de rats Lou/C. Ces travaux chez le rat Lou/C, qui ont donné lieu à une publication parue, ont été poursuivis par l'exploration des caractéristiques mitochondriales du rat diabétique GK/Par au niveau du foie et du muscle squelettique.

###### 4.2. Résultats principaux dans les mitochondries de foie de rat Lou/C

###### 4.2.1. Production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accrue

Dans les mitochondries isolées de rats Lou/C, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est supérieure en présence de substrats mimant les apports glucidiques (glutamate/malate/succinate) ou lipidiques (octanoyl-carnitine), comparativement aux rats Wistar. Nous avons mis en évidence la responsabilité du complexe I dans ce phénomène, du à une augmentation du flux reverse d'électrons (Article 5, Table 1 et Fig. 1). De plus, cette hyperproduction d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas reproduite dans le groupe Wistar restreint. L'augmentation des apports lipidiques des rats Lou/C n'influe pas sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

###### 4.2.2. Capacités oxydatives accrues

Parce que la production d'ERO mitochondriales est intrinsèquement liée à la consommation d'oxygène, nous avons étudié les capacités oxydatives. Les rats Lou/C présentent de nombreuses singularités mitochondriales attestant de capacités oxydatives accrues comparativement aux Wistar. En effet, nous avons mis en évidence (i) une augmentation des flux respiratoires en présence de différents types de substrats, certains entrant au niveau du complexe I (glutamate/malate), ou du complexe II (succinate) ou de ces deux complexes simultanément (glutamate/malate/succinate ; octanoyl-carnitine) (Article 5, Table 2) ; (ii) une activité citrate synthase (reflète l'activité mitochondriale totale) accrue (Article 5, Table 3) ; et (iii) une activité acyl-CoA déshydrogénase, spécifique des acides gras à chaînes moyennes, augmentée (Article 5, Table 4).

#### 4.2.3. Découplage intrinsèque de la chaîne respiratoire

Les mécanismes bioénergétiques menant à l'augmentation de la consommation d'oxygène sont de deux types : (i) la conductance aux protons au travers de la membrane mitochondriale interne *via* les protéines découplantes ; et (ii) le découplage intrinsèque de la chaîne respiratoire *via* la cytochrome oxydase. Nous avons démontré que c'est la deuxième option qui opère spontanément dans les mitochondries hépatiques Lou/C. En effet, d'un point de vue fonctionnel, la consommation d'oxygène reste identique entre les deux groupes de rats sur un large segment de  $\Delta\Psi_m$ , et les mitochondries Lou/C sont capables de maintenir des niveaux respiratoires plus élevés à de hauts  $\Delta\Psi_m$  (Article 5, Fig. 2 et 3). En outre, au plan constitutionnel, la caractérisation des mitochondries Lou/C montre (i) une sous-expression du gène *Ucp2* (Article 5, Fig. 4) ; (ii) une activité du complexe IV accrue ; et (iii) des proportions en cytochrome *c* et *aa<sub>3</sub>* supérieures à celles des Wistar (Article 5, Table 3).



## ORIGINAL ARTICLE

# Liver mitochondrial properties from the obesity-resistant Lou/C rat

G Lacraz<sup>1</sup>, K Couturier<sup>1</sup>, N Taleux<sup>1</sup>, S Servais<sup>2</sup>, B Sibille<sup>2</sup>, D Letexier<sup>2</sup>, B Guigas<sup>1</sup>, H Dubouchaud<sup>1</sup>, X Lerverve<sup>1</sup> and R Favier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U884, Université Joseph Fourier, Grenoble Cedex, France and <sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMR 5123, Université Claude Bernard Lyon, Villeurbanne Cedex, France

**Objective:** The first objective was to evaluate the influence of caloric intake on liver mitochondrial properties. The second objective was aimed at determining the impact of increasing fat intake on these properties.

**Design:** Lou/C rats, displaying an inborn low caloric intake and resistant to diet-induced obesity, were compared to Wistar rats fed either *ad libitum* or pair-fed. An additional group of Lou/C rats were allowed to increase their fat intake by adjusting their diet from a standard high carbohydrate low-fat diet to a high-fat carbohydrate-free diet.

**Measurements:** Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation, oxygen consumption rate ( $J_{O_2}$ ), membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), activity of respiratory chain complexes, cytochrome contents, oxidative phosphorylation efficiency (OPE) and uncoupling protein 2 (UCP2) expression were determined in liver mitochondria.

**Results:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was higher in Lou/C than Wistar rats with glutamate/malate and/or succinate, octanoyl-carnitine, as substrates. These mitochondrial features cannot be mimicked by pair-feeding Wistar rats and remained unaltered by increasing fat intake. Enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by mitochondria from Lou/C rats is due to an increased reverse electron flow through the respiratory-chain complex I and a higher medium-chain acyl-CoA dehydrogenase activity. While  $J_{O_2}$  was similar over a large range of  $\Delta\Psi$  in both strains, Lou/C rats were able to sustain higher membrane potential and respiratory rate. In addition, mitochondria from Lou/C rats displayed a decrease in OPE that cannot be explained by increased expression of UCP2 but rather to a slip in proton pumping by cytochrome oxidase.

**Conclusions:** Liver mitochondria from Lou/C rats display higher reactive oxygen species (ROS) generation but to deplete upstream electron-rich intermediates responsible for ROS generation, these animals increased intrinsic uncoupling of cytochrome oxidase. It is likely that liver mitochondrial properties allowed this strain of rat to display higher insulin sensitivity and resist diet-induced obesity.

*International Journal of Obesity* advance online publication, 15 January 2008; doi:10.1038/sj.ijo.0803779

**Keywords:** high-fat diet; free radicals; mitochondrial membrane potential; oxidative phosphorylation efficiency; intrinsic uncoupling; cytochrome oxidase

## Introduction

The major difference between Lou/C, a strain of rats of Wistar origin,<sup>1</sup> and more common rat strains like Wistar, Fisher 344 or Brown Norway, is the protection against excess fat accretion and development of insulin resistance with ageing.<sup>2–4</sup> Indeed, Wistar or Fisher 344 strains develop spontaneous obesity with ageing,<sup>5,6</sup> whereas Lou/C rats

exhibit a stable adiposity throughout life associated with an inborn low caloric intake (LCI).<sup>1,4,7,8</sup> Although the mechanisms responsible for low energy intake and resistance to obesity of the Lou/C rats are probably multifactorial, it must be kept in mind that LCI while avoiding malnutrition is reputed for reducing the incidence and retarding the onset of numerous age-related biological processes.<sup>7,9–12</sup> The mechanisms underlying the robust and widespread protective effects of LCI remain to be clearly identified, but a leading hypothesis suggests that the effects of LCI may be due to a reduced generation of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria.<sup>10–12</sup> LCI alters the equilibrium between rates of oxidant generation and oxidant scavenging, repair and turnover processes in a tissue-specific and time-dependent manner.<sup>10–12</sup>

Correspondence: Dr R Favier, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U 884, Université Joseph Fourier, BP 53X, 2280 Rue de la Piscine, Grenoble Cedex 09 38041, France.  
 E-mail: roland.favier@ujf-grenoble.fr  
 Received 14 March 2007; revised 21 October 2007; accepted 5 November 2007



The recent implication of oxidative stress in many pathological alterations (insulin resistance, hyperinsulinemia, hyperglycemia, dyslipidemia, etc.) characteristics of the metabolic syndrome (see Frisard and Ravussin<sup>13</sup> for a recent review) suggests that the Lou/C strain might represent an appropriate model for examining the impact of caloric intake on mitochondrial properties (oxidative phosphorylation efficiency, ROS production) in relation to fat metabolism and insulin sensitivity. This suggestion is somewhat supported by our recent data<sup>1,14,15</sup> showing that the intriguing phenotype of Lou/C rats cannot be easily reproduced in Wistar rats by adjusting food intake (pair-feeding) since Lou/C rats displayed a lower visceral adiposity<sup>1,14</sup> as compared to pair-fed Wistar (WPF) rats. Furthermore, we found that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was reduced in skeletal muscle mitochondria of Lou/C compared with Wistar rats,<sup>15</sup> and this localized adaptation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production can be reversed by allowing this peculiar strain to switch on a high-fat intake owing to their strong preference for fat.<sup>2,3,8,15</sup> Collectively, these data suggest that Lou/C rats display specific mitochondrial properties permitting to oxidize fatty acids to a greater extent.

The major goal of the present study was to examine liver mitochondrial properties in Lou/C and Wistar rats fed either *ad libitum* (WAL) or pair-fed (WPF). The second objective of the study was to evaluate the impact of high-fat diet on these properties, since we recently found that the reduced oxidative stress evidenced in skeletal muscle from Lou/C rats is lost in skeletal muscle mitochondria when fat proportion in the diet is increased.<sup>15</sup>

## Methods

All procedures were performed in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals.

### *Animals and experimental design*

Adult male Wistar and Lou/C rats bred in our animal room facilities were caged individually and maintained in a 25 °C, 50 ± 10% relative humidity and 12h:12h light-dark environment.

**Experiment 1.** All the rats were provided *ad libitum* with a standard rat chow (UAR A04, Villemoisson, France) except an additional group of Wistar rats (WPF, *n* = 10) which was pair-fed for 3 months by adjusting daily caloric intake to the amount of chow consumed by Lou/C rats.

**Experiment 2.** In this experiment, Lou/C rats had the choice between the standard chow (UAR A04) and a high-fat diet,<sup>15</sup> both of which were provided *ad libitum* in stainless steel hanging cages. Body weight and food intake were recorded

thrice weekly and fresh food was provided at the same time to ensure minimal disturbance to the animals' food behavior.

The rats were killed by cervical dislocation and livers were quickly excised, rinsed and chopped into isolation medium (250 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl and 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)-Tris, pH 7.4). Nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 800g for 10 min. Mitochondria were isolated from the supernatant by spinning twice at 8000g for 10 min. The mitochondrial pellet was resuspended in 0.5 ml of isolation buffer and kept on ice. Mitochondrial protein was measured by the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA). The final mitochondrial suspensions were maintained over ice and were used for measurements of oxygen consumption and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production.

### *Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production*

Generation of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined on an SFM25 computer-controlled Kontron fluorometer by measuring the linear increase in fluorescence (excitation at 312 nm, emission at 420 nm) due to enzymatic oxidation of homovanillic acid by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of horseradish peroxidase.<sup>16</sup> Mitochondria (1 mg ml<sup>-1</sup>) were incubated at 30 °C in a buffer containing 125 mM KCl, 5 mM Tris-Pi, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA, 0.1% fat free BSA (pH 7.2) and containing 6 U ml<sup>-1</sup> of horseradish peroxidase and 0.1 mM homovanillic acid. The reaction was started by addition of various substrates: glutamate/malate (G/M; 5 mM/2.5 mM) and succinate (5 mM) alone or in combination, and octanoyl-carnitine (100 μM). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured both in basal conditions and 2 μM rotenone and 2 μM antimycin A were sequentially added to determine the maximum rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of complexes I and I + III of the respiratory chain, respectively.

### *Mitochondrial oxygen consumption*

The rate of mitochondrial oxygen consumption (*J*<sub>O<sub>2</sub></sub>) was measured at 30 °C in an oxygraph equipped with a Clark-type O<sub>2</sub> electrode and containing the same incubation medium as for mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. The incubation medium was constantly stirred with a built-in electromagnetic stirrer and bar flea. Mitochondria (1 mg ml<sup>-1</sup>) were energized with the same substrates used for mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and *J*<sub>O<sub>2</sub></sub> was recorded before and after adding 1 mM ADP and following the addition of oligomycin (1.25 g per mg protein).

### *Oxidative phosphorylation efficiency*

ATP/O ratios were determined from the ATP synthesis rate (*J*<sub>ATP</sub> vs *J*<sub>O<sub>2</sub></sub>) with an ADP-regenerating system, based on hexokinase plus glucose.<sup>17</sup> *J*<sub>O<sub>2</sub></sub> was measured as described above in a medium containing 125 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM Tris-Pi, 20 mM Tris-HCl, 0.1% fat-free BSA (pH 7.2), and



supplemented with 5 mM glutamate/2.5 mM malate/5 mM succinate or octanoyl-carnitine (100  $\mu$ M).  $J_{ATP}$  was determined from glucose 6-phosphate formation in the presence of 20 mM glucose, 1 mM  $MgCl_2$  and 125  $\mu$ M ATP.  $J_{ATP}$  and  $J_{O_2}$  were modulated by addition of increasing concentrations of hexokinase.

#### Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane electrical potential ( $\Delta\Psi$ ) was determined simultaneously with oxygen consumption using the potential-dependent triphenylmethyl phosphonium cation (TPMP<sup>+</sup>) probe.<sup>18</sup> Mitochondria (1 mg ml<sup>-1</sup>) were incubated in an assay medium containing 5  $\mu$ M rotenone, 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> oligomycin and 65 ng ml<sup>-1</sup> nigericin (to convert most of the pH component of  $\Delta p$  to membrane potential units (mV), allowing  $\Delta p$  to be measured in millivolt units. The TPMP<sup>+</sup> electrode was calibrated with sequential additions of up to 2  $\mu$ M TPMP<sup>+</sup>, and 4 mM succinate was added to start the reaction. Respiration and membrane potential were inhibited progressively through successive additions of malonate up to 3 mM. At the end of each run, 0.4  $\mu$ M carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) was added to dissipate the membrane potential and release all TPMP<sup>+</sup> back into the medium, allowing correction for any small electrode drift. The matrix volume of mitochondria was assumed to be 0.5  $\mu$ l per mg protein.

#### Cytochrome content

Cytochrome content of the mitochondrial respiratory chain was measured in parallel experiments by comparing the spectra of fully oxidized (potassium ferricyanide) vs fully reduced (few crystals of sodium dithionite) cytochromes. Knowing the contributions in absorbance of each cytochrome to the major maxima and minima of each of the other cytochromes, a set of four simultaneous equations with four unknowns can be derived and concentration of each cytochrome can be calculated.<sup>19</sup>

#### Enzymatic activities

Measurement of the specific activity of the respiratory chain complexes I, II and IV was performed spectrophotometrically. A total of 8–10  $\mu$ g of mitochondrial proteins were required to determine the activity of complexes I and II, and only 4  $\mu$ g was used for complex IV. Enzyme activity was

expressed as nanomoles of reduced or oxidized substrate per minute and per milligram of mitochondrial protein.

*Measurement of complex I (rotenone-sensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase, EC 1.6.99.3).* Assay was performed using 100  $\mu$ M decylubiquinone as an electron acceptor and 200  $\mu$ M NADH as a donor, in a 10 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  buffer (pH 7.5) containing BSA (3.75 mg ml<sup>-1</sup>), KCN (2 mM) and antimycin A (7.5  $\mu$ M). The oxidation of NADH was then measured at 340 nm, before and after the addition of rotenone (4  $\mu$ M), which allowed the calculation of the rotenone-sensitive specific activity, which is characteristic of complex I.

*Measurement of complex II (succinate-ubiquinone reductase, EC 1.3.99.1).* Succinate-ubiquinone oxidoreductase activity was quantified by measuring the decrease in UV absorbance due to the reduction of 2,6-dichloro-phenol indophenol (DCPIP) (100  $\mu$ M) at 600 nm. The measurement was performed in 50 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  (pH 7.5) medium in the presence of 100  $\mu$ M decylubiquinone, 2  $\mu$ M rotenone and 2 mM KCN.

*Measurement of complex IV (cytochrome c oxidase, EC 1.9.3.1).* Assay was performed by measuring cytochrome *c* (100  $\mu$ M) oxidation at 550 nm in a 50 mM  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$  buffer (pH 7.0).

Activity of long-, medium- and short-chain Acyl-CoA dehydrogenase was determined as previously reported.<sup>20</sup>

#### UCP2 expression

Total RNA was extracted from liver (80 mg) using Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Concentration and purity were verified by measuring optical density at 260 and 280 nm. Their integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis (Eurobio, Montpellier, France). UCP2 mRNA concentration was measured by semiquantitative reverse transcription PCR using cyclophilin as reference. Primer sequences are shown in Table 1. For each target mRNA, an RT was performed from 1  $\mu$ g of total RNA with 100 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières les bains, France), 5  $\mu$ l of M-MLV RT 5 $\times$  buffer, 20 U of RNasin ribonuclease inhibitor, 12 pmol of deoxynucleoside triphosphate and 1  $\mu$ g of oligo dT, in a final volume of 25  $\mu$ l. The reaction consisted of 5 min at 70 °C (RNA and oligodT), then 90 min at 42 °C (all mix) followed by 10 min at 70 °C. After chilling, 5  $\mu$ l was used for PCR reaction. RT medium (5  $\mu$ l)

	Sense (5' → 3')	Antisense (5' → 3')	Size (bp)
Cyclophilin (NM_017101)	GTGGCAAGTCCATCTACGGAG	CCACAGTCCGAGATGGTGATC	265
UCP2 (NM_019354)	AGCAGTCTACACCAAGGCC	AGCATGGTCAGGCACAGTG	472


**Table 1** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by liver mitochondria from Wistar rats fed a standard diet either *ad libitum* (WAL) or pair-fed (WPF) and from Lou/C fed a standard diet or allowed to increase their fat intake (Lou/C-HF)

	WAL	Lou/C	WPF	Lou/C-HF
<i>Glutamate/malate</i>				
Rotenone	48.8 ± 4.6	73.4 ± 4.5*	48.5 ± 2.1 <sup>†</sup>	66.9 ± 8.6*
Antimycin A	75.6 ± 8.5	104.0 ± 7.7*	61.6 ± 5.9 <sup>†</sup>	99.6 ± 17.3*
<i>Succinate</i>				
Rotenone	0.7 ± 0.7	2.6 ± 2.0	ND	1.0 ± 1.0
Antimycin A	65.2 ± 7.6	91.0 ± 7.1*	34.5 ± 4.7* <sup>†</sup>	74.9 ± 8.8
<i>Glutamate/malate/succinate</i>				
Rotenone	6.7 ± 2.3	12.6 ± 2.7*	3.9 ± 1.7 <sup>†</sup>	19.6 ± 5.2
Antimycin A	49.6 ± 5.9	84.3 ± 5.7*	38.3 ± 3.1 <sup>†</sup>	89.9 ± 14.8*
<i>Octanoyl/carnitine</i>				
Rotenone	118.0 ± 8.9	144.8 ± 13.8*	112.6 ± 5.5 <sup>†</sup>	173.9 ± 24.5*
Antimycin A	171.7 ± 12.2	235.3 ± 16.8*	127.9 ± 5.8 <sup>†</sup>	278.7 ± 28.6*

Abbreviation: ND, not determined. Mitochondria (1 mg ml<sup>-1</sup>) were incubated in a buffer containing 125 mM KCl, 5 mM Tris-Pi, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA, 0.1% fat-free BSA (pH 7.2) and containing 6 U ml<sup>-1</sup> of horseradish peroxidase and 0.1 mM homovanillic acid. The reaction was started by adding 5 mM glutamate/2.5 mM malate and/or 5 mM succinate or 100 μM octanoyl-carnitine. Rotenone (2 μM) and antimycin A (2 μM) were sequentially added to determine, respectively, the maximum rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of complexes I and I+III, of the respiratory chain. Values are means ± s.e.m. (n = 8–10). \*Significantly different from WAL (P < 0.01). <sup>†</sup>Significantly different from Lou/C (P < 0.01).

was added to 45 μl of PCR mix containing 5 μl of 10 × platinum *Taq* PCR buffer, 6 pmol of MgCl<sub>2</sub>, 8 pmol of deoxynucleoside triphosphate, 2.5 U of platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 22.5 pmol of corresponding sense and antisense primers. The PCR conditions were 2 min at 94 °C followed by 27 cycles or 23 cycles for UCP2 and cyclophilin, respectively (one cycle = 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C). PCR was ended by 10 min at 72 °C. Products were analyzed on 2% agarose gel prestained with ethidium bromide. For quantification of relative band intensities, pictures were taken with a Camera DC120 (Kodak Scientific Imaging System) and the ratio of each target to cyclophilin was determined for each sample with Kodak Digital Science 1D 2.0 (Kodak Scientific Imaging System).

#### Immunoblotting

Liver mitochondrial contents in UCP2 were determined by western blot. Mitochondrial proteins (100 μg) along with molecular weight markers were separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred by electroblotting on polyvinylidene difluoride membranes. Polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 1 h in blocking buffer (NaCl 150 mM, non-fat dried milk 5%, Tween-20 0.1%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4), and then incubated overnight at 4 °C with a rabbit polyclonal antibody against UCP2.<sup>21</sup> Membranes were washed three times in NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4 and then incubated for 1 h with a horseradish peroxidase-linked secondary antibody (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH Saclay, France). Protein contents were detected by enhanced chemiluminescence with exposure on autoradiography films (Kodak X-OMAT). Band densities

were quantified by software analysis using Scion Image (Scion Corporation). To allow consistency between experiments, a small aliquot of the same sample was systematically loaded on every gel and the generated signal was used as one arbitrary unit to express the results. A small quantity of purified mouse UCP2 produced as inclusion bodies in the *Escherichia coli* C41 (DE3) bacterial strain<sup>21</sup> was used as a positive control to ensure proper UCP2 identification on gels.

#### Statistical analysis

All data are reported as means ± s.e.m. Statistical comparisons were carried out using a one- or a two-way analysis of variance for repeated or non-repeated measures as applicable. When significant differences were observed, comparisons between mean values were made using a Fischer's protected least square difference test. Significance levels were set *a priori* at P < 0.05 for all comparisons.

## Results

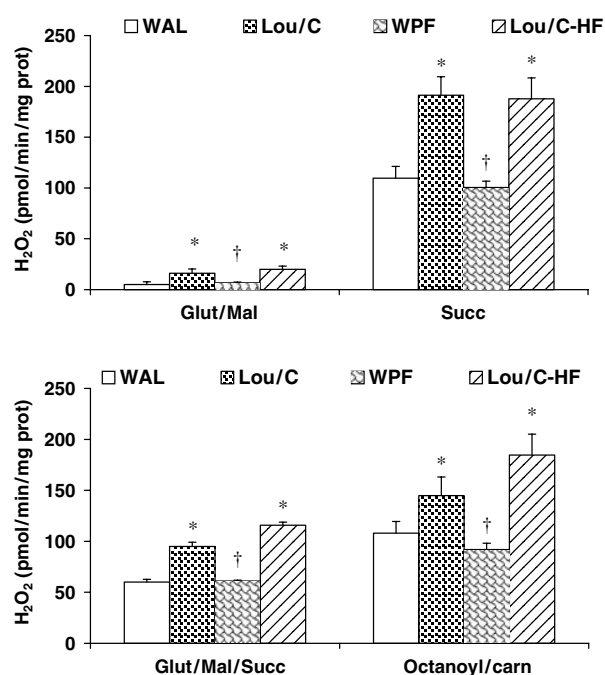
#### Body growth and food intake

When fed a standard diet, Lou/C rats displayed a stunted growth that is due to their low energy intake in agreement with previous data.<sup>1</sup> By adjusting caloric intake of Wistar rats to the amount eaten by Lou/C rats, we were able to match growth rate of WPF to that of Lou/C rats and at the time of killing, body weight was similar in WPF (310 ± 3 g) and Lou/C rats (322 ± 3 g). On the other hand, when Lou/C rats were allowed to choose between standard and high-fat diets, these rats (Lou/C-HF) displayed a strong preference for fat, which represented approximately 40% of their total caloric intake

(data not shown). Nevertheless, caloric intake of Lou/C-HF over the entire period of experiment was similar to that measured in Lou/C rats fed a standard high carbohydrate diet (data not shown).

#### Mitochondrial $H_2O_2$ production

The basal rates of  $H_2O_2$  production by liver mitochondria were clearly dependent upon the substrates provided to mitochondria. Thus, the amount of  $H_2O_2$  produced with complex I-linked substrate (G/M) was ~5% of the amount of  $H_2O_2$  produced with succinate, which is oxidized at the level of succinate-ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain. When mitochondria were incubated simultaneously with glutamate/malate and succinate (G/M/S), then  $H_2O_2$  production was reduced by ~50% as compared to succinate alone. To further explore mitochondrial  $H_2O_2$  generation, we evaluated another substrate (octanoyl-carnitine) that is known to generate both NADH and  $FADH_2$  like G/M/S. By incubating mitochondria with octanoyl-carnitine,



**Figure 1** Mitochondrial  $H_2O_2$  production by liver mitochondria from Wistar rats fed a standard diet either *ad libitum* (WAL) or pair-fed (WPF) and from Lou/C rats fed a standard diet (Lou/C) or allowed to increase their fat intake (Lou/C-HF, see Materials and methods). Mitochondria ( $1\text{ mg ml}^{-1}$ ) were incubated in a buffer containing 125 mM KCl, 5 mM Tris-Pi, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA, 0.1% fat-free BSA (pH 7.2) and containing  $6\text{ U ml}^{-1}$  of horseradish peroxidase and 0.1 mM homovanillic acid. The reaction was started by adding 5 mM glutamate/2.5 mM malate and/or 5 mM succinate or octanoyl-carnitine. Values are means  $\pm$  s.e.m. ( $n=8-10$ ). \*Significantly different from WAL ( $P<0.01$ ). †significantly different from Lou/C rats ( $P<0.01$ ).

we found a greater  $H_2O_2$  production than with G/M/S (Figure 1).

Interestingly, the rates of  $H_2O_2$  production by Lou/C mitochondria were significantly higher than Wistar rats, irrespective of the substrates used to energize mitochondria. In comparison with the results obtained with Lou/C rats, mitochondrial ROS production was significantly lower in WPF rats whether the mitochondria were energized with G/M, succinate, G/M/S or octanoyl-carnitine (Figure 1). As a whole, the rates of  $H_2O_2$  production by liver mitochondria were similar in WAL and WPF, indicating that, in our conditions, a 40% caloric restriction (CR) for 3 months has no major effect on mitochondrial  $H_2O_2$  generation in the liver of Wistar rats. Mitochondrial ROS generation remained unaltered by allowing Lou/C rats to increase fat intake with all substrates (Figure 1).

The high  $H_2O_2$  production rate evidenced by Lou/C mitochondria was mainly due to an enhanced ROS generation through a reverse electron flow at the level of complex I of the respiratory chain as evidenced by the drastic decrease in ROS production following addition of rotenone to mitochondria energized with succinate or G/M/S (Table 1). Nevertheless mitochondrial ROS production at the level of complex I through the forward electron and at the level of complex III remained also significantly higher in Lou/C than Wistar rats as evidenced by the significant increase in  $H_2O_2$  production with rotenone in the presence of G/M and after antimycin A addition (Table 1).

Whereas rotenone drastically reduced mitochondrial  $H_2O_2$  generation with G/M/S, this complex I inhibitor was ineffective in mitochondria incubated with octanoyl-carnitine (Table 1). Finally, addition of antimycin A resulted in a significant enhancement of  $H_2O_2$  generation whatever the strain, the diet or the substrates, the extent of this effect being significantly greater with octanoyl-carnitine than G/M/S.

Taken together, our results indicate that hepatic mitochondrial  $H_2O_2$  production was drastically different in Lou/C as compared to Wistar rats and was neither mimicked by pair-feeding nor modulated by changes in fat availability.

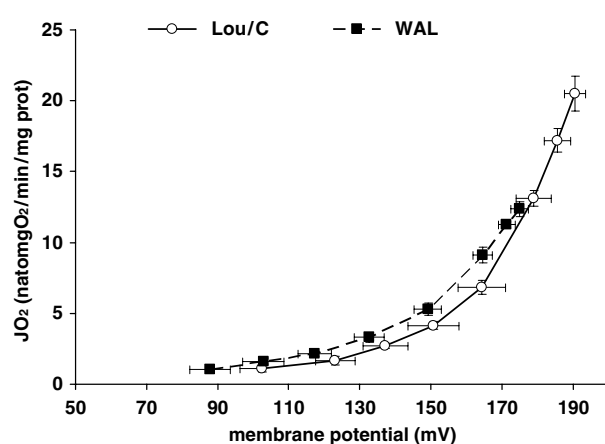
#### Mitochondrial oxygen consumption–proton conductance–respiratory chain efficiency–UCP2 expression

To investigate whether the difference in hepatic mitochondrial  $H_2O_2$  generation evidenced between the two strains could be due to specific mitochondrial properties, we measured several mitochondrial parameters in Wistar and Lou/C rats fed a standard diet *ad libitum*. Mitochondrial oxygen consumption rates ( $J_{O_2}$ ) were significantly higher in Lou/C than in Wistar rats in both states 4 (that is non-phosphorylating conditions in the presence of oligomycin) and 3 (after addition of ADP) energetic states (Table 2). These modifications observed whichever the substrates used (G/M, succinate, G/M/S or octanoyl-carnitine) could be due to a change in the proton leak through the inner mitochondrial


**Table 2** O<sub>2</sub> consumption (nano atom mg O/min/mg protein) by liver mitochondria from Lou/C and Wistar rats fed *ad libitum* (WAL)

	WAL		Lou/C	
	State 4	State 3	State 4	State 3
Glutamate/malate	8.0 ± 0.3	82.8 ± 4.3	17.3 ± 1.1*	216.7 ± 19.2*
Succinate	14.7 ± 0.6	111.4 ± 2.0	30.4 ± 4.2*	287.3 ± 21.5*
Glutamate/malate/succinate	18.4 ± 1.7	144.5 ± 7.3	25.1 ± 0.9*	180.4 ± 5.2*
Octanoyl-carnitine	7.0 ± 0.5	46.4 ± 1.8	7.7 ± 0.4	54.4 ± 2.3*

Mitochondria (1 mg ml<sup>-1</sup>) were incubated in a buffer containing 125 mM KCl, 5 mM Tris-Pi, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM EGTA, 0.1% BSA (pH 7.2) supplemented with glutamate (5 mM)/malate (2.5 mM) and/or succinate (5 mM) or octanoyl-carnitine (100 μM), in the absence (state 4) or in the presence (state 3) of ADP (1 mM). Values are means ± s.e.m. (n = 8–10). \*Significantly different from WAL.



**Figure 2** Liver mitochondrial proton conductance from Wistar (closed symbols) and Lou/C mitochondria (open symbols) fed *ad libitum*. Mitochondrial membrane electrical potential was determined simultaneously with oxygen consumption rate ( $J_{O_2}$ ) using the potential-dependent triphenylmethyl phosphonium cation (TPMP<sup>+</sup>) probe. Mitochondria (1 mg protein ml<sup>-1</sup>) were incubated in an assay medium containing 5 μM rotenone, 1 μg ml<sup>-1</sup> oligomycin and 65 ng ml<sup>-1</sup> nigericin (to convert most of the pH component of Δp to membrane potential units (mV), allowing Δp to be measured in millivolt units. The TPMP<sup>+</sup> electrode was calibrated as described in the Materials and methods section. Values are means ± s.e.m. (n = 5).

membrane.<sup>22</sup> Therefore, we next examined the relationship between  $J_{O_2}$  and the proton-motive force in non-phosphorylating conditions (Figure 2). This was achieved by modulating respiratory rate in the presence of succinate by malonate (an inhibitor of succinate dehydrogenase). It appears that over a large range of membrane potential (between 90 and 175 mV),  $J_{O_2}$  was similar in Wistar and Lou/C rats. However, mitochondria from Lou/C rats were able to sustain a higher membrane potential than Wistar rats and this was accompanied by a higher  $J_{O_2}$ . Such an effect could be due to increased expression of uncoupling proteins (for example, UCP2). However, expression of UCP2 mRNA in the liver was significantly reduced in Lou/C as compared to Wistar rats (Figure 4). When Lou/C rats are allowed to increase their fat intake, then UCP2 mRNA increased significantly to a level that remained lower than those detected in Wistar rats. Interestingly, although UCP2 mRNA appears to be different

**Table 3** Activities of complexes I, II and IV of the electron transport chain, citrate synthase activity and cytochrome concentration in liver mitochondria isolated from Lou/C rats and Wistar fed *ad libitum* (WAL)

	WAL	Lou/C
<i>Mitochondrial activity (nmol/min/mg protein)</i>		
Complex I	24.1 ± 3.8	25.2 ± 3.1
Complex II	189.6 ± 20.0	226.6 ± 12.4
Complex IV	786.7 ± 90.4	1041.5 ± 51.7*
Citrate synthase	184.9 ± 15.3	268.8 ± 26.6*
<i>Mitochondrial content (nmol/mg protein)</i>		
Cytochrome aa3	110.7 ± 17.9	174.4 ± 20.9*
Cytochrome c	161.9 ± 10.1	230.0 ± 22.1*
Cytochrome c1	222.0 ± 25.5	171.7 ± 17.5
Cytochrome b	257.0 ± 16.6	267.0 ± 22.4

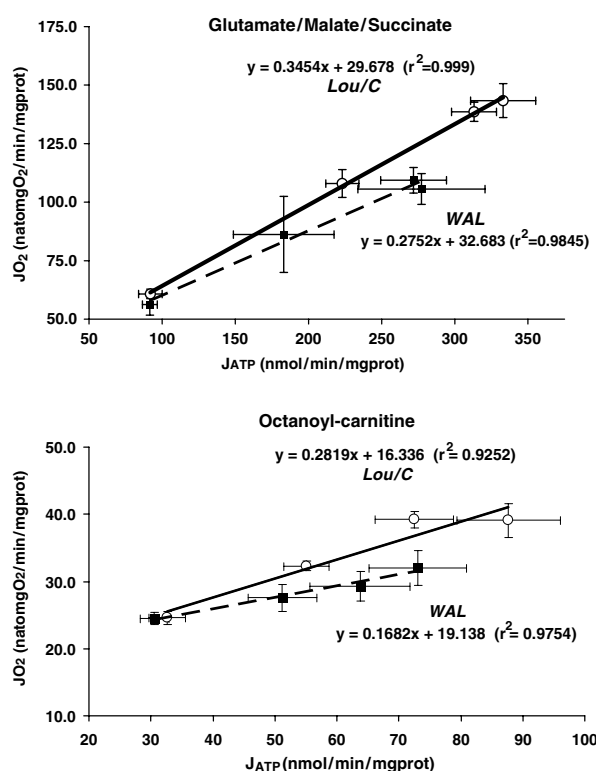
Values are means ± s.e.m. (n = 6–8). \*Significantly different from WAL.

**Table 4** Activities of short-, medium- and long-chain acyl-CoA dehydrogenase in liver from Wistar fed *ad libitum* (WAL) and Lou/C rats

	WAL	Lou/C
<i>Acyl-CoA dehydrogenase activity (μmol/min/100 mg protein)</i>		
Short-chain (butyryl-CoA)	1.12 ± 0.07	1.19 ± 0.05
Medium-chain (octanoyl-CoA)	0.29 ± 0.02	0.41 ± 0.02*
Long-chain (palmitoyl-CoA)	0.47 ± 0.02	0.50 ± 0.02

Values are means ± s.e.m. (n = 6–8). \*Significantly different from WAL.

between rats' strain and affected by the diet. UCP2 protein was barely detectable in the liver of Wistar or Lou/C rats and remained unchanged by increasing fat intake. These results stress the importance of translational mechanisms of regulation of UCP2 gene expression in the liver, in agreement with previous report.<sup>23</sup> On the other hand, increased rate of electron flow through cytochrome c oxidase could also affect the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry.<sup>24</sup> Indeed, we found a significant increase in cytochrome c oxidase activity (complex IV) in isolated mitochondria from Lou/C rats (Table 3). The higher cytochrome c oxidase activity found in Lou/C rats was also consistent with the significant increases in cytochrome aa3 content and citrate synthase activity evidenced in this strain (Table 3). Furthermore, we found a higher activity of medium-chain Acyl-CoA (octanoyl-CoA)



**Figure 3** Relationships between respiratory rate ( $J_{O_2}$ ) and ATP synthesis rate ( $J_{ATP}$ ) in isolated liver mitochondria from Wistar (closed symbols) and Lou/C (open symbols) rats fed *ad libitum*. Mitochondria ( $2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) were suspended in a respiratory medium (125 mM KCl, 1 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2) supplemented with 5 mM Tris-Pi,  $1.25 \mu\text{M}$  rotenone, 20 mM glucose,  $125 \mu\text{M}$  ATP and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Oxygen consumption and ATP synthesis rates were measured in the presence of 5 mM glutamate/2.5 mM malate/5 mM succinate (a) or  $100 \mu\text{M}$  octanoyl-carnitine (b) and titrated by addition of increasing concentrations of hexokinase. Results are means  $\pm$  s.e.m. ( $n = 6-8$ ).

dehydrogenase in Lou/C rats, whereas those for short (butyryl) and long-chain (palmitoyl) Acyl-CoA were not different between Wistar and Lou/C rats (Table 4).

Interestingly, oxidative phosphorylation efficiency, which was assessed by the determination of  $J_{O_2}$  to  $J_{ATP}$  stoichiometry at submaximal ATP synthesis rates, was significantly reduced in Lou/C rats with both G/M/S and octanoyl-carnitine as substrates (Figure 3). While the relationships between  $J_{O_2}$  and  $J_{ATP}$  being linear in both strains,  $J_{O_2}$  was indeed higher for a given rate of ATP synthesis, indicating a decrease in hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in this peculiar strain.

## Discussion

The ROS generation in liver is well documented,<sup>25-30</sup> and many cellular sources of ROS production have been identified, including plasma membrane NADPH oxidase and

xanthine, peroxisomal and endoplasmic reticular oxidases. However, it is now generally accepted that mitochondrial electron transport chain represents the major source of ROS.<sup>25-31</sup> While it was initially thought that complex III was the main or even the only site of ROS generation,<sup>32</sup> recent investigations unequivocally demonstrated that respiratory-chain complex I is the major generator of free radicals in liver mitochondria.<sup>16,31</sup>

One of the most important finding of our study is the demonstration that in the absence of any inhibitor, hepatic mitochondria energized with G/M/S generated  $\text{H}_2\text{O}_2$  to a significant extent (Figure 1). On the other hand, we unexpectedly found that incubating mitochondria with octanoyl-carnitine resulted in a significantly higher rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production than with G/M/S even though oxidation of these substrates were generating NADH and  $\text{FADH}_2$  simultaneously.<sup>33</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation with lipid-derived substrates has been only scarcely examined and it was reported that hepatic mitochondria did not produce significant  $\text{H}_2\text{O}_2$  with palmitoyl-carnitine as unique substrate, and that  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was only slightly increased by addition of rotenone or antimycin A.<sup>15,31,32</sup> These results contrast with the significant rate of mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  production measured with octanoyl-carnitine in the present study. The major differences between these two lipid-derived substrates are linked to the control of long-chain fatty acid  $\beta$ -oxidation by carnitine palmitoyl transferase I, whereas  $\beta$ -oxidation of octanoyl-carnitine is not dependent upon carnitine palmitoyl transferase I activity. However, it is important to underline that hepatic fatty-acid oxidation not only takes place in the mitochondria but also partially in the peroxisomes, even though complete oxidation of fatty acids to carbon dioxide and water occurs only in the former organelle since the key enzymes of the citric acid cycle are lacking in peroxisomes. Interestingly, peroxisomes also contain octanoyl-carnitine and acetyl-carnitine transferases, allowing the products of peroxisomal  $\beta$ -oxidation (for example, one molecule of octanoyl-CoA and four molecules of acetyl-CoA in the case of palmitoyl-carnitine) to be respectively exported as octanoyl-carnitine and acetyl-carnitine into mitochondria for subsequent oxidation.<sup>33</sup> We can therefore suggest that hepatic oxidation of palmitate *in vivo* could generate ROS by a peroxisome-mediated indirect pathway but this cannot be observed *in vitro* on isolated mitochondria energized with palmitoyl-carnitine since the key peroxisomal  $\beta$ -oxidation step was lacking. This finding is of particular interest if we take into account that fatty acid oversupply to non-adipose tissues, including the liver, might result in lipotoxicity, one of the detrimental event suggested to be involved in the development of insulin resistance and type 2 diabetes.<sup>34</sup>

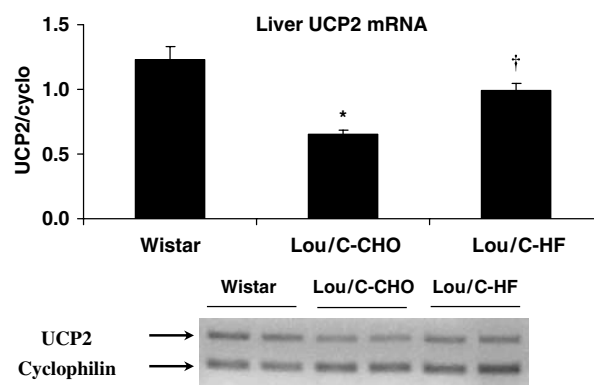
### Higher liver mitochondrial $\text{H}_2\text{O}_2$ production in Lou/C rats

In a pioneer study, Gredilla *et al.*<sup>25</sup> reported that short-term CR (6 week) reduced  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by liver mitochondria,

this effect being confirmed with prolongation of CR up to 12 months.<sup>28</sup> Nevertheless, the widespread notion of a reduced rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by liver mitochondria with CR was recently challenged by some authors.<sup>26,29</sup> Thus, a similar reduction in caloric intake (~40%) for 4–8 weeks was found either to decrease<sup>25</sup> or to enhance<sup>29</sup> mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Such discrepancies were also found when CR was extended to 4–6 months<sup>29,35</sup> or 12–18 months.<sup>26,28</sup> In the present study, we found that isolated liver mitochondria from Lou/C rats, which display an inborn LCI,<sup>1–3,7–9,14,15</sup> produced more H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than Wistar rats fed *ad libitum* or even pair-fed. The enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation displayed by Lou/C mitochondria takes place at many levels of the electron transport chain. First, complex I is largely involved since rotenone drastically reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production whether the mitochondria were energized with succinate or G/M/S (Figure 1). Second, complex III is also involved since H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production remained higher in Lou/C rats after antimycin A addition to mitochondria energized with either G/M/S or octanoyl-carnitine (Table 1). Finally, the increase in octanoyl-CoA dehydrogenase activity evidenced in Lou/C rats (Table 4) would explain the enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production measured with octanoyl-carnitine (Figure 1) since this medium-chain acyl-CoA dehydrogenase has been proposed to function as an oxidase in liver.<sup>36</sup>

It is well established that the rate of mitochondrial free radical production is linked to the transmembrane electric potential difference ( $\Delta\Psi$ ) and/or to the degree of reduction in the respiratory chain electron carriers.<sup>16,30–32,37–39</sup> In this respect, by examining the kinetic response of the proton leak rate to its driving force, the membrane potential, we found that mitochondria from Lou/C rats displayed a higher membrane potential and a higher  $J_{O_2}$  in low phosphorylating conditions (Figure 2). Such effects are reminiscent to those observed with hyperthyroidism.<sup>17</sup> However, we have previously reported that neither triiodothyronine (T3) nor thyroxine (T4) plasma levels were modified in Lou/C rats.<sup>15</sup> The effects of thyroid hormones are, however, dependent on the quantity of the hormone that reaches peripheral tissues and the availability of thyroid receptors in cell nuclei. The reduced hepatic expression of deiodinase 1 (responsible for the T4 to T3 conversion) in Lou/C rats and a similar level of thyroid hormone transporter (monocarboxylate anion transporter 8) in both strains (unpublished data) appear to rule out thyroid hormones as major determinants of the mitochondrial adaptations displayed by Lou/C rats.

The reasons for a higher mitochondrial  $J_{O_2}$  by Lou/C mitochondria at high  $\Delta\Psi$  are not readily apparent but extrinsic (mitochondrial proton leak) or intrinsic (slipping) uncoupling of oxidative phosphorylation can be hypothesized.<sup>40</sup> Extrinsic uncoupling occurs by components that increase the proton permeability of membranes and UCPs might play this role. The liver, however, is the organ in which expression of UCPs is the lowest in basal conditions since minor expression of UCP2 can be detected in the adult liver, and it is mainly due to high expression in Kupffer



**Figure 4** UCP2-mRNA expression relative to cyclophilin, as determined by reverse transcription PCR in Wistar and Lou/C rats fed a high-carbohydrate (HC) diet. Data were quantified by integrating densitometry. UCP2 protein was determined by western blot in liver extracts from Wistar and Lou/C rats fed a HC diet. \*Significantly different from Wistar ( $P < 0.01$ ). †Significantly different from Lou/C ( $P < 0.01$ ).

cells.<sup>41</sup> Nevertheless, in situations of metabolic stress, UCP2 expression is induced in the liver, and enhanced expression appears mainly in hepatocytes.<sup>42</sup> In the present study, we found that UCP2 mRNA expression was reduced in Lou/C as compared to Wistar rats with a standard high-carbohydrate diet and increased significantly when allowed to increase their fat intake (Figure 4). Nevertheless, in the same conditions, UCP2 protein remained unchanged, suggesting that translation of UCP2 mRNA seems deeply controlled *in vivo*.<sup>23</sup> It is thus unlikely that the higher proton conductance observed in Lou/C rats was linked to UCP.

Therefore, the decrease in H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry at high proton motive force measured in Lou/C rats (Figure 2) was probably due to slipping at the level of cytochrome oxidase. Indeed, we found that both activity of cytochrome oxidase and cytochrome *aa3* content were increased in mitochondria from Lou/C rats, whereas cytochrome *b* and *c1* contents were not affected (Table 3). The physiological significance of cytochrome *c* oxidase slipping at high membrane potentials is still a matter of debate, but some authors have suggested a possible role in the antioxidant defense system of the cell.<sup>24,38</sup> Indeed, intrinsic uncoupling of the cytochrome oxidase at high  $\Delta\Psi$  could contribute to prevent excess electronegativity of redox carriers in complexes I and III, which, above a threshold level, can lead to massive production of ROS.<sup>24,37</sup> This hypothesis of intrinsic uncoupling at the level of cytochrome oxidase in Lou/C mitochondria is strongly supported by the decrease in oxidative phosphorylation efficiency observed in this strain (Figure 3).

#### Fat intake does not affect liver mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production

High-fat diet has been shown to adversely affect the health of various animal species, including humans.<sup>43</sup> Indeed, high levels of unsaturated fat were found, among others, to increase oxidative stress and decrease antioxidative enzyme

activity.<sup>44</sup> In contrast, energy restriction was reported to reduce tumor incidence even in animals fed a high-fat diet,<sup>45</sup> suggesting that oxidative stress linked to high-fat intake can be modulated by adjusting caloric intake. In the present study, we found that mitochondrial ROS production was similar in Lou/C-HF and Lou/C rats fed a standard, high-carbohydrate diet (Figure 1).

## Conclusions

In conclusion, the present study provides evidence for a higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by liver mitochondria in Lou/C rats, which is not modified by increasing fat intake. This result contrasts with those reported previously in skeletal muscle.<sup>15</sup> Hepatic mitochondrial adaptations are particularly interesting since dissipating energy stored in the liver has been suggested as a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity.<sup>46</sup> Even though, in the present study, we cannot conclude that the enhanced free radical generation by liver mitochondria of Lou/C rats (Figure 1) was entirely responsible for mitochondrial adaptations, a recent study suggested that oxidative stress provided by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced depolymerization of microtubules and this event is one of the molecular events involved in the increase in mitochondrial mass upon treatment of human cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>47</sup> On the basis of a greater capacity for reoxidizing FADH<sub>2</sub> evidenced with G/M/S and octanoyl-carnitine, we propose that the enhanced liver mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in Lou/C rats was due to increases in reverse electron flow through the respiratory-chain complex I and to higher medium-chain acyl-CoA dehydrogenase activity. However, to attenuate the potential deleterious effects of this increased ROS production, an increase in cytochrome oxidase content and activity reflects an adaptation of Lou/C rats, which ultimately results in a decrease in mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency through intrinsic uncoupling of cytochrome oxidase. These hepatic mitochondrial characteristics may be of particular interest if we take into account that (1) liver fat accumulation is one of the detrimental events involved in the development of insulin resistance and type 2 diabetes<sup>13</sup> and (2) dissipating excess energy in the liver (mitochondrial uncoupling) is a possible therapeutic approach to high-fat diet-induced metabolic disorders.<sup>46</sup> Such liver adaptations could probably explain the higher insulin sensitivity displayed by Lou/C rats (Couturier K, unpublished data) and the ability of this strain to resist fat accretion and insulin resistance with aging<sup>4</sup> or high-fat diet<sup>2,15</sup> in spite of a strong preference for fat.<sup>5,8,15</sup>

## Acknowledgements

This study was supported by a grant from INSERM/INRA (AIP 02 P00275). We thank F Bouillaud (BIOTRAM UPR9078,

CNRS, Paris, France) for the kind gift of UCP2 antibody, Cindy Tellier for taking care of the rats and Blandine Garait for practical assistance.

## References

- Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM *et al*. Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res* 2002; **10**: 188–195.
- Helies JM, Diane A, Langlois A, Larue-Achagiotis C, Fromentin G, Tomé D *et al*. Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes Res* 2005; **13**: 3–10.
- Kappeler L, Zizzari P, Grouselle D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Plasma and hypothalamic peptide-hormone levels regulating somatotroph function and energy balance in fed and fasted states: a comparative study in four strains of rats. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**: 980–988.
- Perrin D, Soulage C, Pequignot JM, Geloën A. Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 2003; **46**: 1489–1496.
- Abdoulaye D, Wetzler S, Goubern M, Helies JM, Fromentin G, Tomé D *et al*. Comparison of energy balance in two inbred strains of rats: Fischer F344 prone to obesity and Lou rats resistant to obesity. *Physiol Behav* 2006; **87**: 245–250.
- Newby FD, DiGirolamo M, Cotsonis GA, Kutner MH. Model of spontaneous obesity in aging male Wistar rats. *Am J Physiol* 1990; **259**: R1117–R1125.
- Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Menial-Denis D *et al*. The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; **57**: B312–B320.
- Veyrat-Durebex C, Alliot J. Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav* 1997; **62**: 1273–1278.
- Kappeler L, Zizzari P, Alliot J, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Delayed age-associated decrease in growth hormone pulsatile secretion and increased orexigenic peptide expression in the Lou C/JaLL rat. *Neuroendocrinology* 2004; **80**: 273–283.
- Merry BJ. Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 2000; **908**: 180–198.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 1996; **273**: 59–63.
- Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 1996; **21**: 651–668.
- Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. *Endocrine* 2006; **29**: 27–32.
- Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Cottet-Emard JM, Guigas B *et al*. Metabolic and hormonal responses to exercise in the anti-obese Lou/C rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; **28**: 972–978.
- Garait B, Couturier K, Servais S, Letexier D, Perrin D, Batandier C *et al*. Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *Free Radic Biol Med* 2005; **39**: 1249–1261.
- Barja G. The quantitative measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2002; **34**: 227–233.
- Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM. Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J Biol Chem* 2001; **276**: 46104–46110.
- Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol* 1979; **49**: 105–121.

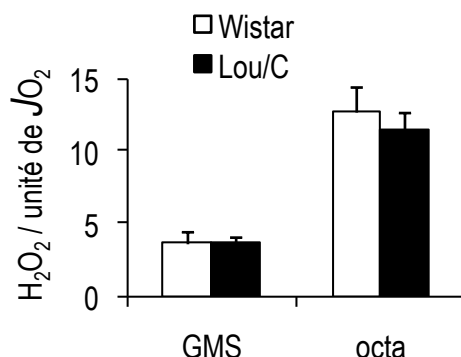


- 19 Williams Jr JN. A method for the simultaneous quantitative estimation of cytochromes A, B, C1, and C in mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1964; **107**: 537–543.
- 20 Verity MA, Turnbull DM. Assay of acyl-CoA dehydrogenase activity in frozen muscle biopsies: application to medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochem Med Metab Biol* 1993; **49**: 351–362.
- 21 Alves-Guerra MC, Rousset S, Pecqueur C, Mallat Z, Blanc J, Tedgui A *et al*. Bone marrow transplantation reveals the *in vivo* expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 in immune and nonimmune cells during inflammation. *J Biol Chem* 2003; **278**: 42307–42312.
- 22 Brand MD, Chien LF, Dirolez P. Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochem J* 1994; **297** (Pt 1): 27–29.
- 23 Hurtaud C, Gelly C, Bouillaud F, Levi-Meyrueis C. Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 1780–1789.
- 24 Capitanio N, Capitanio G, Demarinis DA, De Nitto E, Massari S, Papa S. Factors affecting the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH. *Biochemistry* 1996; **35**: 10800–10806.
- 25 Gredilla R, Barja G, Lopez-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**: 279–287.
- 26 Hagopian K, Harper ME, Ram JJ, Humble SJ, Weindruch R, Ramsey JJ. Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; **288**: E674–E684.
- 27 Lambert AJ, Merry BJ. Lack of effect of caloric restriction on bioenergetics and reactive oxygen species production in intact rat hepatocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; **60**: 175–180.
- 28 Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002; **32**: 882–889.
- 29 Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, Koomson EK, Bevilacqua L, Weindruch R *et al*. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**: E31–E40.
- 30 Young TA, Cunningham CC, Bailey SM. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Arch Biochem Biophys* 2002; **405**: 65–72.
- 31 St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; **277**: 44784–44790.
- 32 Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; **134**: 707–716.
- 33 McGilvery R. *Biochemistry: a Functional Approach*. W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1983, 909pp.
- 34 Wei Yuren WD, Topczewski F, Pagliassotti Michael J. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol* 2006; **291**: E275–E281.
- 35 Lambert AJ, Merry BJ. Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **286**: R71–R79.
- 36 Vanhove G, Van Veldhoven PP, Eysen HJ, Mannaerts GP. Mitochondrial short-chain acyl-CoA dehydrogenase of human liver and kidney can function as an oxidase. *Biochem J* 1993; **292** (Pt 1): 23–30.
- 37 Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; **416**: 15–18.
- 38 Papa S, Guerrieri F, Capitanio N. A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxidant defense system of the cell. *Biosci Rep* 1997; **17**: 23–31.
- 39 Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002; **80**: 780–787.
- 40 Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1604**: 77–94.
- 41 Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, Viguerie-Bascands N, Levi-Meyrueis C, Fleury C *et al*. Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**: 760–764.
- 42 Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, Ezaki O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 9562–9569.
- 43 Wang Z, Pei H, Kaeck M, Lu J. Mammary cancer promotion and MAPK activation associated with consumption of a corn oil-based high-fat diet. *Nutr Cancer* 1999; **34**: 140–146.
- 44 Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA, Hennig B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr* 1996; **15**: 289–294.
- 45 Kritchevsky D. Colorectal cancer: the role of dietary fat and caloric restriction. *Mutat Res* 1993; **290**: 63–70.
- 46 Ishigaki Y, Katagiri H, Yamada T, Ogihara T, Imai J, Uno K *et al*. Dissipating excess energy stored in the liver is a potential treatment strategy for diabetes associated with obesity. *Diabetes* 2005; **54**: 322–332.
- 47 Lee CF, Liu CY, Hsieh RH, Wei YH. Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1042**: 246–254.



#### 4.4. Résultats complémentaires chez le rat Lou/C

La Fig. R14 montre que lorsque la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , par les mitochondries de foie, est rapportée à la consommation d'oxygène, elle n'est plus différente du groupe Wistar.



**Fig. R14. Rapport entre la production mitochondriale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et la consommation d'oxygène ( $\text{JO}_2$ ) par les mitochondries de foie de rats Wistar et Lou/C.** Les mitochondries (1 mg/ml) ont été incubées dans un tampon contenant (en mmol/l) du KCl (125), du Tris-Pi (5), du Tris-HCl (20), de l'EGTA (0,1), 0.1% de BSA (pH 7.2), et supplémenté en HRP (horseradish peroxidase) (6 U/ml) et acide homovalinique (excitation : 312 nm ; émission : 420 nm) (0,1). La réaction a été initiée par l'ajout de glutamate/malate/succinate (GMS, 5/2,5/5) ou d'octanoyl-carnitine (octa, 0,1), en absence (état 4) ou en présence (state 3) d'ADP (1). La respiration mitochondriale a été mesurée par oxygraphie. Pour plus de précisions, cf. Méthodes Article 5. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM de 8–10 expériences indépendantes.

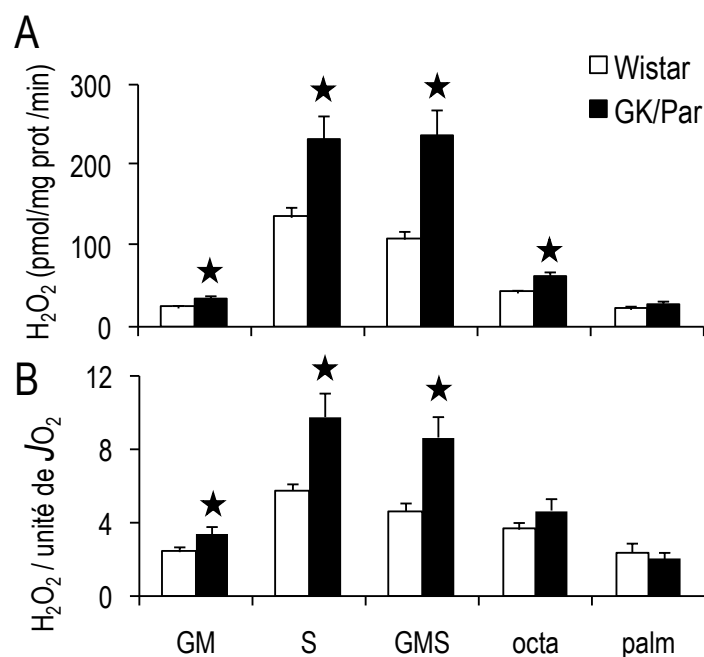
#### 4.5. Résultats complémentaires chez le rat GK/Par

Nous avons réalisé une étude en miroir chez le rat GK/Par, avec les mêmes approches dans le foie et le muscle squelettique.

##### 4.5.1. Foie

##### 4.5.1.1. Production mitochondriale d' $\text{H}_2\text{O}_2$ accrue

La production mitochondriale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est augmentée avec tous les types de substrats (glucidiques et lipidiques) dans le groupe de rats diabétiques GK/Par (Fig. R15A). Ceci est le cas en présence de substrats glucidiques, lorsque les mitochondries sont énergisées avec un substrat entrant au niveau du complexe I : glutamate/malate (GM), du complexe II : succinate (S), ou de ces deux complexes (GMS). C'est aussi le cas avec un acide gras à chaîne moyenne : l'octanoyl-carnitine (octa). De plus, et contrairement aux rats Lou/C, cette production (dans le cas des substrats glucidiques, uniquement) reste accrue lorsqu'elle est rapportée à la consommation d'oxygène (Fig. R15B).



**Fig. R15. Production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en valeur absolue (A), ou rapportée par unité de consommation d'oxygène (JO<sub>2</sub>) (B), par les mitochondries de foie de rats Wistar et GK/Par.** Les mitochondries (1 mg/ml) ont été incubées dans un tampon contenant (en mmol/l) du KCl (125), du Tris-Pi (5), du Tris-HCl (20), de l'EGTA (0,1), 0.1% de BSA (pH 7.2), et supplémenté en HRP (6 U/ml) et Amplex Red (1 μmol/l) (excitation : 560 nm ; émission : 584 nm). La réaction a été initiée par l'ajout de glutamate/malate (GM, 5/2,5) et/ou succinate (S, 5) (GMS) ou octanoyl-carnitine (octa, 0,1) ou palmitoyl-carnitine (palm, 0,05), en absence (état 4) ou en présence (state 3) d'ADP (1). La respiration mitochondriale a été mesurée par oxygraphie. Pour plus de précisions sur l'isolement des mitochondries, cf. Méthodes Article 5. Les valeurs sont des moyennes ± SEM de 8–10 expériences indépendantes. \**p*<0.05 vs. Wistar.

#### 4.5.1.2. Capacités oxydatives accrues

En état phosphorylant (état 3), les niveaux d'oxydation phosphorylante par les mitochondries hépatiques GK/Par sont accrus, comparativement aux Wistar, lorsque les mitochondries GK/Par sont énergisées aux niveaux des complexes I et II par GMS (Table R4). La respiration est également augmentée par un acide gras à longue chaîne : le palmitoyl-carnitine (palm). Dans ce dernier cas, il est possible que l'augmentation de la respiration résulte de l'activation d'un processus de découplage dépendant d'une UCP, car la respiration en état 4 (en présence d'oligomycine : un inhibiteur de l'ATP-synthase) est contrôlée par les fuites de protons au travers de la membrane interne. Ce type de phénomène est également visible en présence de GM. Enfin, dans le groupe GK/Par, le contrôle respiratoire (RCR) est augmenté en présence de GMS, uniquement.

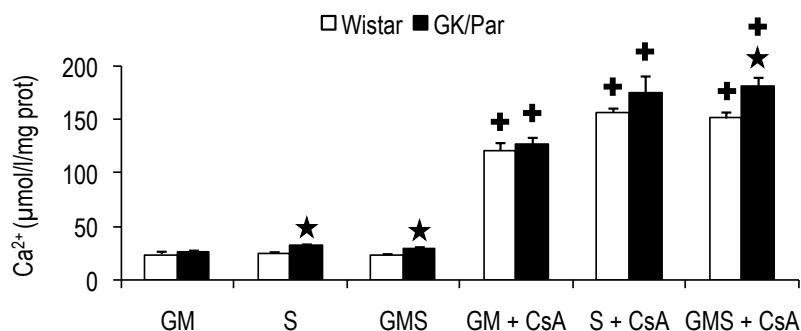
<b>JO<sub>2</sub></b>	<b>état 4</b>	<b>état 3</b>	<b>état 4</b>	<b>état 3</b>
	<b>Wistar</b>		<b>GK/Par</b>	
GM	5,4 ± 0,4	129,4 ± 10,4	7,2 ± 0,5*	143,7 ± 9,7
S	14,7 ± 1,4	189,9 ± 12,3	16,1 ± 1,0	217,1 ± 7,0
GMS	17,4 ± 1,0	171,3 ± 10,3	17,3 ± 1,5	208,1 ± 6,6*
octa	7,8 ± 0,6	61,3 ± 4,1	8,7 ± 0,3	68,8 ± 3,1
palm	6,3 ± 0,4	48,8 ± 4,8	7,8 ± 0,4*	59,8 ± 5,6*
TMPD/Asc	137,6 ± 10,2		161,8 ± 11,2	

<b>RCR</b>	<b>GM</b>	<b>S</b>	<b>GMS</b>	<b>octa</b>	<b>palm</b>
Wistar	25,4 ± 2,0	12,6 ± 0,8	10,0 ± 0,6	8,1 ± 0,6	7,2 ± 0,7
GK/Par	20,8 ± 2,0	14,2 ± 1,2	13,7 ± 1,5*	7,9 ± 0,3	8,0 ± 0,7

**Table R4. Consommation d'oxygène par les mitochondries de foie de rats Wistar et GK/Par.** Dans un oxygraphe, les mitochondries (1 mg/ml) ont été incubées dans un tampon contenant (en mmol/l) du KCl (125), du Tris-Pi (5), du Tris-HCl (20), de l'EGTA (0,1), 0.1% de BSA (pH 7.2), et supplémenté en glutamate/malate (GM, 5/2,5) et/ou succinate (S, 5) (GMS) ou octanoyl-carnitine (octa, 0,1) ou palmitoyl-carnitine (palm, 0,05). Les valeurs de consommation d'oxygène (en nano atome O/min/mg protéines mitochondriales), mesurées par oxygraphie, ont été effectuées en absence (état 4) ou en présence (state 3) d'ADP (1). L'activité de la cytochrome oxydase a été évaluée avec le couple redox de substrat de la cytochrome oxydase TMPD/Asc (1/5). Le rendement de la chaîne respiratoire (RCR) représente le ratio état 3/état 4. Les valeurs sont des moyennes ± SEM de 10–12 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  vs. Wistar. Asc, ascorbate ; TMPD, N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine.

#### 4.5.1.3. Capacité de rétention calcique mitochondriale

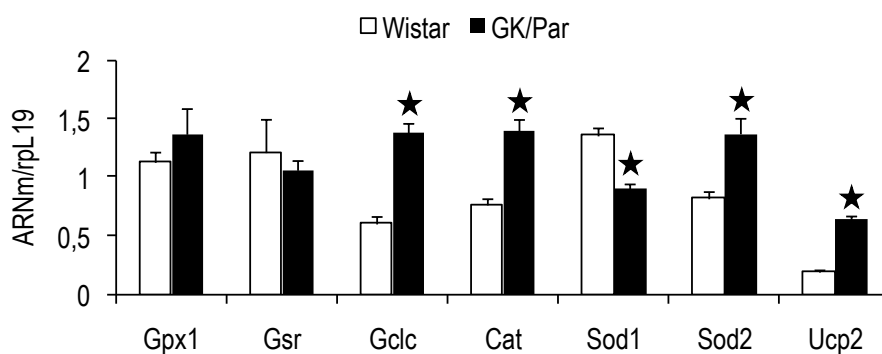
La capacité de rétention calcique, qui est inversement proportionnelle à la sensibilité de l'ouverture du PTP (phénomène de MMP), est augmentée dans les mitochondries hépatiques GK/Par en présence de S et GMS (Fig. R16). Cette résistance est spécifique du PTP car elle est reproductible en présence de cyclosporine A, un inhibiteur spécifique du PTP.



**Fig. R16. Capacité de rétention calcique des mitochondries de foie de rats Wistar et GK/Par.** La sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), a été évaluée en déterminant la capacité de rétention calcique des mitochondries incubées en présence du même milieu d'incubation que dans les expériences d'oxygraphie, excepté qu'il ait été supplémenté en Calcium Green-5N (1 μmol/l). Les substrats utilisés sont les mêmes que dans les expériences d'oxygraphie, et des pulses de Ca<sup>2+</sup> (10 μmol/l) ont été ajoutés toutes les 10 minutes, jusqu'à ouverture du PTP. La spécificité de l'ouverture du PTP a été vérifiée par l'ajout de cyclosporine A (CsA, 1 μmol/l). Pour plus de précisions sur la méthode de rétention calcique, cf. Garait et al., 2005. Les valeurs sont des moyennes ± SEM de 8–10 expériences indépendantes. \*p < 0.05 vs. Wistar ; +p < 0.05 vs. sans CsA.

#### 4.5.1.4. Défenses antioxydantes

Enfin, certains des principaux gènes antioxydants sont augmentés (Gclc, Cat, Sod2), inchangés (Gpx1, Gsr), ou diminués (Sod1) dans le foie de rats GK/Par (Fig. R17). Le gène Ucp2 est également accru.

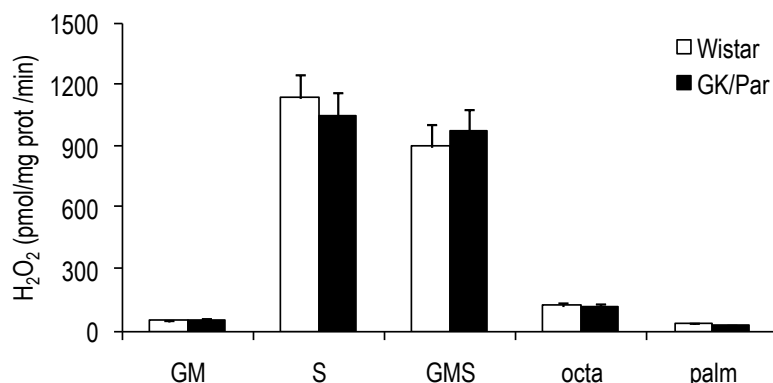


**Fig. R17. Expression des gènes antioxydants et de découplage dans le foie de rats Wistar et GK/Par.** L'ARN total de foie entier a été extrait. L'expression des gènes a été déterminée par PCR quantitative en temps réel (pour plus de détails, cf. Méthodes Article 1). Les résultats sont normalisés par rapport au gène de ménage rpL19. Les données représentent les moyennes ± SEM de 6 expériences indépendantes. \*p < 0.05 vs. Wistar.

4.5.2. Muscle squelettique

4.5.2.1. Production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Contrairement à la situation du foie, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est normale dans les mitochondries de muscle squelettique de rats diabétiques GK/Par (Fig. R18).



**Fig. R18. Production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les mitochondries de muscles squelettiques de rats Wistar et GK/Par.** Les mitochondries (0,2 mg/ml) ont été incubées dans un tampon contenant (en mmol/l) du KCl (125), du Tris-Pi (10), du Tris-HCl (20), de l'EGTA (0,1), 0.1% de BSA (pH 7.2), et supplémenté en HRP (horseradish peroxidase) (6 U/ml) et Amplex Red (1 µmol/l) (excitation : 560 nm ; émission : 584 nm). La réaction a été initiée par l'ajout de glutamate/malate/succinate (GMS, 5/2,5/5) ou d'octanoyl-carnitine (octa, 0,1) ou palmitoyl-carnitine (palm, 0,05), en absence (état 4) ou en présence (state 3) d'ADP (0,1). Pour plus de précisions sur l'isolement des mitochondries de muscle squelettique, cf. Garaït et al., 2005. Les valeurs sont des moyennes ± SEM de 12 expériences indépendantes.

4.5.2.2. Oxydation phosphorylante

Il en va de même avec la respiration qui est identique entre les deux groupes d'animaux (Table R5).

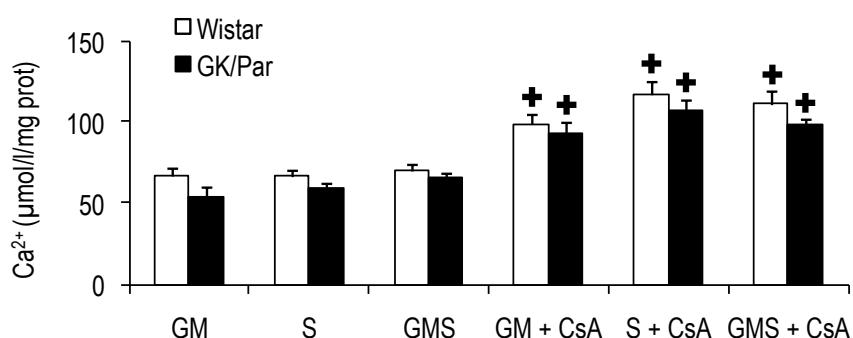
JO <sub>2</sub>	état 4		état 3	
	Wistar		GK/Par	
GM	15,5 ± 1,5	423,5	14,5 ± 1,8	406 ± 22
S	59,3 ± 5,9	319,5 ± 12,6	65,7 ± 3,7	327,2 ± 15,5
GMS	52,0 ± 5,4	544,5 ± 25,2	54,5 ± 6,1	502,8 ± 31,0
octa	18,0 ± 1,8	162,9 ± 7,7	17,9 ± 1,7	157,2 ± 11,2
palm	20,2 ± 2,2	116,1 ± 9,6	22,5 ± 1,6	132,4 ± 6,3
TMPD/Asc	753,0 ± 51,5		741,6 ± 35,3	

**Table R5. Consommation d'oxygène par les mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et GK/Par.** Dans un oxygraphe, les mitochondries (0,2 mg/ml) ont été incubées dans un tampon contenant (en mmol/l) du KCl (125), du Tris-Pi (10), du Tris-HCl (20), de l'EGTA (0,1), 0.1% de BSA (pH 7.2), et suppléé en glutamate/malate (GM, 5/2,5) et/ou

succinate (S, 5) (GMS) ou octanoyl-carnitine (octa, 0,1) ou palmitoyl-carnitine (palm, 0,05). Les mesures de consommation d'oxygène (en nano atome O/min/mg protéines mitochondriales) ont été effectuées en absence (état 4) ou en présence (state 3) d'ADP (0,1). L'activité de la cytochrome oxydase a été évaluée avec le couple redox de substrat de la cytochrome oxydase TMPD/Asc (1/5). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM de 10–12 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  vs. Wistar. TMPD, N,N,N',N'-tétraméthyl-p-phénylenediamine, Asc, ascorbate.

#### 4.5.2.3. Capacités de rétention calcique mitochondriale

Enfin, la sensibilité à l'ouverture du PTP est normale dans les muscles squelettiques GK/Par ; elle suit donc la même tendance que les autres paramètres mitochondriaux (production d' $H_2O_2$  et respiration) (Fig. R19).



**Fig. R19. Capacité de rétention calcique des mitochondries de muscle squelettique de rats Wistar et GK/Par.** Les méthodes concernant la sensibilité à l'ouverture du pore de transition de perméabilité sont les mêmes que dans le foie (cf. Fig. R16). La spécificité de l'ouverture du PTP a été vérifiée par l'ajout de cyclosporine A (CsA, 1  $\mu$ mol/l). Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM de 12 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  vs. sans CsA.

#### 4.6. Conclusions et points de discussion

De manière inattendue, et contrairement à la situation du muscle squelettique, les mitochondries hépatiques de rats Lou/C produisent plus d' $H_2O_2$ . Parallèlement, des adaptations siégeant au niveau de la cytochrome oxydase (activité et proportion en cytochrome  $aa_3$ ) ont lieu et présentent le double avantage de diminuer l'efficacité de la phosphorylation oxydative sans altérer le  $\Delta\Psi_m$  (inversement aux UCP). Ceci permet aux mitochondries Lou/C de diminuer la pression partielle en oxygène visant à compenser la production d'ERO, tout en assurant une production d'ATP suffisante, compte tenu de leurs besoins énergétiques élevés (hyperactivité, métabolisme basal accru (Perrin et al., 2003 ; Garait et al., 2005 ; Soulage et al., 2008)).

Les caractéristiques mitochondriales chez le rat GK/Par sont différentes, aussi bien dans le foie que dans le muscle squelettique. Dans les mitochondries de foie GK/Par, la production d' $H_2O_2$  est accrue comparativement au Wistar. Cette hyperproduction n'est pas normalisée lorsqu'elle est rapportée à la consommation d'oxygène contrairement au Lou/C, et n'est pas non plus associée à une augmentation de la cytochrome oxydase. Des éléments nous permettent plutôt de penser que l'augmentation du flux respiratoire résulterait d'une amplification de la conductance aux protons (UCP2). Dans le muscle squelettique, aucune différence n'a été observée quels que soient les paramètres mitochondriaux étudiés.

## DISCUSSION

### 1. La réponse adaptative à l'environnement diabétique

#### 1.1. La cellule $\beta$ diabétique, victime passive du stress oxydant ?

En regard de leurs faibles capacités de défenses antioxydantes endogènes (*Tiedge et al., 1997*) et des hauts niveaux de glucose auxquels elles sont exposées, les cellules  $\beta$  sont considérées comme des victimes évidentes du scénario dans lequel les ERO, accrus par l'hyperglycémie, endommagent la cellule (*Robertson et al., 2004b ; Brownlee, 2005*). Partant de cette hypothèse, diverses stratégies ont été entreprises afin de déterminer si la surexpression de gènes antioxydants pouvait exercer des effets cytoprotecteurs contre le stress oxydant. Dans des lignées de cellules insulino-sécrétrices (RINm5F, INS-1), la surexpression des SOD, de la GPx et/ou de la catalase confère une protection contre divers oxydants comme le NO ou les cytokines (IL-1 $\beta$  et/ou TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) (*Hohmeier et al., 1998 ; Kralik et al., 1998 ; Tiedge et al., 1998 ; Tiedge et al., 1999 ; Lortz et al., 2000 ; Moriscot et al., 2000 ; Tanaka et al., 2002 ; Azevedo-Martins et al., 2003*). Les effets protecteurs de la SOD-1 ou de la catalase ont également été observés dans les îlots humains ou de rats (*Benhamou et al., 1998 ; Moriscot et al., 1998 ; Moriscot et al., 2000*). De ce grand nombre d'études, a jailli l'intérêt d'une approche combinatoire et synergique de défenses antioxydantes — dirigées à la fois contre les superoxydes et les peroxydes — car, mieux que la surexpression d'un seul gène, est celle de leur combinaison — double ou triple —, tant dans des lignées, que les îlots (*Tiedge et al., 1997 ; Tiedge et al., 1998 ; Lortz et Tiedge, 2003 ; Mysore et al., 2005*).

L'augmentation des défenses antioxydantes de la cellule  $\beta$  constitue donc la stratégie de protection la plus efficace. Nos résultats chez le rat GK/Par conforte cette idée, puisque l'invulnérabilité relative de leurs cellules  $\beta$  face aux attaques radicalaires (notamment promues par alloxane et STZ) — observées dans nos deux études sur la fonction et la survie — est associée à une augmentation de l'expression des gènes de défenses antioxydantes, s'adressant de façon complémentaire et synergique aux différentes catégories d'ERO. Dans notre étude, nous estimons que les modulations d'expressions observées, reflètent les activités des protéines correspondantes, comme cela a été précédemment montré pour les SOD-1 et -2, la catalase et la GPx (*Tiedge et al., 1997 ; Azevedo-Martins et al., 2003 ; Friesen et al., 2004*). Une augmentation des activités de ces enzymes dans l'îlot GK/Par est confortée par un état redox plus réduit du glutathion. En effet, le meilleur indicateur du potentiel antioxydant de l'îlot GK/Par est l'état réduit du glutathion (GSH) ; plus celui-ci est élevé, plus il indique que les ERO sont dégradées efficacement, notamment par la GPx-1. Ce mécanisme est le plus à même d'expliquer l'absence d'effet d'un inhibiteur de la biosynthèse de GSH chez le GK/Par et les faibles accumulations d'ERO malgré l'hyperglycémie (Article 1).

En amont de l'expression de ces gènes de défenses, existent divers facteurs transcriptionnels capables de les activer. Le principal, NRF-2 (*Alam et al., 1999 ; Kwak et al., 2003*), est surexprimé dans l'îlot GK/Par. Il régule notamment Gclc, Txd et Hmox1 et certains gènes codant pour les enzymes qui réoxydent le NAD(P) en NAD(P)H. Le NAD(P)H sert de substrat essentiel au bon fonctionnement des défenses antioxydantes (cofacteur du GSH, notamment). De plus, de récents éléments suggèrent fortement que le NAD(P)H pourrait servir de protecteur métabolique *ad hoc* (*Martens et al., 2005*), permettant de compenser

l'état faiblement pourvu en systèmes antioxydants de la cellule  $\beta$ . Comme les trois principaux gènes régulant la régénération du NAD(P)H sont surexprimés dans l'îlot GK/Par, il est possible que ce substrat participe, parallèlement aux systèmes de défenses décrits ci-dessus, à la protection antioxydante chez ces animaux. Ceci reste néanmoins à vérifier par une mesure directe du redox NAD(P)/NAD(P)H.

### 1.2. La cellule $\beta$ diabétique, source de stress oxydant ?

La grande majorité des éléments de preuve faisant état d'un stress oxydant dans la cellule  $\beta$  diabétique sont essentiellement indirects ; ils concernent, le plus généralement, les marqueurs de dommages oxydatifs sur les biomolécules et les effets cytoprotecteurs des antioxydants (NAC, mimétiques de SOD) (*Tanaka et al., 1999 ; Jonas et al., 2003*). En réalité, les mécanismes de l'augmentation de la production d'ERO dans la cellule  $\beta$ , en réponse à l'hyperglycémie demeurent flous, voire contradictoires. Quelques mesures directes sur la production d'ERO en temps réel dans des cellules  $\beta$  primaires de rongeurs ou d'humains sont néanmoins disponibles. À ce jour, quatre études ont rapporté un effet stimulateur du glucose sur la production d'ERO dans des îlots isolés. La première, dans laquelle Tanaka et al. ont quantifié cette production par cytométrie en flux, révèle que l'exposition à de fortes concentrations de glucose (30 vs. 5.5 mmol/l) pendant 72h augmente la production d'ERO dans des îlots humains cultivés (*Tanaka et al., 1999*). Bindokas et al. ont observé, en microscopie à fluorescence, une augmentation de la production de superoxyde suite à une stimulation par le glucose (de 2 à 10 mmol/l), dans des cellules d'îlots préalablement cultivées 72h à 10 mmol/l de glucose (*Bindokas et al., 2003*). Krauss et al. ont utilisé une méthodologie identique pour montrer une augmentation de la production de superoxyde dans des cellules insulaires dispersées, en réponse à une stimulation de glucose (25 vs. 5.5 mmol/l) pendant 72h (*Krauss et al., 2003*). Cette production de superoxyde a été associée à une hyperpolarisation mitochondriale. Pi et al. ont également constaté une augmentation de la production d'ERO, par le glucose (16.7 vs. 5.5 mmol/l), dans les îlots de souris et les INS-1 cultivés 24h à 5.5 mmol/l de glucose (*Pi et al., 2007*). À l'inverse de ces quatre équipes, Martens et al. ont observé un effet suppresseur du glucose sur la production d'ERO, à l'aide des mêmes sondes fluorescentes, dans des cellules  $\beta$  triées intactes, provenant d'îlots fraîchement isolés (*Martens et al., 2005*). Ces auteurs rapportent que les effets suppresseurs du glucose dans les cellules  $\beta$  sont associés à l'accumulation de NAD(P)H et de FADH<sub>2</sub>/FMNH<sub>2</sub>, marqueurs directs de la dégradation du glucose. Le rôle antioxydant du métabolisme du glucose est aussi confirmé par le fait que les cellules  $\beta$  les plus répondeuses au glucose — et produisant davantage de NAD(P)H — produisent moins de superoxyde que les cellules les moins répondeuses (cellules  $\beta$  ou non  $\beta$ ). Les effets inhibiteurs du glucose sur la production de ces espèces sont particulièrement prééminents entre 0 et 5 mmol/l de glucose, mais deviennent stimulants à très fortes concentrations (entre 25 et 30 mmol/l). Enfin, les effets positifs du glucose ont aussi été vérifiés lorsque les îlots sont cultivés à 20 mmol/l comparativement à 6 mmol/l. Un effet suppresseur du glucose dans les îlots de rats non diabétiques Wistar a également été constaté dans notre étude, par contraste avec les îlots gluco-incompétents GK/Par (Article 1).

Dans les îlots normaux, la question demeure, néanmoins, de savoir si le glucose freine directement la production d'ERO, ou si c'est le NADPH, induit par le glucose (*Ivarsson et al.,*



2005), qui intervient comme cofacteur antioxydant. Dans les îlots diabétiques, étant donné que d'anciennes données du laboratoire (*Giroix et al., 1993a ; Giroix et al., 1993b ; Hughes et al., 1998 ; Ling et al., 1998*) et de plus récentes (*Fradet*, données non publiées) montrent que le flux oxydatif, à partir du glucose, est semblable au Wistar dans les mêmes conditions d'expérimentation. La faible accumulation d'ERO dans l'îlot GK/Par résulte donc moins probablement de changements significatifs dans le métabolisme du glucose que de l'augmentation des défenses antioxydantes (Fig. D1).

### 1.3. Découplage mitochondrial de la cellule $\beta$ diabétique

Un mécanisme de découplage *via* UCP2 a récemment été suggéré dans la cellule  $\beta$  ; il pourrait aussi expliquer le paradoxe d'une faible production d'ERO chez le rat GK/Par (Fig. D1). La surexpression du gène codant pour cette protéine lui permettrait ainsi de limiter la production d'ERO et leur toxicité (*Li et al., 2001 ; Echtay et al., 2002*). La question de la pertinence physiologique d'UCP2 est néanmoins posée dans ces études (pour revue : *Nicholls, 2006*). Une séquence d'événements plus complexes a été proposée pour expliquer comment la production de superoxyde est à même d'induire UCP. En présence d'ERO, cette séquence impliquerait une libération de  $\text{Fe}^{2+}$  (à partir de l'aconitase) responsable de la production d'anion hydroxyle (*via* la réaction de Fenton), et de HNE (peroxydation lipidique), produit final activateur d'UCP (*Echtay et al., 2003 ; Murphy et al., 2003*). Cette hypothèse s'accorde d'ailleurs avec les effets négatifs de HNE sur l'ISSG par les îlots pancréatiques de rats Wistar (*Miwa et al., 2000*). Comme l'environnement proche des cellules  $\beta$  GK/Par est marqué par le HNE, il est possible que ce dérivé lipidique soit présent en quantité faible — mais suffisante — pour activer la protéine découplante. Néanmoins, cette thèse de l'activation d'UCP2 par le HNE suppose, de fait, que l'activation d'UCP2 surviendrait assez tardivement, lorsque les ERO ont suffisamment (en durée et/ou intensité) endommagé les biomolécules (ainsi marquées par le HNE).

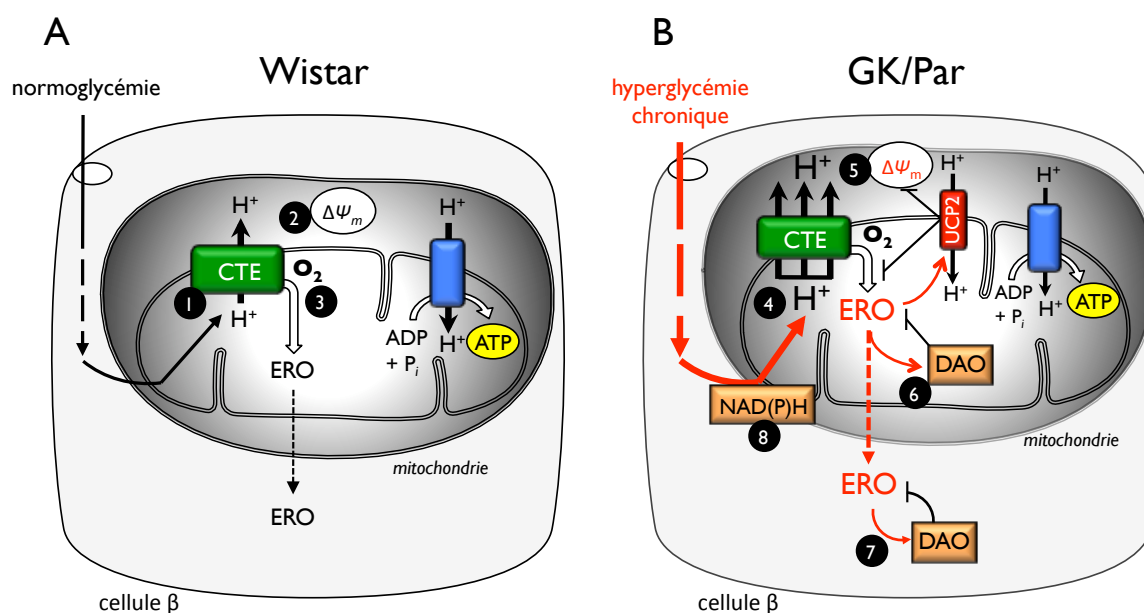
### 1.4. Adaptations antioxydantes dans la défense contre l'apoptose dans l'îlot et le foie diabétique

Considérons, à présent, le rôle de ces adaptations dans les aspects liés à la survie de la cellule  $\beta$  pancréatique (Article 2). Les altérations de la masse  $\beta$ -cellulaire chez le rat GK/Par ne sont pas liées à l'augmentation de l'apoptose *in vivo* (*Movassat et al., 1997 ; Martens et al., 2005*), ce qui, de prime abord, semble paradoxal compte tenu de l'exposition chronique des cellules  $\beta$  à des niveaux élevés de glucose et lipides (Article 3 ; *Portha, 2005 ; Argoud et al., 2006 ; Portha et al., 2008*). Ce phénomène est d'autant plus surprenant que l'îlot GK/Par (i) est entouré de structures exprimant des marqueurs de stress oxydant (Article 1) ; (ii) présente une péri-inflammation (*Homo-Delarche et al., 2006 ; Ehses et al., 2007a*) ; et (iii) libère de façon accrue diverses cytokines/chimiokines (Article 4). Dans la deuxième étude de ce travail de thèse (Article 2), nous avons confirmé, dans les îlots fraîchement isolés, l'absence d'anomalie au plan de l'apoptose des cellules  $\beta$ , comme ce qui avait précédemment été rapporté *in situ* dans le tissu pancréatique (*Movassat et al., 1997 ; Movassat et Portha, 1999*). Compte tenu (i) des conclusions menées à l'issue de l'Article 1 sur la protection des îlots par les défenses antioxydantes ; (ii) du caractère pro-apoptotique du stress oxydant (*Tiedge et al., 1997 ; Robertson et al., 2004b ; Robertson et Harmon, 2006*) ; (iii) des évidences montrant que la surexpression des gènes *Gpx1* et *Hmox1* et

d'autres gènes antioxydants améliore la survie des cellules  $\beta$  en condition de stress (Tiedge et al., 1997 ; Pileggi et al., 2001 ; Tanaka et al., 2002 ; Lortz et al., 2003), nous avons vérifié que les îlots GK/Par sont également capables de résister à l'apoptose induite en réponse à un stress oxydant calibré exogène.

Alors que l'apoptose n'est pas augmentée après 24h de culture en réponse à l' $H_2O_2$ , nous avons, dans le même temps, constaté un maintien de la surexpression des gènes de défenses antioxydantes, et une augmentation de l'ARNm de Gclc, comparativement aux îlots frais (Article 2, Fig. 2 et 3). D'autres gènes anti-apoptotiques tels que Bcl2 et A20 peuvent aussi intervenir dans ce processus de défense (Ferran et al., 1998 ; Grey et al., 1999). Étant donné que les divers gènes de stress restent exprimés à des faibles niveaux dans les îlots non diabétiques, cette surexpression, uniquement dans le groupe GK/Par, traduit sûrement son statut défensif intrinsèque, lequel serait donc maintenu *ex vivo*. Il est connu que le phénotype diabétique des îlots est maintenu en culture (Marchetti et al., 2004). De plus, comme les îlots Wistar et GK/Par ont été isolés par le même procédé, et parce que certains gènes restent normalement exprimés, nous en déduisons que l'augmentation spécifique des ARNm de différents gènes dans les îlots diabétiques est globalement conservée, et qu'elle n'est pas causée par une augmentation généralisée qui pourrait résulter du stress lié à l'isolement.

Un parallèle peut être fait entre la cellule  $\beta$  et la cellule hépatique chez le rat GK/Par, car nous avons montré une capacité accrue de la rétention calcique par les mitochondries de foie de ces animaux (Article 5, résultats complémentaires). Cette caractéristique est en faveur d'une moindre susceptibilité à l'ouverture du PTP, et donc à l'apoptose par la voie mitochondriale. Ces résultats ont déjà été observés par une équipe portugaise travaillant sur le rat GK/Par (Ferreira et al., 2003b). Dans le même temps, nous avons constaté une augmentation de la production d'ERO et une surexpression des principaux gènes antioxydants codant notamment pour la SOD mitochondriale et la catalase. Nous n'avons, en revanche, pas d'indicateur de l'état de stress oxydant net (redox du glutathion) dans la cellule hépatique GK/Par. Ces adaptations hépatiques sont associées à un environnement de stress métabolique qui se manifeste par un processus inflammatoire (Article 4) accompagné d'une perte de sensibilité à l'insuline (Bisbis et al., 1993). De manière intéressante, le traitement par l'IL-1Ra, associé à des effets anti-inflammatoires sur l'expression de gènes pro-inflammatoires, au niveau insulaire et hépatique, améliore le contrôle glycémique et la sensibilité hépatique à l'insuline. Ces effets peuvent mettre en jeu une moindre production d'ERO, car ces espèces constituent des éléments mécanistiques fondamentaux dans la signalisation des effets pro-inflammatoire associés à l'insulino-résistance (Schenk et al., 2008).



**Fig. D1. Modèle hypothétique d'adaptation chronique contre les ERO dans la cellule  $\beta$  GK/Par.** (A) L'oxydation du glucose intracellulaire commence avec la glycolyse dans le cytoplasme, et se poursuit dans la mitochondrie où les équivalents réduits (NAD(P)H et  $FADH_2$ ), issus du métabolisme du glucose, entrent dans la chaîne de transport des électrons (CTE) (1), pour, in fine, phosphoryler l'ADP et le phosphate inorganique ( $P_i$ ) en ATP. En normoglycémie, la faible demande en insuline (et en ATP) se traduit par une faible accumulation de proton ( $H^+$ ) au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial, et un potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) modéré (2). Par conséquent, la production d'ERO est faible (3). (B) En contraste, en condition d'hyperglycémie chronique (GK/Par), le flux glycolytique est élevé ; il se traduit par l'accumulation d'équivalents réduits et s'associe à une accélération de la CTE (4). Il en résulte une hyperpolarisation mitochondriale (5), et un ralentissement du flux d'électrons, conduisant à l'accumulation de ces électrons, ce qui augmente la probabilité qu'ils interagissent avec la molécule d'oxygène pour former des ERO. L'exposition à des niveaux élevés et/ou chroniques d'ERO pourrait augmenter (i) l'expression d'une protéine découplante (UCP2) qui dissipe  $\Delta\Psi_m$  ; et (ii) les défenses antioxydantes (DAO) mitochondriales (6) et cytosoliques (7), afin de garantir une protection optimale contre les dommages oxydatifs. De plus, un métabolisme élevé du glucose est susceptible d'augmenter, via une production accrue de NAD(P)H (8), le potentiel antioxydant cellulaire. En conséquence, une élévation du découplage mitochondrial et/ou des DAO pourrait amoindrir la fonction sécrétoire de la cellule  $\beta$  GK/Par, lorsqu'elle est exposée à de fortes concentrations de glucose. ERO, espèces réactives de l'oxygène.

### 1.5. Contraste entre résistance au stress oxydant *in vitro* et fragilité $\beta$ -cellulaire *ex vivo* chez le rat diabétique

En dépit de leur protection relative contre l' $H_2O_2$ , les îlots GK/Par présentent une fragilité intrinsèque lorsqu'ils sont placés en culture. Ceci montre (i) que les îlots diabétiques sont plus vulnérables au processus d'isolement et à l'adaptation aux conditions de culture, comparativement aux îlots non diabétiques ; et (ii) que le stress de la culture, dans nos conditions expérimentales, ne peut pas être réduit à un simple stress oxydant. Ce phénomène de fragilité aux conditions de culture a précédemment été rapporté dans les îlots isolés de sujets diabétiques de type 2 (Marchetti *et al.*, 2004). L'équipe de Marchetti a

également observé divers stigmates de stress oxydant dans les îlots diabétiques cultivés (24–72h, 5.5 mmol/l de glucose), avec des modulations d'expression des gènes antioxydants (Gpx et Cat : mRNA augmentés ; Sod : mRNA diminué), ou pro-oxydants (Nox et Pkc $\beta$ 2 : mRNA augmentés), comparativement aux îlots témoins (*Marchetti et al., 2004 ; Lupi et al., 2007*).

Ainsi, les îlots GK/Par devraient rester plus sensibles aux autres types de stress comme la destruction de la matrice extracellulaire (*Wang et al., 1999*), l'hypoxie (*Dionne et al., 1993*) et l'exposition à la collagénase (endotoxines) (*Vargas et al., 1998*). Des gènes comme Hif1 $\alpha$ , Faslg et iNos témoignent de ces types de stress dans l'îlot GK/Par (Article 2). Un stress différent de celui provoqué par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exogène, et lié à l'axe IL-1 $\beta$ –Fas–NF- $\kappa$ B, est envisageable puisque nous avons montré que l'IL-1Ra protège *in vitro* et *in vivo* de l'apoptose des cellules  $\beta$  GK/Par dans les îlots cultivés pendant 24h (Article 4, résultats complémentaires). L'origine de cette vulnérabilité des îlots GK/Par pourrait impliquer des altérations endothéliales (hypoxie/athérosclérose) (*Atef et al., 1994*).

#### 1.6. Le stress oxydant, cause ou conséquence des anomalies mitochondriales dans l'insulino-résistance ?

Savoir si la dysfonction mitochondriale est une cause ou une conséquence de l'insulino-résistance est difficile à déterminer, bien que de récents éléments sont en faveur de la deuxième issue (*Bonnard et al., 2008*). Dans le muscle squelettique de la souris rendue diabétique par la STZ, la production d'ERO est associée à des altérations mitochondriales (biogenèse, fonction, structure), or ces deux phénomènes sont réversibles lorsque la glycémie est normalisée, ou après un traitement antioxydant. De plus, *in vitro*, la production d'ERO induite par le glucose ou les lipides à fortes concentrations se traduit également par des altérations mitochondriales, et celles-ci sont bloquées par un traitement antioxydant. La dysfonction mitochondriale n'étant pas apparente avant l'installation de l'insulino-résistance, elle serait plutôt déterminée par une surproduction d'ERO due à l'hyperglycémie (aggravée par l'hyperlipidémie). Le stress oxydant s'érigerait ainsi en pièce maîtresse d'un mécanisme unifiant les altérations mitochondriales, l'accumulation de lipides et l'insulino-résistance ; il pourrait favoriser en cela l'apparition du DT2 par épuisement des cellules  $\beta$  fonctionnelles résiduelles.

Chez le rat GK/Par, en contraste avec les modèles d'insulino-résistance et de DT2 associés à l'obésité (*Wellen et Hotamisligil, 2005*), les autres tissus cibles de l'insuline que sont le tissu adipeux et le muscle squelettique, ne montrent pas une réelle augmentation des marqueurs inflammatoires comparativement au rat Wistar. Ceci est sans doute lié à la nature non obèse du modèle GK/Par et/ou au délai d'installation de l'insulino-résistance périphérique (*Portha, 2005*). Étonnamment, nous n'avons pas non plus observé d'anomalies au plan de la production d'ERO mitochondriales dans le muscle squelettique. Ce phénomène corrobore la notion que le stress oxydant au niveau du muscle périphérique est une conséquence de l'hyperglycémie, et il est probable que des anomalies liées au stress oxydant et à l'inflammation dans ce tissu se révèlent chez l'animal plus âgé.

## 2. Origine(s) des adaptations défensives à l'environnement diabétique chez le GK/Par

Il est connu que les ERO constituent des médiateurs du préconditionnement au stress oxydant (Seo et al., 2004 ; Temple et al., 2005). Dans cette thèse, nous développons la notion d'une auto-adaptation  $\beta$ -cellulaire au stress oxydant basée sur l'augmentation des défenses antioxydantes chez le rat GK/Par. Dans ce contexte, nous apportons les premiers éléments de réponse aux questions suivantes : quelle(s) est (sont) l'(les)origine(s) de cette production d'ERO ? et quelle(s) en est (sont) la (les) source(s) ?

### 2.1. Glucotoxicité et production d'ERO

De nombreux arguments bibliographiques nous permettent de penser que les adaptations observées dans les îlots GK/Par sont causées par l'hyperglycémie chronique. En effet, il a été rapporté que, outre les effets glucotoxiques, l'exposition à de fortes concentrations *in vitro* et *in vivo* de glucose entraîne l'activation de certains gènes de stress impliqués dans les processus de défenses. Par exemple, l'exposition transitoire à de fortes concentrations de glucose augmente l'activité des enzymes antioxydantes, notamment la SOD-2 (Oliveira et al., 1999). Lorsque cette exposition est prolongée sur 18h, d'autres gènes, comme celui codant pour HO-1, sont aussi activés (Jonas et al., 2003). Dans un modèle de rat rendu hyperglycémique par pancréatectomie avec une hyperglycémie analogue (10 mmol/l), il existe une grande similarité avec le rat GK/Par dans l'induction des gènes de défenses (Sod, Gpx, Hmox1, A20). Le rôle spécifique de l'hyperglycémie dans le modèle pancréatectomisé est validé par la normalisation des niveaux d'expression de ces gènes après normalisation de la glycémie *via* un traitement à la phloridzine (Laybutt et al., 2002b). Parallèlement, divers gènes de stress impliqués dans le stress oxydant et l'apoptose (Alox12, Cox2, Fas) sont induits dans ce modèle (Laybutt et al., 2002a ; Laybutt et al., 2003), de même que dans l'îlot GK/Par.

A défaut d'avoir utilisé la phloridzine, nous avons utilisé le caractère prédiabétique/normoglycémique du jeune rat GK/Par non-sevré. Notre étude comprend donc un volet approfondi chez l'animal GK/Par normoglycémique âgé de 7 jours. La comparaison entre les îlots diabétiques et prédiabétiques GK/Par montre que l'activation de presque tous les gènes des différentes familles sélectionnées (associées au stress oxydant et à l'apoptose), est corrélée avec l'installation du diabète. Nous en déduisons que l'environnement hyperglycémique du rat GK/Par — en lui même source de stress oxydant — éduque progressivement la cellule  $\beta$  par une augmentation progressive de ses défenses antioxydantes endogènes (Fig. D3). Toutefois, l'hyperglycémie *per se* n'est pas le seul déterminant de ces adaptations car certains gènes surexprimés (Sod1, Sod2, p53, Cat, Bcl2) chez le GK/Par ne le sont pas chez le rat pancréatectomisé. D'autres paramètres chez le rat GK/Par interviennent très probablement.

### 2.2. Inflammation péri-insulaire et production d'ERO

L'environnement péri-insulaire est source de stress oxydant chez le rat GK/Par. Récemment, l'îlot GK/Par a été identifié comme étant le siège d'un processus inflammatoire occasionnant une infiltration de macrophages (Homo-Delarche et al., 2006), phénomène également mis en évidence dans les îlots humains DT2, les îlots de souris *db/db*, ou les îlots de souris soumises à un régime hyperlipidique (Ehnes et al., 2007a). Il est donc fort probable

que le processus inflammatoire à proximité des îlots GK/Par favorise le stress oxydant (production d'ERO/ERA). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les marqueurs indirects du stress oxydant que nous avons sélectionnés se situent dans l'espace péri-insulaire — rappelant la progression de l'inflammation (*Homo-Delarche et al., 2006*) — et colocalisent avec les macrophages (colocalisation nitrotyrosine-CD68 et -MCA967) (Article 1).

Sur un plan mécanistique (Article 4), ce processus inflammatoire est associé, dans les îlots GK/Par, à une surexpression des gènes codant pour les principales molécules pro-inflammatoires comme les chimiokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , GRO/KC), les cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6), les récepteurs et les facteurs des voies de signalisation associées (TLR-2, TLR-4, MyD88, NF- $\kappa$ B). À ce profil transcriptionnel, s'ajoute également une augmentation de la libération, par les îlots GK/Par, de ces mêmes cytokines/chimiokines. Ces événements s'apparentent à ceux observés dans les îlots humains exposés à un environnement diabétique (hyperglycémie, hyperlipidémie), du fait qu'ils produisent et sécrètent des facteurs inflammatoires analogues (*Ehses et al., 2007a*). De plus, cette réponse inflammatoire est biofonctionnelle puisque un milieu conditionné d'îlots humains, exposés à un environnement diabétique, parvient à stimuler la migration de monocytes et de neutrophiles (*Ehses et al., 2007a*). Donc les facteurs pro-inflammatoires dérivés des îlots sont régulés par l'environnement diabétique et contribuent localement à l'attraction, l'état d'activation, l'infiltration et la rétention inflammatoire (notamment les macrophages).

Savoir si la présence de macrophages ou d'autres cellules myéloïdes constitue un élément causal du DT2 et de la pathologie de l'îlot diabétique, et/ou contribue à la plasticité  $\beta$ -cellulaire, est une question encore non résolue. Les macrophages sécrétant de nombreuses substances impliquées dans le remodelage tissulaire, il est possible qu'une infiltration précoce par ces cellules ait des effets bénéfiques dans la fonction et la plasticité insulaire. Ils sont également connus pour participer à la vasculogénèse/angiogénèse, à la neurogénèse/dégénération nerveuse périnatale et aux bourgeonnements épithéliaux (*Homo-Delarche et Drexhage, 2004*). Des modifications endothéliales associées à une infiltration de monocytes/macrophages, et à une augmentation de l'angiogénèse dépendante des macrophages, ont été décrites dans le rein et l'aorte de rats GK ont été décrites (*Bitar et al., 2005*). Compte tenu du rôle essentiel de la vascularisation insulaire dans la fonction endocrine (*Brissova et al., 2006*), les macrophages peuvent agir pour favoriser les processus de néogénèse et de différenciation des cellules endocrines. Ce phénomène a été observé en culture de pancréas fœtal, où les macrophages se différencient à partir de précurseurs pancréatiques pré-existant, au jour 12.5 de la vie embryonnaire (*Geutskens et al., 2005*). En présence de M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), le nombre de macrophage augmente parallèlement à celui des cellules insulino-sécrétrices. Aussi, une étude récente a mis en évidence que les macrophages, en stimulant l'angiogénèse insulaire, sont essentiels pour prévenir la perte de cellules endocrines et l'installation du diabète chez la souris atteinte de pancréatite (*Tessem et al., 2008*). Les granulocytes sont également impliqués dans le remodelage tissulaire et la néovascularisation (*Henson et Vandivier, 2006*), et pourraient agir en synergie avec les macrophages.

Cependant, avec la progression de la maladie, les macrophages activés jouent probablement un rôle dans l'accélération de la dysfonction insulaire et dans la mort cellulaire, parallèlement au développement de la physiopathologie de l'îlot dans le DT2, comme cela a

déjà été décrit dans le DT1 (*Homo-Delarche et Drexhage, 2004 ; Homo-Delarche et al., 2006*). La présence de macrophages peut finalement révéler le processus de phagocytose en réponse à une nécrose du tissu insulaire (*Pipelleers et al., 1987*) : cette dernière possibilité paraît néanmoins peu vraisemblable dans l'îlot GK/Par qui présente des niveaux apoptotiques normaux.

Il a été mis en évidence que l'activation chronique du récepteur de l'IL-1 constitue une des pièces du puzzle de la glucotoxicité (*Bendtzen et al., 1986*). Les cellules  $\beta$  elles-mêmes ont été identifiées comme sources d'IL-1 $\beta$  dans des prélèvements pancréatiques provenant de patients DT2, contrairement aux sujets non diabétiques. Le traitement *in vivo* par l'IL-1Ra a montré que l'activité IL-1 contribue à la surexpression de nombreuses cytokines/chimiokines, à leur libération par l'îlot GK/Par, et à une infiltration secondaire de cellules immunitaires (Article 4). Néanmoins, l'hyperglycémie n'agit certainement pas seule dans ce mécanisme dépendant de la voie IL-1, et d'autres facteurs (dyslipidémie, adipokines) contribuent probablement à ce processus inflammatoire. Notamment, la leptine, élevée chez le GK/Par (Article 3), augmente la production d'ERO (*Yamagishi et al., 2001b*), parallèlement à la libération d'IL-1 $\beta$  par les îlots humains (*Maedler et al., 2004*). L'IL-1Ra est capable de prévenir les effets délétères d'une exposition chronique à cette cytokine (*Maedler et al., 2004*). Outre la production d'ERO/ERA intrinsèquement liée aux macrophages activés, l'action des cytokines est responsable de phénomènes pro-oxydants *via* une production d'ERO (notamment *via* Nox2) (*Tran et al., 2004 ; Gloire 2006*). Le NO (*Corbett et al., 1996 ; Shimabukuro et al., 1997*) et les céramides (*Kolesnick et Golde, 1994*) sont des intermédiaires possibles dans ce mécanisme. Bien que nous n'ayons pas dosé directement le NO, signalons que les gènes iNos et eNos sont surexprimés dans l'îlot GK/Par diabétique (Article 3). Il est donc plus que probable que dans ce microenvironnement de stress lié à l'inflammation, les agressions radicalaires à l'encontre des cellules  $\beta$  favorisent la mise en place d'adaptations antioxydantes (Fig. D2).

### 2.3. Exposition aux ERO et induction des défenses insulaires chez le rat diabétique

En réponse au stress oxydant (*Schreck et al., 1991*) ou aux cytokines (*Maedler et al., 2003*), l'activation transcriptionnelle des nombreux gènes pro-/anti-apoptotiques et pro-/anti-oxydants sélectionnés ici, pourrait être induite par la transactivation de NF- $\kappa$ B (*Mandrup-Poulsen, 2001*). Notamment, les gènes Hmox1 et A20, aux effets anti-apoptotiques en réponse aux cytokines (*Grey et al., 1999 ; Pileggi et al., 2001*), possèdent des sites de liaison pour NF- $\kappa$ B sur leur région promotrice (*Krikos et al., 1992 ; Lavrovsky et al., 1994*). La plupart des cytokines sont à même d'induire l'expression des gènes de défenses antioxydantes ; diverses études ont montré, dans différents modèles, que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  induisent l'expression de Gclc (*Urata, et al., 1996*), Hmox1 (*Terry et al., 1998*), Sod2 (*Das et al., 1995*), et Cat (*Warner et al., 1996*). La surexpression de Gclc augmente le contenu en GSH et prévient partiellement les effets nocifs, sur la fonction  $\beta$ -cellulaire, des ERO produits en réponse à l'IL-1 $\beta$  (*Tran et al., 2004*). Le GSH est le substrat de la GPx qui dégrade l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les lipides peroxydés et le peroxynitrite (*Sies et al., 1997*). En accord avec ces données, les niveaux élevés de GSH, associés à la surexpression de Gpx1 dans l'îlot GK/Par, devraient protéger du stress oxydant (*Tanaka et al., 2002*) et limiter la formation de nitrotyrosine (produit de réaction du peroxynitrite), phénomène observé dans l'îlot GK/Par.

D'autres gènes de stress, comme Hmox1, sont également induits en réponse aux ERO dans les îlots de rats normaux (*Elouil et al., 2005*). C'est probablement aussi ce qui explique que l'activation des gènes antioxydants participe à la protection de la cellule contre divers facteurs pro-oxydants, dont les cytokines. Par exemple, la surexpression de Sod confère une protection aux lignées de cellules insulino-sécrétrices contre divers oxydants (*Tiedge et al., 1998*), le NO (*Tiedge et al., 1999 ; Moriscot et al. 2000*), l'IL-1 $\beta$  (*Hohmeier et al., 1998*) et un mélange de cytokines — typiquement : IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  — (*Lortz et al., 2000*), et de leurs effets sur la transactivation de NF- $\kappa$ B et l'induction d'iNos (*Azevedo-Martins et al., 2003*).

Les effets protecteurs des gènes antioxydants s'étendent probablement à l'apoptose chez le rat GK/Par puisque, dans les cellules RINm5F, la surexpression des gènes Cat, Gpx, et Sod1, protège les cellules contre la fragmentation de l'ADN, induite par les cytokines (*Lortz et al., 2000*). Aussi, un traitement par la SOD et la catalase prévient l'insulite dans des îlots greffés chez des souris NOD (*Nomikos et al., 1989*). La littérature montrant l'intervention des radicaux libres comme seconds messagers des interleukines dans la destruction autoimmune des cellules  $\beta$  dans le DT1 est abondante (*Rabinovitch, 1998*), et la voie IL-1-Fas-NF- $\kappa$ B est un mécanisme démontré de glucolipotoxicité dans le DT2 (*Donath et al., 2005*). Ainsi, les ERO pourraient contribuer, par l'intermédiaire des cytokines, comme l'IL-1 $\beta$ , à l'aggravation de l'hyperglycémie dans le DT2, à moins que des défenses se mettent en place.

Dans les cellules  $\beta$  cultivées en présence d'IL-1 $\beta$ , il a été montré que l'induction des gènes Hmox1, Sod2, A20 et Hsp70 (ce dernier étant également accru dans les îlots GK/Par (*Homo-Delarche et al., 2006*)) est accompagnée d'une diminution de la sensibilité aux effets toxiques des ERO causés par l'alloxane et la STZ (*Ling et al., 2000*). De plus, l'expression de A20 confère aussi une protection contre l'apoptose induite par les cytokines dans les îlots normaux (*Ferran et al., 1998 ; Grey et al., 1999*). De manière intéressante, nous avons observé un effet correcteur d'un traitement à l'IL-1Ra sur l'expression de Sod2, Hmox1 et A20, de même que d'autres gènes antioxydants et leur régulateur transcriptionnel Nrf2 (Article 3, résultats complémentaires). Donc l'existence d'un couplage entre les processus inflammatoires et l'activation des défenses est fort probable dans l'îlot GK/Par.

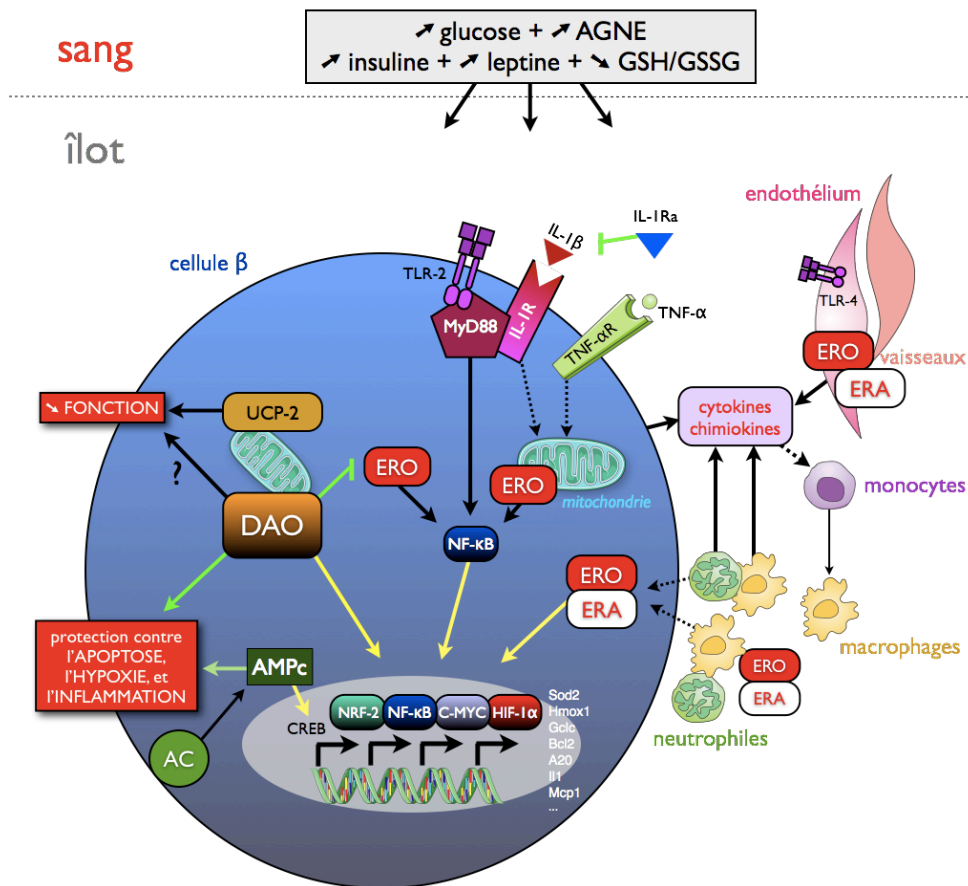
#### 2.4. Exposition aux ERO et induction du découplage mitochondrial dans l'îlot et le foie diabétique

Dans les mitochondries de cellules  $\beta$  saines, la fuite de proton, en partie *via* l'activité UCP, exerce un contrôle important sur le potentiel phosphate (et donc l'ISSG), plus que dans les autres cellules (*Affourtit et Brand, 2006*). Or le superoxyde est capable d'augmenter la conductance aux protons par un mécanisme dépendant d'UCP2 dans ce type cellulaire (*Echtay et al., 2002 ; Krauss et al., 2003*). Dans un contexte d'hyperglycémie chronique, le superoxyde est justement le médiateur de l'activation d'UCP2 (*Krauss et al., 2003*). Responsable de la détérioration de l'ISSG (*Chan et al., 2001 ; Zhang et al., 2001*), UCP2 permet de relier — en partie du moins — les effets de la gluco(lipo)toxicité au stress oxydant, dans la cellule  $\beta$  (pour revues : *Brownlee, 2003 ; Krauss et al., 2005*). La présente thèse constitue un argument supplémentaire pour impliquer les effets glucotoxiques (et ses conséquences intracellulaires) dans les adaptations  $\beta$ -cellulaires observées chez le rat GK/Par. En effet, l'îlot GK/Par présente, parallèlement à une surexpression d'Ucp2, une



diminution de l'hyperpolarisation mitochondriale (Article 1) et du rapport ATP/ADP (*Giroix et al., 1993c*) en réponse au glucose stimulant. En outre, l'hyperleptinémie observée chez le rat GK/Par est susceptible d'induire la surexpression insulaire d'Ucp2 (*Zhou et al., 1997*) ; cette surexpression pourrait contribuer à diminuer la cytotoxicité des cytokines (*Li et al., 2001*) (Fig. D2).

Alors qu'il est généralement faiblement exprimé dans le foie sain (*Larrouy et al., 1997*), le gène Ucp2 est surexprimé dans le foie du rat GK/Par, et notre étude sur la bioénergétique mitochondriale laisse à penser que la respiration pourrait aussi être contrôlée par UCP2 dans le foie de ces animaux (Article 5, résultats complémentaires). En effet, en présence d'acides gras à longues chaînes, ou de substrats qui énergisent le complexe I (glutamate/malate), la consommation d'oxygène est augmentée à l'état 4 ; or la respiration dans cette situation est contrôlée par la fuite de protons au travers de la membrane interne mitochondriale. Nous pensons qu'UCP2 pourrait intervenir pour compenser l'augmentation des ERO mitochondriales (Article 5, résultats complémentaires), également associée aux effets délétères engendrés par l'activité IL-1 (Article 4). L'expression hépatique de la protéine pourrait justement être localisée dans les monocytes/macrophages, en condition inflammatoire (*Nègre-Salvayre et al., 1997*). Le mécanisme mitochondrial mis en jeu dans le foie GK/Par contraste avec celui du Lou/C, chez lequel le gène Ucp2 n'est pas surexprimé (Article 5). Réciproquement, la mitochondrie hépatique Lou/C fait intervenir une autre forme de découplage *via* la cytochrome oxydase. L'activité cytochrome oxydase reste quant à elle normale dans les mitochondries hépatiques GK/Par.



**Fig. D2. Modèle de microenvironnement insulaire associé au stress oxydant chez le rat GK/Par.** La cellule  $\beta$  GK/Par diabétique est exposée à des taux circulants modérément élevés et chroniques de glucose, d'acides gras non-estérifiés (AGNE), d'insuline, de leptine, et à un état redox du glutathion plus oxydé ( $\downarrow$  GSH/GSSG). L'îlot GK/Par est donc exposé à un stress métabolique qui pourrait se traduire, au niveau de la cellule  $\beta$ , par l'activation de récepteurs (TLR-2, IL-1R, TNF- $\alpha$ R) associés à des voies de signalisation intracellulaires (MyD88, NF- $\kappa$ B), et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) mitochondriales. L'ensemble de ces signaux convergent vers le noyau pour induire, par le jeu de facteurs transcriptionnels (NRF-2, NF- $\kappa$ B, C-MYC, HIF-1 $\alpha$ ), différents gènes impliqués dans les défenses contre le stress oxydant et/ou l'apoptose. Il est probable que les voies de défenses antioxydantes (DAO), et de découplage (via UCP2) impactent négativement la fonction  $\beta$ -cellulaire. L'activation génique se généralise également à des gènes pro-inflammatoires, responsables d'une libération de cytokines/chimiokines, qui elles-mêmes vont activer/attirer des cellules inflammatoires (monocytes, macrophages, neutrophiles), sources d'ERO et d'espèces réactives de l'azote (ERA), qui peuvent attaquer la cellule  $\beta$ . La cellule endothéliale et les cellules vasculaires musculaires lisses sont d'autres cibles du stress induit par l'environnement diabétique ; ils produisent des ERO/ERA et des cytokines/chimiokines. Le blocage de l'IL-1 et des voies de signalisation permet notamment d'abolir l'activation des gènes de stress impliqués dans l'inflammation, le stress oxydant, et la dysfonction endothéliale. L'élévation des concentrations intracellulaires en AMP cyclique (AMPc), par les adénylates cyclases (AC), active, via l'élément de récepteur à l'AMPc (CREB), différents gènes potentiellement impliqués dans la défense contre le stress oxydant, mais aussi dans la dé-différenciation cellulaire (C-MYC). Gclc,  $\gamma$ -glutamylcystéine ligase ; Mcp1, monocyte chemotactic protein-1 ; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia-inducing factor-1 $\alpha$  ; IL-1, interleukine-1 ; IL-1Ra, interleukin-1 receptor antagonist ; IL-6, interleukine-6 ; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B ; NRF-2, NF-E2 related factor-2 ; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  ; TLR, toll-like receptor. Flèche verte : action protectrice ; flèche jaune : action transcriptionnelle.

### 3. “Adaptation” et “dés-adaptation” $\beta$ -cellulaire, deux faces d’une même pièce

Dans la cellule  $\beta$  ou l’îlot diabétique, l’augmentation des défenses antioxydantes et/ou du découplage manifeste déjà en soi un phénomène de dé-différenciation, les niveaux d’expression de ces familles de gènes étant à la base faiblement exprimés (*Grankvist et al., 1981a ; Lenzen et al., 1996 ; Tiedge et al., 1997*). De plus, de nombreux gènes spécifiques font la spécificité de la cellule  $\beta$  voient leur expression décroître (insuline, Glut2, Pdx1, Hnf4 $\alpha$ , glucokinase) au cours de l’hyperglycémie chronique chez les sujets DT2 (*Gunton et al., 2005*) et les rats diabétiques pancréatectomisés (*Jonas et al., 1999*). Inversement, l’expression des gènes non-spécifiques, impliqués dans le métabolisme du glucose (lactate dehydrogenase-A, hexokinase-1, glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-bisphosphatase, le transporteur de lactate) ou des lipides (Ppar $\gamma$ , Ucp2), augmente (*Jonas et al., 1999 ; Laybutt et al., 2002a ; Laybutt et al., 2003*). Ces régulations transcriptionnelles seraient liées au processus inflammatoire et au stress oxydant puisque PPAR $\gamma$  est un régulateur important de certains gènes inflammatoires (*Odegaard et al., 2007*). Ce processus de dé-différenciation, bien décrit *in vivo* — et disparaissent après normalisation de la glycémie — et *in vitro*, dans les îlots cultivés à fort glucose (*Jonas et al., 2001*), pourrait être induit par l’activation de c-myc, un gène de réponse précoce à l’hyperglycémie, intervenant dans la régulation de la différenciation, la croissance et l’apoptose de la cellule  $\beta$  (*Jonas et al., 1999 ; Jonas et al., 2001 ; Laybutt et al., 2002b ; Laybutt et al., 2003 ; Pascal et al., 2008*). Par ailleurs, l’AMPc joue très probablement un rôle primordial dans l’activation de c-myc (*Jonas et al., 2001*) et d’Hmox1 (*Jonas et al., 2003*) en réponse à l’hyperglycémie chronique. L’expression de c-myc est aussi augmentée en réponse aux cytokines (*Elouil et al., 2005*).

L’ensemble de ces éléments s’adaptent parfaitement au scénario observé dans l’îlot GK/Par qui présente tous les stigmates de la dé-différenciation, parallèlement à une surexpression de c-myc et de ses gènes cibles, tel que Ldha (*Shim et al., 1997*) (Article 2, résultats complémentaires) (Fig. D2). Les changements dans le fonctionnement  $\beta$ -cellulaire chez le rat GK/Par, après le sevrage, pourraient donc refléter une perte de l’état de différenciation des cellules  $\beta$  après exposition à une hyperglycémie et/ou hyperlipidémie chronique (même d’intensité modeste) (glucolipotoxicité). Cette situation chez le jeune rat GK/Par, au moment du sevrage, rappelle ce qui a été décrit chez le rat adulte pancréatectomisé. Suite à cette opération, on observe une poussée de régénération de cellules  $\beta$  (néogenèse), qui reconstitue partiellement le pool de cellules  $\beta$  différenciées. Ce n’est qu’une à deux semaines après l’ablation que les rats pancréatectomisés développent une hyperglycémie basale, en général modérée, mais parfois sévère (*Jonas et al., 1999*).

Récemment, il a été mis en évidence que la stimulation des défenses antioxydantes, par l’AMPc, pourrait être liée à la présence d’un élément de réponse sensible à l’AMPc (CREB–CRE) sur la séquence promotrice du gène Hmox1 (*Jonas et al., 2003*). De plus, l’activation de CREB restaure l’expression du gène anti-apoptotique Bcl2 et diminue l’apoptose dans les îlots en présence de cytokines (*Sarkar et al., 2007*). De fait, les cellules  $\beta$  GK/Par diabétiques pourraient être protégées de l’apoptose *in situ*, compte tenu de (i) leurs fortes concentrations intracellulaires en AMPc (*Dolz et al., 2005*) ; (ii) la surexpression des gènes codant pour certaines isoformes d’adénylates cyclases et de protéines G ; (iii) la sous-expression des phosphodiesterases ; (iv) la résistance des cellules  $\beta$  à l’apoptose induite par

l'inhibition des adénylates cyclases (*via* la dd-Ado) ; et enfin (v) la restauration de la sensibilité des cellules  $\beta$  à l' $H_2O_2$  en présence de la dd-Ado (Article 2) (Fig. D2).

Le fait que des niveaux accrus d'AMPc préviennent l'apoptose spontanée des cellules  $\beta$  GK/Par, converge avec les études montrant que le dbcAMP inhibe l'apoptose induite par d'autres agents que l' $H_2O_2$  (*Lindenboim et al., 1995*), dont le palmitate (*Kwon et al., 2004*). Dans notre étude, les différents types de stress auxquels sont soumis les îlots (isolement, culture et agent pro-oxydant) pourraient converger vers une voie finale commune conduisant à l'apoptose, et faisant intervenir l'AMPc. Nous n'avons cependant pas étudié la voie en aval de l'accumulation de l'AMPc. Ce type d'adaptation s'apparente quelque peu aux stratégies thérapeutiques visant à élever les concentrations intracellulaires en AMPc, comme dans le cas de l'utilisation du GLP-1 ou des inhibiteurs de l'enzyme dipeptidyl peptidase-4 — qui amplifient un mécanisme naturel de l'organisme appelé "voie des incrétones" — pour lutter contre la perte de masse  $\beta$ -cellulaire fonctionnelle. Notamment, on sait que le GLP-1 bloque l'apoptose induite par l' $H_2O_2$  (*Hui et al., 2003*), les cytokines et les acides gras (*Li et al., 2003*).

#### **4. Dysfonction vasculaire, inflammation et auto-entretien du stress oxydant local insulaire**

La cellule endothéliale est particulièrement exposée aux ERO dans le DT2. Le stress oxydant joue un rôle central dans la pathogenèse des complications micro- et macrovasculaires liées au DT2 (*Giugliano et al., 1996*), et la dysfonction endothéliale en est un marqueur précoce (*Giugliano et al., 1996 ; Cai et Harrison, 2000*). Diverses altérations de la vascularisation ont déjà été rapportées chez le rat GK/Par (*Homo-Delarche et al., 2005*). L'augmentation de la production d'ERO par l'endothélium de l'îlot a très certainement une origine plurifactorielle. Chez le rat GK/Par diabétique, outre l'hyperglycémie (*Du et al., 2000 ; Brownlee, 2001*), l'hyperlipidémie et l'hyperleptinémie (*Yamagishi et al., 2001b*) sont des inducteurs potentiels d'ERO par la cellule endothéliale. Modèle bien décrit de stress oxydant induit par l'hyperglycémie, la cellule endothéliale active également, en situation de stress, diverses enzymes pro-oxydantes (COX, LOX, NOX, eNOS) lorsqu'elle est stressée (*Féletou et Vanhoutte, 2006*).

En condition de stress oxydant, la cellule endothéliale est activée ; elle va alors produire des ERO/ERA, et libérer divers facteurs inflammatoires (cytokines et chimiokines) responsables du recrutement des cellules inflammatoires et de leur infiltration, et des complications de type microangiopathie/athérosclérose (*Tedgui et Mallat, 2006 ; Apostolakis et al., 2008*). Ce scénario est à la base d'une boucle de stress, puisque les cellules immunitaires nouvellement recrutées vont entretenir l'état de stress oxydant, la production de cytokines (IL-1)/chimiokines (MCP-1) et l'activation endothéliale (Fig. D2). En contact direct avec l'endothélium insulaire, la cellule  $\beta$  subira non seulement les attaques radicalaires, mais aussi, du fait de la dysfonction endothéliale, un risque de carence en oxygène (hypoxie), source de stress mitochondrial à l'origine d'une hyperproduction d'ERO. Ce phénomène constitue un autre élément du puzzle pouvant participer au préconditionnement de la cellule  $\beta$  GK/Par, et à l'augmentation subséquente de ses défenses antioxydantes. L'hypoxie insulaire, chez le rat GK/Par, est reflétée par la surexpression de gènes de réponse spécifiques comme Hif1 $\alpha$  et Pai1 (Article 2) ; elle s'accroît probablement avec l'âge du fait

de la progression de la fibrose insulaire (*Homo-Delarche et al., 2005*). Récemment, il a été observé que les îlots de patients diabétiques montrent une diminution du facteur de transcription HIF-1 $\beta$ , un régulateur des gènes de la fonction vasculaire et de réponse à l'hypoxie, incluant les gènes Vegf, Pai1 et Epo (code pour l'érythropoïétine) (*Gunton et al., 2005*).

Nous avons montré que les différents gènes reflétant l'activation endothéliale (enzymes pro-oxydantes, chimiokines) sont activés dans l'îlot GK/Par (Article 3). Cette activation est associée à la présence de marqueurs de stress oxydant comme la nitrotyrosine (Article 1), connue pour être associée au dysfonctionnement endothélial (*Mihm et al., 2000*). Le rôle délétère du superoxyde sur l'endothélium, en situation d'hyperglycémie chez le rat GK/Par, peut aussi passer par l'activation de la PARP, qui module NF- $\kappa$ B et l'expression des gènes codant pour les molécules de l'adhésion intercellulaire (*Ross, 1993*), iNOS et NOX (*Garcia Soriano et al., 2001*).

La dysfonction endothéliale est étroitement associée à l'inflammation (*Ehshes et al., 2007b*), et les effets anti-inflammatoires du traitement *in vivo* à l'IL-1Ra sont accompagnés d'une diminution (parfois drastique) de 80% des gènes sélectionnés, associés à l'activation endothéliale, au stress oxydant, à l'inflammation et à la fibrose (Articles 3 et 4). Le blocage de l'activité IL-1, par cette molécule, s'est aussi accompagné, au niveau insulaire, d'une amélioration de la vascularisation, d'une réduction de la fibrose et de l'apoptose  $\beta$ -cellulaire. Donc l'augmentation des défenses dans l'îlot GK/Par pourrait être entretenue par un stress de l'endothélium, assorti d'une inflammation conduisant à la fibrose et à la souffrance des cellules  $\beta$ .

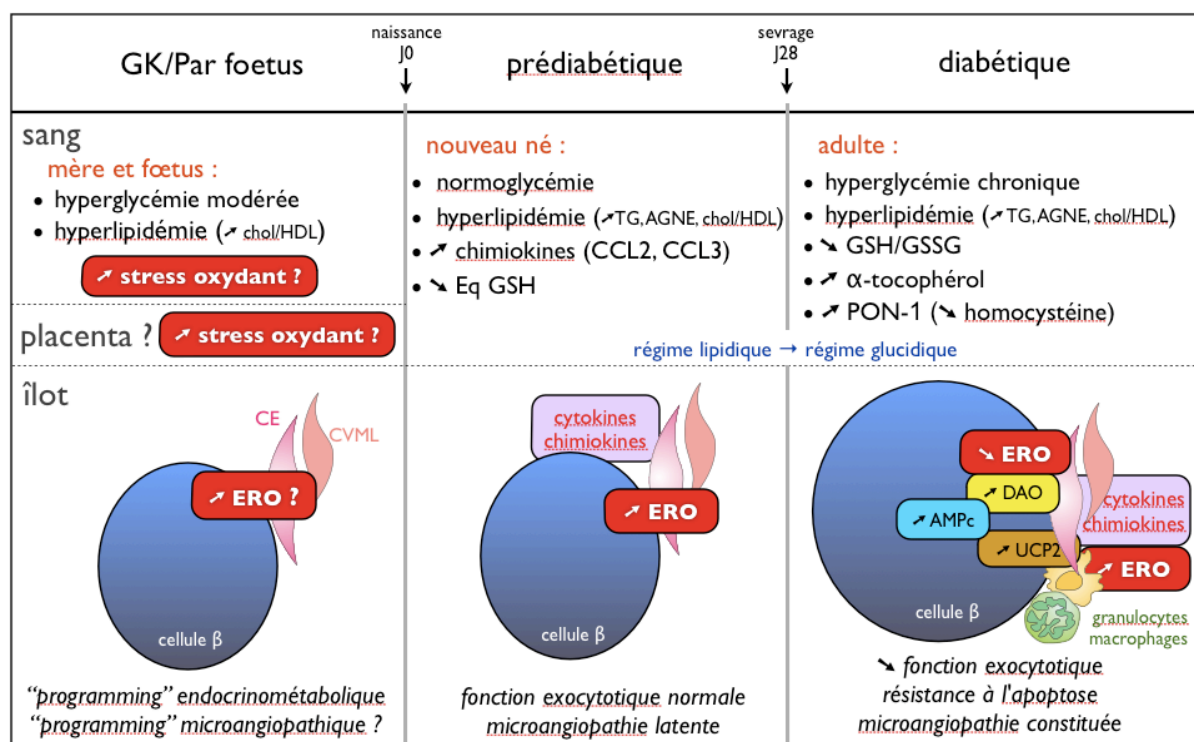
## 5. Et avant l'installation du DT2 ?

Alors que les défenses antioxydantes sont encore absentes dans les îlots de rats GK/Par prédiabétiques âgés de 7 jours, de même que les marqueurs de stress oxydant à cet âge, d'autres données indiquent qu'il existe déjà un phénomène de stress oxydant dans ces îlots. En effet, la production d'ERO est accrue, le statut redox du glutathion tend vers un état plus oxydé et certains gènes antioxydants (qui régulent notamment le statut redox du glutathion : Gpx1 et Gsr), sont différents des îlots témoins du même âge. De plus, le gène A20 est anormalement régulé (sous-exprimé) à cet âge (Article 1 et 2).

L'explication la plus rationnelle est que l'hyperglycémie n'agit pas seule dans la mise en place des systèmes de défenses, et que d'autres facteurs participent au préconditionnement au stress oxydant, avant même l'installation du DT2 (Fig. D3). De ce point de vue, les concentrations élevées de lipides peuvent jouer un rôle déterminant dans le stress de la cellule  $\beta$ , car les concentrations en acides gras non-estérifiés (AGNE) et cholestérol sont accrues chez le rat prédiabétique GK/Par âgé de 7 jours (*Homo-Delarche et al., 2008*). En effet, il est connu qu'une exposition longue aux acides gras augmente la production d'ERO dans l'îlot pancréatique et la cellule  $\beta$  (*Carlsson et al., 1999* ; *Wang et al., 2004* ; *Choe et al., 2007*), et elle contribue plus globalement à la physiopathologie du DT2 (*Evans et al., 2003*). Ce rôle pro-oxydant des acides gras semble mettre en jeu la biosynthèse de céramides (*Maedler et al., 2001*), une situation décrite dans les îlots de rats ZDF obèses prédiabétiques et diabétiques (*Shimabukuro et al., 1998*).

D'autres paramètres circulants peuvent nous renseigner sur l'origine éventuelle du stress oxydant. En effet, au niveau circulant, parallèlement à un contenu érythrocytaire en GSH diminué (Article 1), les concentrations plasmatiques de chimiokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ) sont également accrues par rapport au Wistar du même âge (*Homo-Delarche et al., 2008*). Au cours de l'hyperlipidémie, MCP-1 (CCL2) joue un rôle important dans la chimiotaxie macrophagique (*Weisberg et al., 2006*), et l'accumulation de LDL oxydées entraîne la synthèse de MCP-1 (*Cushing et al., 1990 ; Rajavashisth et al., 1990*). Un tel scénario est envisageable *in vivo* chez le rat GK/Par âgés de 7 jours, chez qui la présence d'une inflammation insulaire pourrait être un événement précoce dans la physiopathologie du DT2. De fait, des anomalies précoces de la vascularisation (microangiopathie), sur la base de l'augmentation de l'expression des gènes pro-athérosclérotiques et de la diminution de celle des gènes pro-angiogéniques, sont présentes avant le sevrage (*Homo-Delarche et al., 2008*). Ainsi, l'environnement hyperglycémique post-sevrage, source d'ERO, accentuerait la vulnérabilité originelle précoce de la cellule endothéliale, avec pour conséquences une aggravation de l'inflammation/fibrose et ses répercussions négatives sur la fonction/survie  $\beta$ -cellulaire.

Le déterminisme du stress oxydant associé aux anomalies transcriptionnelles chez le rat GK/Par, peu après la naissance, renvoie aux déterminants agissant durant les périodes foetale et postnatale précoce, tels que les facteurs épigénétiques (*Simmons, 2007*). De récentes évidences issues des études épidémiologiques, cliniques, ou chez l'animal, avancent l'hypothèse d'une origine développementale du DT2. Elles proposent les déséquilibres du milieu *in utero* (apports inadéquats en nutriments et oxygène) comme déterminant du DT2 à l'âge adulte (*Simmons, 2006*). De tels déséquilibres imposent au fœtus de s'adapter par des changements métaboliques et humoraux, et par une redistribution du débit sanguin, responsables de modifications épigénétiques. Il est connu que l'exposition à l'hyperglycémie à cette période de la vie participe au "programming" du pancréas endocrine (*Simmons, 2006*). Ce scénario s'applique aussi à notre modèle GK/Par puisque les mères gestantes sont légèrement hyperglycémiques et hypercholestérolémiques, et elles le restent pendant l'allaitement) (*Serradas et al., 1998 ; Homo-Delarche et al., 2008*) (Fig. D3). L'ensemble de ces éléments nous amènent à penser que l'installation de l'hyperglycémie n'est pas le seul déterminant des adaptations au stress oxydant, et que des adaptations génétiques ou épigénétiques pourraient être mise en jeu très précocement.



**Fig. D3. Proposition d'évolution du stress oxydant dans l'îlot GK/Par avec l'âge.** AGNE, acides gras non-estérifiés ; AMPc, AMP cyclique ; CE, cellule endothéliale ; CVML, cellule vasculaire musculaire lisse ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; PON-1, paraoxonase-1 ; Eq GSH, équivalent GSH ; CCL2, chimiokine, C-C motif, ligand 2 (aussi appelée MCP-1) ; CCL3, chimiokine, C-C motif, ligand 3 (aussi appelée (MIP-1 $\alpha$ )) ; TG, triglycérides ; UCP2, uncoupling protein-2. *nb* : les AGNE et les TG ne passent la barrière placentaire, à l'inverse du cholestérol.

## 6. Le stress oxydant et ses paradoxes

### 6.1. Exposition aux ERO en prélude au DT2 ?

L'hyperglycémie chronique n'est pas nécessaire à l'apparition du stress oxydant, et de nombreuses évidences obtenues dans les états prédiabétiques, insulino-résistants, ou chez l'individu sain, abondent en ce sens. En effet, les niveaux d'ERO plasmatiques — corrélés positivement à l'insulinémie à jeun et négativement à l'utilisation du glucose — sont étroitement liés à l'insulino-sensibilité (Paolisso *et al.*, 1994b), y compris chez les sujets sains (Facchini *et al.*, 2000). De façon surprenante, en effet, dans une population saine présentant des variations de sensibilité à l'insuline, l'activité de la catalase et la concentration en vitamine E diminuent avec l'augmentation du taux de lipoperoxydation et la perte de sensibilité à l'insuline (Facchini *et al.*, 2000). Ces changements de la balance pro-/anti-oxydants sont retrouvés chez les individus intolérants au glucose, chez qui les défenses antioxydantes (GSH, l'acide ascorbique, SOD et catalase) sont diminuées et certains marqueurs oxydatifs (TBARS, isoprostanes) sont augmentés (Niskanen *et al.*, 1995 ; Vijayalingam *et al.*, 1996 ; Gopaul *et al.*, 2001). Chez l'obèse insulino-résistant — présentant une hyperinsulinémie et une dyslipidémie —, il existe un état de stress oxydant (Cicccone *et al.*, 1999), associé à des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires (Exposito *et al.*, 2002).

Juste avant la déclaration d'un DT1, les enfants prédiabétiques présentent, quand à eux, des niveaux de SOD anormalement élevés (*Dominguez et al., 1998*).

De façon aiguë, l'hyperglycémie induit aussi un stress oxydant chez le sujet sain en période postprandiale comme l'attestent, au niveau sanguin, la diminution des défenses antioxydantes (*Ceriello et al., 1998*), et l'augmentation de la nitrotyrosine (*Marfella et al., 2001*). Ce phénomène d'oxydation contraste avec celui observé chez le patient diabétique de type 2 qui lui, néanmoins, ne parvient pas à compenser l'augmentation des ERO (*Ceriello et al., 1998*). En relation avec ce phénomène, de faibles niveaux plasmatiques de vitamine E prédisent mieux l'apparition du DT2 que l'âge, l'index de masse corporel, ou encore le tabagisme (*Salonen et al., 1995*). L'idée selon laquelle le stress oxydant pourrait déterminer l'apparition du diabète est renforcée par les données chez l'animal prédisposé (obèse et insulino-résistant) montrant que l'administration de pro-oxydant précipite le développement du diabète (*Laight et al., 2000*). Par conséquent, s'il est largement admis que le stress oxydant est un événement secondaire à l'hyperglycémie chronique, il peut se manifester déjà avant celle-ci, et devient un éventuel facteur causal.

## 6.2. Ambivalence des ERO dans leurs effets sur la fonction $\beta$ -cellulaire

L'exposition aiguë ou prolongée à des oxydants comme l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le glyceraldéhyde, l'arsénique, le HNE et le méthylglyoxal, altère l'ISSG (*Maechler et al., 1999* ; *Sakai et al., 2003* ; *Pi et al., 2007*). Les ERO pourraient inhiber l'ISSG en interférant avec le processus de couplage stimulus-sécrétion. Quatre mécanismes ont été proposés : (i) l'inhibition du métabolisme du glucose (*Maechler et al., 1999* ; *Sakai et al., 2003*), via l'inactivation de la GAPDH (*Sakai et al., 2003*), sensible aux modifications oxydatives (*Brodie et Reed, 1987* ; *Du et al., 2000*) ; (ii) l'hyperpolarisation membranaire par activation des canaux potassiques ATP-dépendants (*Krippeit-Drews et al., 1994* ; *Nakazaki et al., 1995*), dans un mécanisme impliquant une diminution d'ATP sans modification du calcium intracellulaire (*Krippeit-Drews et al., 1999*) ; (iii) l'activation d'UCP2 (*Krauss et al., 2003*) ; et (iv) non encore admise, mais suggérée, l'hypothèse de l'induction des défenses antioxydantes (*Pi et al., 2007*).

Récemment, il a été mis en évidence un rôle des ERO dans la fonction  $\beta$ -cellulaire en tant qu'acteur de signalisation de l'insulino-sécrétion. Il avait déjà été montré que l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , produit par la cellule elle-même, est utilisé comme second messenger dans la transduction de messages intracellulaires et de leur amplification (*Mahadev et al., 2001*). Dans les îlots de rats, l'exposition à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  exogène ou endogène (produit par l'alloxane) entraîne l'influx de calcium, et s'accompagne de la sécrétion de l'insuline en condition non-stimulante (*Janjic et al., 1999* ; *Maechler et al., 1999*). Cet effet potentialisateur sur la sécrétion a également été observé après une courte exposition à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  exogène (*Pi et al., 2007*), ou au couple xanthine oxydase/hypoxanthine (*Ebelt et al., 2000*), un système produisant du superoxyde et de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en continue.

Pi et al. ont nuancé ces données, en proposant que l'augmentation des défenses antioxydantes, en réponse à l'exposition prolongée à des facteurs pro-oxydants, pourrait altérer le signal ERO-dépendant sur la sécrétion de l'insuline et détériorer ainsi indirectement l'ISSG, lors de stress oxydant induit à forte concentration de glucose. Dans notre modèle GK/Par, des éléments sont en faveur de cette hypothèse et indiquent que les antioxydants pourraient influencer négativement la signalisation induite par les ERO, puisque l'inhibition de la biosynthèse de GSH restaure les effets positifs de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à basse concentration



glucose (Article 1). Ceci pourrait aussi expliquer l'inefficacité des traitements antioxydants (vitamine E, NAC) sur la production d'ERO, et la sécrétion de l'insuline par les îlots diabétiques GK/Par, déjà bien pourvus en antioxydants endogènes, contrairement aux îlots témoins ou prédiabétiques.

Néanmoins, nos conclusions ne confortent pas la notion largement répandue selon laquelle l'hyperglycémie accroît systématiquement la production insulaire d'ERO, et sur laquelle se fonde l'hypothèse que les ERO seraient les médiatrices de l'ISSG en réponse au glucose (*Leloup et al., 2006 ; Pi et al., 2007*). Les conditions dans lesquelles nous avons étudié l'impact chronique des fortes concentrations de glucose *in vivo* diffèrent de celles des autres réalisées *in vitro* (*Tanaka et al., 1999 ; Bindokas et al., 2003 ; Krauss et al., 2003 ; Pi et al., 2007*), ou *in vivo* mais après de courte durée d'hyperglycémie (48h) (*Tang et al., 2007*). Les adaptations à long terme de l'hyperglycémie agissant sur la production d'ERO sont sans doute très différentes en fonction des conditions expérimentales. En outre, l'augmentation des ERO dans les îlots témoins provoquée par les inhibiteurs de la chaîne respiratoire (donc de la synthèse d'ATP) n'engendre pas d'augmentation de la sécrétion de l'insuline, mais au contraire la décroît (Article 1). Donc, l'association entre la production d'ERO et la sécrétion de l'insuline semble moins évidente qu'elle n'y paraît, et le signal ERO-dépendant à forte concentration de glucose requiert peut-être aussi la synthèse d'ATP pour être fonctionnel.

### 6.3. Hormèse et protection naturelle contre le stress oxydant

La production d'ERO est une condition intrinsèque à la vie aérobie. Les cellules ont appris à "vivre avec" ces espèces et, dans une certaine mesure, à les intégrer dans leur biochimie (*Barja, 1993*). Donc, il est fort possible que des concentrations excessives en antioxydants interfèrent avec les processus physiologiques vitaux de ces "molécules signal" (*Mahadev et al., 2001*). Nous l'avons vu, les ERO jouent probablement un rôle important dans la signalisation intracellulaire de la cellule  $\beta$  ; leur rôle vital est aussi démontré par le fait que la surexpression de certains gènes antioxydants — codant pour la catalase et la métallothionéine — dirigée dans les cellules  $\beta$  de la souris non-obèse diabétique (NOD), accélère la progression du diabète (*Li et al., 2006*).

À une autre échelle, il a été suggéré que l'augmentation des défenses antioxydantes, secondairement à une surproduction d'ERO, responsable *in fine* d'une diminution globale nette du stress dans la cellule, serait à l'origine de l'augmentation de l'espérance de vie (*Sinclair, 2005 ; Zarse et al., 2007*). Tout récemment, une étude chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, apporte de sérieux éléments de compréhension sur ce point. Alors que l'augmentation de la biodisponibilité en glucose décroît la longévité de ces organismes, l'altération du métabolisme du glucose, subséquente à la déprivation en glucose, augmente la longévité en stimulant le métabolisme mitochondrial (dont la  $\beta$ -oxydation) (*Schulz et al., 2007*). Suite à cette intervention, les conséquences chez le ver sont une augmentation de la respiration mitochondriale, de la production d'ERO, des défenses antioxydantes, de la résistance au stress oxydant, et de la survie. La surprise vient de ce que tous ces événements sont abolis avec des suppléments antioxydants (NAC, vitamines E et C). Présenté par les auteurs comme la *mitohormèse* (ou hormèse mitochondriale) — l'hormèse définissant les effets bénéfiques sur la résistance au stress et la longévité d'agents qui,

utilisés à des concentrations fortes, exerceraient des effets néfastes (*Rattan, 2001 ; Masoro, 2006*) —, cette adaptation rappelle ce qui se passe lors de la restriction calorique.

Une des conclusions majeures de ce travail est que, plus que la quantité d'antioxydants en soi, c'est le mécanisme de leur induction qui importe. Ce mécanisme implique une production d'ERO modérée dépendante d'une augmentation de la respiration mitochondriale (*Schulz et al., 2007*). La question de savoir si des mécanismes hormétiques s'appliquent à l'augmentation de l'espérance de vie chez les eukaryotes supérieurs n'est pas complètement élucidée (*Sinclair, 2005 ; Ingram et al., 2006*), bien que ces mécanismes aient été suggérés chez la souris (*Speakman, 2005*), et montrés chez *Caenorhabditis elegans* (*Schulz et al., 2007*). Cette hypothèse refonde notre conception des bénéfices apportés par des suppléments antioxydants. Toute la subtilité défensive vient de la nature et de l'intensité des stimuli pro-oxydants. Des preuves récentes indiquent d'ailleurs que les suppléments diminuent significativement l'espérance de vie chez les humains (*Bjelakovic et al., 2007*), ce qui relance le débat sur leur usage.

Dans un modèle animal de restriction calorique spontané, le rat Lou/C, présentant une augmentation de la longévité et une résistance à l'obésité et ses pathologies associées (*Perrin et al., 2003*), nous avons montré une augmentation de la production d'ERO mitochondriale (Article 5). Cette hyperproduction d'ERO est due à un apport augmenté en équivalents réduits au niveau de la chaîne respiratoire, et témoigne d'une plus grande capacité d'oxydation. Ces plus grandes aptitudes à oxyder les nutriments (retrouvées dans le muscle), et notamment les lipides, protègent de l'insulino-résistance (*Petersen et al., 2004*). Les mécanismes impliqués passent probablement par une moindre accumulation de métabolites pro-oxydants (céramides, DAG), aux effets négatifs reconnus sur l'action de l'insuline dans le foie et le muscle squelettique, *via* l'activation de sérine/thréonine kinases et la phosphorylation en sérine de IRS-1 (*Schenk et Horowitz, 2007 ; Schenk et al., 2008*). De plus, chez le rat Lou/C, à de faibles apports énergétiques s'associent de fortes dépenses énergétiques, car ce rat hyperactif peut courir jusqu'à 10 km/jour (*Servais et al., 2003*). Bénéfique pour la santé en terme de longévité (*Manini et al., 2006*), l'exercice physique est aussi connu pour augmenter transitoirement le stress oxydant (*Chevion et al., 2003*) et diminuer l'insulino-résistance (*Schenk et Horowitz, 2007*). Le modèle physiologique du rat Lou/C est donc compatible avec le principe d'une stratégie "hormétique", garante d'un bon état de santé.

#### 6.4. La supplémentation en antioxydants lors du DT2, quelle pertinence ?

Toutes les études cliniques de grande envergure ont montré l'inefficacité des traitements antioxydants, tant sur le plan métabolique que vasculaire, ce qui remet en question la pertinence de choisir le stress oxydant comme cible thérapeutique dans le diabète (pour revue : *Wiernsperger, 2003*). Beaucoup d'essais cliniques ont choisit la vitamine E comme antioxydant, et diverses questions sont soulevées par ce choix : la bioassimilation nette de cette vitamine est mal connue. Le niveau de preuve assurant que l'antioxydant ingéré atteigne la cellule cible en concentration suffisante est faible. De plus, la vitamine E, à l'instar d'autres antioxydants, devient pro-oxydante lorsque l'apport est important (*Upston et al., 1999*).

Par ailleurs, si nous partons du principe que les cellules — dans leurs caractéristiques intrinsèques — ne requièrent pas toutes les mêmes doses d'antioxydants en termes de

concentration et de nature, et que des maladies comme le diabète sont évolutives, il est risqué de standardiser une thérapie antioxydante universelle dans ce domaine. Enfin, si nous prenons les différents types cellulaires étudiés dans cette thèse, nous pouvons dresser des profils pro-/anti-oxydants très différents suivant qu'il s'agisse de l'îlot, du foie ou du muscle squelettique, et ces profils sont eux-mêmes modulés par le statut physio(patho)logique : Lou/C vs. GK/Par. Dans ces deux modèles animaux, l'importance du stress oxydant et les adaptations y étant associées sont hétérogènes selon les tissus (foie, muscle squelettique, hypothalamus, coeur, testicule, pancréas) (Articles 1 et 5 ; *Ferreira et al., 1999b* ; *Santos et al., 2000* ; *Palmeira et al., 2001* ; *Santos et al., 2001* ; *Santos et al., 2003* ; *Ferreira et al., 2003b* ; *Garait et al., 2005* ; *Sena et al., 2008*).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au niveau de la cellule  $\beta$  diabétique, la glucotoxicité, la lipotoxicité, l'inflammation et sans doute aussi l'hypoxie générée par les altérations vasculaires et la fibrose, agissent de concert dans la détérioration de la fonction  $\beta$ -cellulaire probablement *via* un mécanisme commun qui est le stress oxydant. En réponse, l'induction des défenses antioxydantes confère une résistance à ce stress oxydant qui, paradoxalement, pourrait permettre d'assurer la survie  $\beta$ -cellulaire. Chez le rat GK/Par, différents points restent à approfondir et plusieurs zones d'ombres restent à explorer pour parachever la description de ce modèle.

### 1. La cellule $\beta$ est-elle aussi résistante *in vivo* au stress oxydant ?

Une approche que nous pourrions envisager, en prolongement de notre étude sur la résistance au stress oxydant, consisterait à explorer la résistance *in vivo* du rat GK/Par aux toxines pro-oxydantes spécifiques de la cellule  $\beta$  (alloxane et STZ). L'évaluation se ferait aussi sur les versants fonctionnels (dégradation de l'hyperglycémie ?) et en relation avec la survie (l'apoptose  $\beta$ -cellulaire est-elle augmentée ?). La mise en évidence d'une invulnérabilité à ces agents cytotoxiques conforterait encore davantage le rôle déterminant des défenses antioxydantes chez le rat GK/Par.

### 2. Comment moduler la résistance au stress oxydant (défenses antioxydantes) ?

Il serait intéressant de pouvoir moduler *in vivo* les défenses antioxydantes et la réponse au stress oxydant. Il faudrait, par exemple, s'assurer que les changements de phénotype (résistance aux effets des ERO, profil transcriptionnel des gènes de stress) sont normalisés après un traitement à la phloridzine, une fois le diabète installé. Dispensés suffisamment tôt (avant le sevrage : lorsque la production d'ERO est accrue dans l'îlot), certaines molécules antioxydantes comme la NAC (*Tanaka et al., 1999*), la vitamine E (*Ihara et al., 2000*) et le coenzyme Q (*Sena et al., 2008*) — seules ou combinées — pourraient aussi prévenir indirectement l'augmentation des défenses, en prévenant le stress oxydant précocement. Ces types de traitement pourraient également prévenir l'activation endothéliale précoce observé chez les rats prédiabétiques. D'autres stratégies nutritionnelles comme la restriction calorique ou l'activité physique pourraient également s'avérer efficaces. Comme nous l'avons vu, les effets anti-inflammatoires du traitement par l'IL-1Ra ont justement permis de prévenir l'augmentation de ces défenses dans l'îlot GK/Par ; les effets sur la fonctionnalité  $\beta$ -cellulaire en réponse aux ERO restent néanmoins à étudier après le traitement (les cellules  $\beta$  redeviennent-elles sensibles ?). Nous pourrions aussi nous questionner sur les effets de différentes combinaisons (anti-inflammatoires, antioxydants) entre tous ces moyens de modulation du stress oxydant.

Inversement, il serait intéressant d'aggraver l'état de stress oxydant par un traitement sporadique et faiblement pro-oxydant, par le sucrose notamment (*Ihara et al., 1999*). Dans ce contexte, pourrait-il y avoir un renforcement précoce (dès le 7<sup>ème</sup> jour après la naissance) des défenses antioxydantes endogènes dans l'îlot GK/Par ?

### 3. Le rôle de l'environnement foetal GK/Par : une empreinte par le stress oxydant intra-utérin ?

Dans un modèle animal de stress métabolique utérin, il existe un retard de croissance à la naissance, accompagné d'une diminution de l'ADNmt et d'une augmentation de la production insulaire d'ERO, en prélude à l'installation du DT2 (*Simmons et al., 2005*). Ces animaux présentent également une augmentation des défenses antioxydantes dans le foie (*Peterside et al., 2003*). De manière intéressante, ces mêmes animaux présentent aussi une production d'ERO en période foetale. Il existe donc une association entre un phénomène de stress oxydant à cette période, et le "programming" de la cellule  $\beta$  pouvant être à l'origine du DT2 à l'âge adulte. La récente mise en évidence du programming d'une microangiopathie insulaire dès le stade foetal GK/Par (*Homo-Delarche et al., 2008*), pourrait être responsable d'une diminution de la masse  $\beta$  (*Lammert et al., 2001*), nous invite donc à explorer le niveau de production d'ERO autour de cette période. En outre, jouer sur le stress oxydant/inflammation et/ou l'hyperglycémie des mères GK/Par en période de gestation (stress oxydant placentaire ?) et pendant l'allaitement pourrait peut-être influencer positivement le phénotype précoce du pancréas GK/Par.

### 4. La résistance des cellules $\beta$ GK/Par au stress oxydant persiste-t-elle au cours du vieillissement ?

L'augmentation des défenses antioxydantes est généralement un phénomène précoce au stress oxydant, comme tentative compensatoire (*Turk et al., 2002*). Nous avons délibérément choisi des rats GK/Par âgés de 7 jours et de 2,5 mois (hyperglycémiques depuis 1,5 mois). La fibrose évolue avec l'âge chez le rat GK/Par (*Homo-Delarche et al., 2005*), et un autre groupe travaillant sur le GK/Par a montré que le stress oxydant évolue parallèlement à la fibrose ; ces deux phénomènes augmentent avec la durée de l'exposition à l'hyperglycémie (*Ihara et al., 1999*). Il serait intéressant d'étudier le phénotype de rats GK/Par plus âgé (à partir de 5 mois) au plan de leur résistance au stress oxydant. À cet âge, les îlots deviennent-ils plus vulnérables ? Les défenses antioxydantes s'estompent-elles ?

### 5. Spécificité cellulaire dans l'îlot

La question de la spécificité cellulaire nous interpelle directement dans notre étude portant sur l'évaluation du statut oxydatif de l'îlot GK/Par. Dans l'îlot GK/Par, les cellules endocrines de l'îlot, principalement lorsqu'elles sont stressées, mais aussi les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, vasculaires musculaires lisses et les neurones peuvent toutes participer au stress oxydant. Une évaluation de la production d'ERO dans des cellules  $\beta$  triées et les cellules endothéliales pourrait à ce titre être judicieuse. Quelques résultats préliminaires au laboratoire réalisés par FACS indiquent que les cellules  $\beta$  de rats témoins produisent plus d'ERO en présence de roténone (G. Lacraz, données personnelles).

6. Existe-t-il diverses manières "d'entraîner" la cellule  $\beta$  à développer une résistance au stress oxydant ?

La résistance au stress oxydant est un point central de la thérapie du DT2. Plus les stratégies antioxydantes opèrent tôt, meilleure sera l'issue contre la maladie. On sait aujourd'hui que, avant l'installation du diabète, des stratégies à base d'antioxydants pourraient ralentir (prévenir ?) l'évolution des états d'insulino-résistance et de gluco-intolérance en DT2 (*Paolisso et al., 1993a ; Paolisso et al., 1994a ; Paolisso et al., 1995 ; Velussi et al., 1997 ; De Mattia et al., 1998*). De notre point de vue, il pourrait être judicieux, chez des sujets détectés à risque, d'induire indirectement les défenses antioxydantes endogènes, en éduquant progressivement la cellule  $\beta$  elle-même à engendrer sa propre protection. Divers stimuli métaboliques sont envisageables. Comme nous l'avons vu, la restriction calorique (de 20 à 40%), à partir du moment où elle n'est pas associée à une malnutrition, améliore la santé et retarde les effets du vieillissement, y compris chez l'homme (*Meyer et al., 2006*). L'implication du métabolisme mitochondrial (et donc des ERO) est l'élément pivot des effets de la déprivation calorique sur la longévité, car le niveau de corrélation entre ces deux variables n'est pas nécessairement associé à la restriction calorique (*Zarse et al., 2007*). L'exercice physique modéré et régulier pourrait, bien sûr, montrer des effets prophylactiques au plan de la résistance au stress oxydant (*Hofer et al., 2008*).

## BIBLIOGRAPHIE

## A

Abdoulaye D, Wetzler S, Gubern M, Heliès JM, Fromentin G, Tomé D, Larue-Achagiotis C (2006). Comparison of energy balance in two inbred strains of rats: Fischer F344 prone to obesity and Lou rats resistant to obesity. *Physiol Behav* 87, 245–250.

Abraham NG, Kappas A (2008). Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 60, 79–127.

Affourtit C, Brand MD (2006). Stronger control of ATP/ADP by proton leak in pancreatic beta-cells than skeletal muscle mitochondria. *Biochem J* 393, 151–159.

Agarwal S, Sohal RS (1994). DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12332–12335.

Aikin R, Maysinger D, Rosenberg L (2004). Cross-talk between phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and c-jun NH2-terminal kinase mediates survival of isolated human islets. *Endocrinology* 145, 4522–4531.

Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274, 26071–26078.

Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 26071–26078.

Alliot J, Boghossian S, Jourdan D, Veyrat-Durebex C, Pickering G, Meynial-Denis D, Gaumet N (2002). The LOU/c/jall rat as an animal model of healthy aging? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, B312–B320.

Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus AN, Serup P, Dragsbaek MO, Mandrup-Poulsen T, Bonny C (2000). The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 49, 1468–1476.

Ammon HP, Hägele R, Youssif N, Eujen R, El-Amri N (1983). A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology* 112, 720–726.

Apostolakis S, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA (2008). IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6, 150–158.

Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM (1991). Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 5, 974–978.

Argoud K, Wilder SP, McAteer MA, Bihoreau MT, Ouali F, Woon PY, Wallis RH, Ktorza A, Gauguier D (2006). Genetic control of plasma lipid levels in a cross derived from normoglycaemic Brown Norway and spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetologia* 49, 2679–2688.

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Goubem M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 26, 435–439.

Atef N, Portha B, Penicaud L (1994). Changes in islet blood flow in rats with NIDDM. *Diabetologia* 37, 677–680.

Azevedo-Martins AK, Lortz S, Lenzen S, Curi R, Eizirik DL, Tiedge M (2003). Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 52, 93–101.

**B**

- Babior BM (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476.
- Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM (2005). Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 54, 2351–2359.
- Barazzone C, Horowitz S, Donati YR, Rodriguez I, Piguet PF (1998). Oxygen toxicity in mouse lung: Pathways to cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 573–581.
- Barja G (1993). Oxygen radicals, a failure or a success of evolution. *Free Radic Res Commun* 18, 63–70.
- Barja G (2002). The quantitative measurement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 34, 227–233.
- Barja G, Herrero A (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* 14, 312–318.
- Baur JA, Sinclair DA (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5, 493–506.
- Beauchamp C, Fridovich I (1970). A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243, 4641–4646.
- Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide superoxide and peroxynitrite: the good the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271, C1424–C1437.
- Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245–313.
- Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M (1986). Cytotoxicity of human p17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232, 1545–1547.
- Benhamou PY, Moriscot C, Richard MJ, Beatrix O, Badet L, Pattou F, Kerr-Conte J, Chroboczek J, Lemarchand P, Halimi S (1998). Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1093–1100.
- Benhamou PY, Moriscot C, Richard MJ, Beatrix O, Badet L, Pattou F, Kerr-Conte J, Chroboczek J, Lemarchand P, Halimi S (1998). Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* 41, 1093–1100.
- Bernard-Kargar C, Ktorza A (2001). Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes* 50 : S30–S35.
- Bernardi P, Petronilli V (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 28, 131–138.
- Bertera S, Crawford ML, Alexander AM, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Trucco M (2003). Gene transfer of manganese superoxide dismutase extends islet graft function in a mouse model of autoimmune diabetes. *Diabetes* 52, 387–393.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME (2005). Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E429–E438.
- Beyer RE (1990). The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic Biol Med* 8, 545–565.
- Beyer W, Imlay J, Fridovich I (1991). Superoxide dismutases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 40, 221–253.
- Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, Philipson LH (2003). Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278: 9796–9801.
- Bindoli A, Cavallini L, Jocelyn P (1982). Mitochondrial lipid peroxidation by cumene hydroperoxide and its prevention by succinate. *Biochim Biophys Acta* 681, 496–503.



- Bisbis S, Bailbé D, Tormo M-A, Picarel-Blanchot F, Derouet M, Simon J, Portha B (1993). Insulin resistance in the GK rat: decreased number but normal kinase of insulin receptor in the liver. *Am J Physiol* 265, E807–E813.
- Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F (2005). Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 511, 53–64.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and metaanalysis. *JAMA* 297, 842–857.
- Blander G, Guarente L (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417–435.
- Boghossian S, Veyrat-Durebex C, Alliot J (2000). Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats. *Physiol Behav* 69, 231–238.
- Bohlen HG, Lash JM (1993). Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol* 265, H219–225.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008). *J Clin Invest* 118, 789–800.
- Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6, 759–767.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM (2005). Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280, 17187–17195.
- Bors W, Heller W, Michel C, Satan M (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies, *Methods in Enzymology* 186, 343–355.
- Bouillaud F, Couplan E, Pecqueur C, Ricquier D, Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4 (2001). *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1504, 107–119.
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondria I generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707–716.
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617–630.
- Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V (1999). Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels. *Metabolism* 48, 319–323.
- Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC (2006). Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor- $\alpha$  is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* 55, 2974–2985.
- Brodie AE, Reed DJ (1987). Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 148, 120–125.
- Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Brownlee M (2003). A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112, 1788–1790.
- Bruce-Keller AJ, Umberger G, McFall R, Mattson MP (1999) *Ann Neurol* 45, 8–15.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004).

Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011–2015.

Bunnell E, Pacht ER (1993). Oxidized glutathione is increased in the alveolar fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 148, 1174–1178.

Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC, Butler PC (2004). Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1509–1516.

Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.

Butler J, Jayson GG, Swallow AJ (1975). The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 408, 215–222.

## C

Cadenas E, Boveris A (1980). Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J* 188, 31–37.

Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180, 248–257.

Cadenas E, Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222–230.

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 383, 933–943.

Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87, 840–844.

Cai JY, Jones DP (1998). Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273, 11401–11404.

Campbell IL, Cutri A, Wilson A, Harrison LC (1989). Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Immunol* 143, 1188–1191.

Candeias LP, Patel KB, M. R. L. Stratford & P. Wardman. 1993. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil derived species superoxide anion and HOCl. *FEBS Lett.* 333: 151–153.

Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, Bell E, Campbell D, Zhu Y, Young R, Trucco M, Markmann JF, Naji A, Wolf BA (2003). Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting  $\beta$ -cells. *Diabetes* 52, 2296–2303.

Capitanio N, Capitanio G, Demarinis DA, De Nitto E, Massari S, Papa S (1996). Factors affecting the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH. *Biochemistry* 35, 10800–10806.

Carlsson C, Borg LA, Welsh N (1999). Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140, 3422–3428.

Cartee GD, Dean, DJ (1994). Glucose transport with brief dietary restriction: heterogenous responses in muscles. *Am J Physiol* 266, E946–E952.

Casagrande S, Bonetto V, Fratelli M, Gianazza E, Eberini I, Massigna T, Salmona M, Chang G, Holmgren A, Ghezzi P (2000). Glutathiolation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Cell Mol Biol* 16, 162–170

Casteilla L, Rigoulet M, Pénicaud L (2001). Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* 52, 181–188.

- Ceballos I, Delabar JM, Nicole A, Lynch RE, Hallewell RA, Kamoun P, Sinet PM (1988). Expression of transfected human CuZn superoxide dismutase gene in mouse L cells and NS20Y neuroblastoma cells induces enhancement of glutathione peroxidase activity. *Biochim Biophys Acta* 949, 58–64.
- Cerasi E, Luft R (1963). Plasma-insulin response to sustained hyperglycemia induced by glucose infusion in human subjects. *Lancet* 2, 1359–1361.
- Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Ezsol Z, Tonutti L, Taboga C. (1998). Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and noninsulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 28, 329–333.
- Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, Tonutti L, Taboga C (1998). Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 21, 1529–1533.
- Ceriello A, Motz E (2004). Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 816–823.
- Ceriello A, Quagliario L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D (2002). Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51, 1076–1082.
- Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB (2001). Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50, 1302–1310.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527–605.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu M, Simon MC, Schumacker PT (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11715–11720.
- Chauvin C, De Olivera F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, Fontaine E (2001). Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* 276, 41394–41398.
- Chen D, Mauvais-Jarvis F, Bluher M, Fisher SJ, Jozsi A, Goodyear LJ, Ueki K, Kahn CR (2004). p50alpha/p55alpha phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* 24, 320–329.
- Chen H, Li X, Epstein PN (2005). MnSOD and catalase transgenes demonstrate that protection of islets from oxidative stress does not alter cytokine toxicity. *Diabetes* 54, 1437–1446.
- Chernyak BV (1997). Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Biosci Rep* 17, 293–302.
- Cheung MC, Zhao XQ, Chait A, Albers JJ, Brown BG (2001). Antioxidant supplements block the response of HDL to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1320–1326.
- Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5119–5123.
- Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY, and Kleeberger SR (2002). Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 175–182.
- Choe SS, Choi AH, Lee JW, Kim KH, Chung JJ, Park J, Lee KM, Park KG, Lee IK, Kim JB (2007). Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 56, 1534–1543.
- Ciccione M, Pestrichella V, Rossi O, Maiorano A, Modugno M, De Pergola G, Giorgino R, Rizzon P (1999). Oxidative stress is an early marker of endothelial dysfunction. *Clin Hemorheol Microcirc* 21, 341–342.

Cino M, Del Maestro RF (1989). Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys* 269, 623–638.

Civitaresse AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E; CALERIE Pennington Team (2007). Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* 4, e76.

Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, Cooper GJ, Holman RR, Turner RC (1988). Islet amyloid, increased alpha cells, reduced beta cells and exocrine fibrosis; quantitative changes in pancreas in type-2 diabetes. *Diabetes Res* 9, 151–160.

Clerch LB, Massaro D (1993). Tolerance of rats to hyperoxia: lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest* 91, 499–508.

Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54, S97–S107.

Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz ADN (1992). Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J* 6, 669–673.

Corbett JA, Kwon G, Marino MH, Rodi CP, Sullivan PM, Turk J, McDaniel ML (1996). Tyrosine kinase inhibitors prevent cytokine-induced expression of iNOS and COX-2 by human islets. *Am J Physiol* 270, C1581–C1587.

Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Cottet-Emard JM, Guigas B, Lavoie JM, Favier R (2004). Metabolic and hormonal responses to exercise in the anti-obese Lou/C rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 972–978.

Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM, Lavoie JM, Favier R (2002). Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res* 10, 188–195.

Cummings RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D (2004). Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 21749–21758.

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5134–5138.

Cuzzocrea S, Thiemermann C, Salvemini D (2004). Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr Med Chem* 11, 1147–1162.

## D

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A (2003). Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. *Free Radic Biol Med* 35, 1185–1193.

Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347, 444–445.

Darko D, Dorhnhorst A, Kelly FJ, Ritter JM, Chowienczyk PJ (2002). Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in type II diabetes. *Clin Sci* 103, 339–344.

Das KC, Lewis-Molock Y, White CW (1995). Thiol modulation of TNF- $\alpha$  and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biochem* 148, 45–57.

de Duve C (1995). *Vital Dust. Life as Cosmic Imperative*. New York, Basic Books, Harper-Collins.

De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, Balsano F (1998). Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47, 993–997.

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324, 1–18.

- DeFronzo RA (1999). Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 5, 177–269.
- Del Corso A, Vilardo PG, Cappiello M, Cecconi I, Dal Monte M, Barsacchi D, Mura U (2002). Physiological thiols as promoters of glutathione oxidation and modifying agents in protein S-thiolation. *Arch Biochem Biophys* 397, 392–398.
- Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P (2005). Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727–735.
- DeRubertis FR, Craven PA, Melhem MF, Salah EM (2004). Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide–nitric oxide interaction. *Diabetes* 53, 762–768.
- Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNFR1 : TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419–429.
- Diñçer Y, Akçay T, Alademir Z, Ilkova H (2002). Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat Res* 505, 75–81.
- Dionne KE, Colton CK, Yarmuch ML (1993). Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 42, 12–21.
- Dodane V, Chevalier J, Bariety J, Pratz J and Corman B (1991). Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest* 64, 377–391.
- Dolz M, Bailbé D, Giroix MH, Calderari S, Gangnerau MN, Serradas P, Rickenbach K, Irminger JC, Portha B (2005). Restitution of defective glucose-stimulated insulin secretion in diabetic GK rat by acetylcholine uncovers paradoxical stimulatory effect of  $\beta$ -cell muscarinic receptor activation on cAMP production. *Diabetes* 54, 3229–3237.
- Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A (1998). Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 21, 1736–1742.
- Donath MY, Ehses JA (2006). Type 1, type 1.5, and type 2 diabetes: NOD the diabetes we thought it was. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12217–12218.
- Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M (2005). Mechanisms of  $\beta$ -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes* 54, S108–S113.
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N (1999). Hyperglycemia induced  $\beta$ -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48, 738–744.
- Donath MY, Halban PA (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581–589.
- Donath MY, Storling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T (2003). Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med* 81, 455–470.
- DREAM Trial Investigators, Dagenais GR, Gerstein HC, Holman R, Budaj A, Escalante A, Hedner T, Keltai M, Lonn E, McFarlane S, McQueen M, Teo K, Sheridan P, Bosch J, Pogue J, Yusuf S (2002). Effects of Vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes. Results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 25, 1919–1927.
- Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, Leeuwenburgh C (2003). Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R474–480.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Cellular Physiol Rev* 82, 47–95.

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108, 1341–1348.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222–12226.

Du XL, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 112, 1049–1057.

Dubois M, Vacher P, Roger B, Huyghe D, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Pattou F, Moustaid-Moussa N, Lang J (2007). Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology* 148, 1605–1614.

## E

Ebelt H, Peschke D, Bromme HJ, Morke W, Blume R, Peschke E (2000). Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J Pineal Res* 28, 65–72.

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otín M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD (2003). A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J* 22, 4103–4110.

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99.

Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M (2001). Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active HC transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1416–1421.

Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M (2000). Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature* 408, 609–613.

Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, Berggren PO (1998). Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic -cells. A process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 273, 33501–33507.

Ehses JA, Calderari S, Irminger JC, Rickenbach K, Serradas S, Giroix M-H, Egli A, Portha B, Donath MY, Homo-Delarche F (2007b). Islet Inflammation in type 2 diabetes: from endothelial to beta-cell dysfunction. *Current Immunol Rev* 3, 216–232.

Ehses JA, Perren A, Eppler E, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, Ellingsgaard H, Schneider MKJ, Biollaz G, Fontana A, Reinecke M, Homo-Delarche F, Donath MY (2007a). Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356–2370.

Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E (2006). Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic  $\beta$ -cell mass and function. *International Journal Biochemistry and Cell Biology* 38, 689–695.

Elouil H, Cardozo AK, Eizirik DL, Henquin JC, Jonas JC (2005). High glucose and hydrogen peroxide increase c-Myc and haeme-oxygenase 1 mRNA levels in rat pancreatic islets without activating NF $\kappa$ B. *Diabetologia* 48, 496–505.

Emamaullee JA, Shapiro J (2006). Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes* 55, 1907–1914.

Ernster L, Dallner G (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1271, 195–204.

Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D (2002). Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans : role of oxidative stress. *Circulation* 106, 2067–2072.

- Essig DA, Nosek TM (1997). Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* 22, 409–428.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 13, 341–390
- Eto Y, Kang D, Hasegawa E, Takeshige K, Minakami S (1992). Succinate-dependent lipid peroxidation and its prevention by reduced ubiquinone in beef heart submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 295, 101–106.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2003). *Diabetes* 52, 1–8.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567, 1–61.
- Evans PJ, Halliwell B (1999). Free Radicals and Hearing: Cause, Consequence, and Criteria. *Ann N Y Acad Sci* 884, 19–40.
- Evans PJ, Tredger JM, Dunne JB, Halliwell B (1996). Catalytic metal ions and the loss of reduced glutathione in organ preservation fluids. *Transplantation* 62, 1046–1049.

## F

- Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD (2001). *Science* 292, 288–290.
- Facchini FS, Humphreys MH, DoNascimento CA, Abbasi F, Reaven GM. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols1-3. *AmJ Clin Nutr*, 2000, 72, 776–779.
- Facchini FS, Hua N, Abbasi F, Reaven GM (2001). Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3574–3578.
- Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LN, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F (2001). *Diabetes* 50, 1290–1301.
- Ferran C, Stroka DM, Badrichani AZ, Cooper JT, Wrighton CJ, Soares M, Grey ST, Bach FH (1998). A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood* 91, 2249–2258.
- Ferreira FM, Palmeira CM, Matos MJ, Seica R, Santos MS (1999b). Decreased susceptibility to lipid peroxidation of Goto-Kakizaki rats: relationship to mitochondrial antioxidant capacity. *Life Sci* 65, 1013–1025.
- Ferreira FM, Palmeira CM, Seica R, Moreno AJ, Santos MS (2003a). Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 214–222.
- Ferreira FM, Seica R, Oliveira PJ, Coxito PM, Moreno AJ, Palmeira CM, Santos MS (2003b). Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: role of coenzyme Q and cardiolipin contents. *Biochim Biophys Acta* 1639, 113–120.
- Ferreira FM, Seica R, Santos MS, Palmeira CM (1999). Age-related alterations in liver mitochondrial bioenergetics of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Acta Diabetol* 36, 173–177.
- Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, Tysoe SA, Wolosker H, Baranano DE, Dore S, Poss KD, Snyder SH (1999). Haeme oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1, 152–157.
- Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE (2001). B-Cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 50, 1021–1029.
- Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem* 274, 2225–2233.

- Fischer LJ, Hamburger SA (1980). Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. *Diabetes* 29, 213–216.
- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH (1993). The inactivation of FeS cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* 268, 22369–22376.
- Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P (1998). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 273, 12662–12668.
- Forman HJ, Azzi A (1997). On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *FASEB J* 11, 374–375.
- Frayon S, Pessah M, Giroix MH, Mercan D, Boissard C, Malaisse WJ, Portha B, Garel JM (1999). Gaolf identification by RT-PCR in purified normal pancreatic  $\beta$  cells and in islets from rat models of non-insulin dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Com* 254, 269–272.
- Fridovich I (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875–880.
- Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase's. *Annu Rev Biochem* 64, 97–112.
- Friesen NT, Büchau AS, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H (2004). Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia* 47, 676–685.
- Frisard M, Ravussin E (2006). Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. *Endocrine* 29, 27–32.
- Fukui T, Noma T, Mizushige K, Aki Y, Kimura S, Abe Y. Dietary troglitazone decreases oxidative stress in early stage type II diabetic rats. *Life Sci*, 2000, 66, 2043–2049.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114, 1752–1761.

## G

- Gabbay KH, Merola LO, Field RA (1966). Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 151, 209–210.
- Gandy SE, Buse MG, Crouch RK (1982). Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. *J Clin Invest* 70, 650–658.
- Garait B, Couturier K, Servais S, Letexier D, Perrin D, Batandier C, Rouanet JL, Sibille B, Rey B, Lerverve X, Favier R (2005). Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *Free Radic Biol Med* 39, 1249–1261.
- Garcia Soriano F, Virág L, Jagtap P, Szabó E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabó C (2001). Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 7, 108–113.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505, 364–368.
- George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA, Murgatroyd PR, Williams RM, Acerini CL, Dunger DB, Barford D, Umpleby AM, Wareham NJ, Davies HA, Schafer AJ, Stoffel M, O'Rahilly S, Barroso I (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 304, 1325–1328.
- Gepts W (1957). Contribution to the morphological study of the islands of Langerhans in diabetes; study of the quantitative variations of the different insular constituents. *Ann Soc R Sci Med Nat Brux* 10, 5–108.



- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ . *EMBO J* 26, 1913–1923.
- Geutskens SB, Otonkoski T, Pulkkinen MA, Drexhage HA, Leenen PJ (2005). Macrophages in the murine pancreas and their involvement in fetal endocrine development in vitro. *J Leukoc Biol* 78, 845–852.
- Gille L, Schott-Ohly P, Friesen N, Schulte im Walde S, Udilova N, Nowl H, Gleichmann H (2002). Generation of hydroxyl radicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro. *Pharmacol Toxicol* 90, 317–326.
- Giroix M-H, Sener A, Bailbe D, Leclercq-Meyer V, Portha B, Malaisse WJ (1993c). Metabolic, ionic, and secretory response to D-glucose in islets from rats with acquired or inherited noninsulin-dependent diabetes. *Biochem Med Metab Biol* 50, 301–321.
- Giroix M-H, Sener A, Portha B, Malaisse WJ (1993a). Preferential alteration of oxidative relative to total glycolysis in pancreatic islets of two rat models of inherited or acquired type 2 (noninsulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 305–309.
- Giroix M-H, Vesco L, Portha B (1993b). Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinology* 132, 815–822.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19, 257–267.
- Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F (1997). Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 95, 1783–1790.
- Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J (1995). Plasma 8-epi-PGF<sub>2</sub> levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 368, 225–229.
- Gopaul NK, Manraj MD, Hébé A, Lee Kwai Yan S, Johnston A, Carrier MJ, Anggård EE (2001). Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia* 44, 706–712.
- Goto Y, Kakizaki M, Masaki N (1975). Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad* 51, 80–85.
- Goto Y, Suzuki K-I, Sasaki M, Ono T, Abe S (1988). GK rat as a model of nonobese, noninsulindependent diabetes. Selective breeding over 35 generations. In: Shafir E, Renold AE (ed.) *Lessons from Animal Diabetes*. Libbey, London, pp. 301–303.
- Grankvist K, Marklund S, Sehlin J, Täljedal I (1979). Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of Alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochem J* 182, 17–25.
- Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB (1981a). CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199, 393–398.
- Grankvist K, Marklund S, Täljedal IB (1981b). Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. *Nature* 294, 158–160.
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476–1481.
- Gredilla R, Barja G (2005). Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146, 3713–3717.
- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G (2001). Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 15, 1589–1591.

- Green K, Brand MD, Murphy MP (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53, S110–S118.
- Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C (1999). A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. *J Exp Med* 190, 1135–1146.
- Griffith OW, Mulcahy RT (1999). The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73, 209–267.
- Grivennikova VG, Vinogradov AD (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1757, 553–561.
- Guidot DM, Repine JE, Kitlowski AD, Flores SC, Nelson SK, Wright RM & McCord JM (1995). Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *J Clin Invest* 96, 1131–1136.
- Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng YH, Roberson RS, Ricordi C, O'Connell PJ, Gonzalez FJ, and Kahn CR (2005). Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337–349.
- Gutteridge JMC, Halliwell B (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. *Ann N Y Acad Sci* 899, 136–47.
- Gutteridge JMC (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 19, 141–158.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2002). Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus. *Circulation* 105, 1656–1662.

## H

- Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, Giacca A, Fantus IG (2003). N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E744–753.
- Haddad JJ, Olver RE, Land SC (2000). Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* 275, 21130–21139.
- Halliwell B (1990). How to characterise a biological antioxidant. *Free Rad Res Commun* 9, 1–32.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 1609–1623.
- Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 52, 253–265.
- Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721–724.
- Halliwell B (1996). Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad Res* 25, 275–283.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1–14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods Enzymol* 186, 1–85.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford Univ. Press. Oxford.
- Ham AJ, Liebler DC (1995). Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. *Biochemistry* 34, 5754–5761.
- Hamilton MT, Hamilton DG, Zderic TW (2007). The role of low energy expenditure and sitting on obesity, metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes*. 56, 2655–2667.

- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003). Voltagedependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 278, 5557–5563.
- Hansen JM, Go YM, Jones DP (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 215–234.
- Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 29, 89–95.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, Oseid EA, Hunter-Berger KK, Robertson RP (1999). In vivo prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. *Diabetes* 48, 1995–2000.
- Harper JM, Salmon AB, Chang Y, Bonkowski M, Bartke A, Miller RA (2006). *Mech Ageing Dev* 127, 687–694.
- Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Hatazaki M, Hazama Y, Hori M (2003). Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26, 458–463.
- Hayes JD, McLellan LI (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, 273–300.
- Heffner, JE, Repine JE (1989). Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 140, 531–554.
- Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard MI, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J, Nguyen T, Martin CK, Volaufova J, Most MM, Greenway FL, Smith SR, Deutsch WA, Williamson DA, Ravussin E; Pennington CALERIE Team (2006). Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals: a randomized controlled trial. *JAMA* 295, 1539–1548.
- Heitmeier MR, Arnush M, Scarim AL, Corbett JA (2001). Pancreatic  $\beta$ -cell damage mediated by  $\alpha$ -cell production of interleukin-1. A novel mechanism for virus-induced diabetes. *J Biol Chem* 276, 11151–11158.
- Héliès JM, Diane A, Langlois A, Larue-Achagiotis C, Fromentin G, Tomé D, Mormède P, Marissal-Arvy N (2005). Comparison of fat storage between Fischer 344 and obesity-resistant Lou/C rats fed different diets. *Obes Res* 13, 3–10.
- Hellerström C (1984). The life story of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetologia* 26, 393–400.
- Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000). Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28, 1456–1462.
- Henson PM, Vandivier RW (2006). The matrix degrades, neutrophils invade. *Nat Med* 12, 280–281.
- Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E (1996). Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J Nutr* 126, 1213S–1220S.
- Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, Gitelman SE, Harlan DM, Xu D, Zivin RA, Bluestone JA (2002). Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346, 1692–1698.
- Hibbs JB, Jr., Westenfelder C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menlove RL, McMurry MP, Kushner JP (1992). Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 89, 867–877.
- Hodgson JM, Watts GF, Playford DA, Burke V, Croft KD (2002). Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* 56, 1137–1142.

- Hofer T, Fontana L, Anton SD, Weiss EP, Villareal D, Malayappan B, Leeuwenburgh C (2008). Long-term effects of caloric restriction or exercise on DNA and RNA oxidation levels in white blood cells and urine in humans. *Rejuvenation Res* 11, 793–799.
- Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB (1998). Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1-induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest* 101, 1811–1820.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Géloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421, 182–187.
- Homo-Delarche F, Drexhage HA (2004). Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes. *Trends Immunol* 25, 222–229.
- Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger JC, Gangnerau MN, Coulaud J, Rickenbach K, Dolz M, Halban P, Portha B, Serradas P (2006). Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes* 55, 1625–1633.
- Homo-Delarche F, Giroix M-H, Lacraz G, Calderari S, Cornut M, Ehses JA, Schmidlin F, Coulaud J, Gangnereau M-N, Serradas P, Irminger J-C (2008). The prediabetic period is characterized by islet microangiopathy in the Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 51, S308.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB, Rhee SJ (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 340, 107–115.
- Hoorens A, Van de Castele M, Kloppel G, Pipeleers D (1996). Glucose promotes survival of rat pancreatic cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 98, 1568–1574.
- Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, Miyazaki J (1998). Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med* 188, 1445–1451.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944–948.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191–196.
- Hu FB, Sigal RJ, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Speizer FE, Manson JE (1999). Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women : a prospective study. *JAMA* 282, 1433–1439.
- Hughes SJ, Faehling M, Thorneley CW, Proks P, Ashcroft FM, Smith PA (1998). Electrophysiological and metabolic characterization of single beta cells and islets from diabetic GK rats. *Diabetes* 47, 73–81.
- Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R (2003). Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 144, 1444–1455.
- Hulbert AJ (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 234, 277–288.
- Hutter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabol R, Dela F & Jansen-Durr P (2007). Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* 6, 245–256.

**I**

Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y (1999). Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 927–932.

Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S, Miyawaki K, Ban N, Adachi T, Kuroe A, Iwakura T, Kubota A, Hiai H, Seino Y (2000). Antioxidant alpha-tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. *FEBS Lett* 473, 24–26.

Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 240, 640–642.

Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R (2006). Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell* 5, 97–108.

Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, Bonaldo P (2003). Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet* 35, 367–371.

Ishikawa K, Navab M, Leitinger N, Fogelman AM, Lusis AJ (1997). Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest* 100, 1209–1216.

Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renstrom E, Schuit FC (2005). Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54, 2132–2142.

**J**

Janjic D, Maechler P, Sekine N, Bartley C, Annen AS, Wolheim CB (1999). Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem Pharmacol* 57, 639–648.

Jansson L, Eizirik DL, Pipeleers DG, Borg LA, Hellerstrom C, Andersson A (1995). Impairment of glucose-induced insulin secretion in human pancreatic islets transplanted to diabetic nude mice. *J Clin Invest* 96, 721–726.

Jia D, Taguchi M, Otsuki M (2005). Synthetic protease inhibitor camostat prevents and reverses dyslipidemia, insulin secretory defects, and histological abnormalities of the pancreas in genetically obese and diabetic rats. *Metabolism* 54, 619–627.

Jonas JC, Guiot Y, Rahier J, Henquin JC (2003). Haeme-oxygenase 1 expression in rat pancreatic beta cells is stimulated by supraphysiological glucose concentrations and by cyclic AMP. *Diabetologia* 46, 1234–1244.

Jonas JC, Laybutt DR, Steil GM, Trivedi N, Pertusa JG, Van de Casteele M, Weir GC, Henquin JC (2001). High glucose stimulates early response gene c-Myc expression in rat pancreatic  $\beta$  cells. *J Biol Chem* 276, 35375–35381.

Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC (1999). Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274, 14112–14121.

**K**

Kahn SE (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4047–4058.

Kajimoto Y, Kaneto H (2004). Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1011, 168–176.

Kajimoto Y, Matsuoka T, Kaneto H, Watada H, Fujitani Y, Kishimoto M, Sakamoto K, Matsuhisa M, Kawamori R, Yamasaki Y, Hori M (1999). Induction of glycation suppresses glucokinase gene expression in HIT-T15 cells. *Diabetologia* 42, 1417–1424.

- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* 120, 649–661.
- Kanauchi M, Nishioka H, Hashimoto T (2002). Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy. *Nephron* 91, 32732–32739.
- Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Makamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Taniguchi N (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 320, 855–863.
- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48, 2398–2406.
- Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC (2001). *J Biol Chem* 276, 31099–31104.
- Kappeler L, Zizzari P, Alliot J, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2004). Delayed age-associated decrease in growth hormone pulsatile secretion and increased orexigenic peptide expression in the Lou C/JaLL rat. *Neuroendocrinology* 80, 273–283.
- Kaur H, Halliwell B (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 350, 9–12.
- Kaur H, Whiteman M, Halliwell B (1997). Peroxynitrite-dependent aromatic hydroxylation and nitration of salicylate. Is hydroxyl radical involved? *Free Rad Res* 26, 71–82.
- Kefas BA, Heimberg H, Vaulont S, Meisse D, Hue L, Pipeleers D, Van de Castele M (2003). AICA-riboside induces apoptosis of pancreatic beta cells through stimulation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 46, 250–254.
- Kelley DE, Wing R, Buonocore C, Sturis J, Polonsky K, Fitzsimmons M (1993). Relative effects of calorie restriction and weight loss in non insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1287–1293.
- Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, Schandene L, Crenier L, De BC, Seigneurin JM, De PP, Pierard D, Weets I, Rebello P, Bird P, Berrie E, Frewin M, Waldmann H, Bach JF, Pipeleers D, Chatenoud L (2005). Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352, 2598–2608.
- Keyse SM, Tyrrell RM (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 99–103.
- Kinsky N (1989). Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad Biol Med* 7, 617–635.
- Klöpffel G, Mattias L, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4, 110–125.
- Koh G, Suh KS, Chon S, Oh S, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS (2005). Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage in pancreatic  $\beta$ -cells. *Arch Biochem Biophys* 438, 70–79.
- Kolesnick R, Golde DW (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 77, 325–328.
- Konrad T, Vicini P, Kusterer K, Höflich A, Assadkhani A, Böhles HJ, Sewell A, Tritschler HJ, Cobelli C, Usadel KH (1999). Alpha-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22, 280–287.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15–18.

- Kowluru RA, Kennedy A (2001). Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs* 10, 1665–1676.
- Kralik PM, Xu B, Epstein PN (1998). Catalase transfection decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line. *Endocr Res* 24, 79–87.
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 248–261.
- Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St Pierre J, Grey ST, Lowell BB (2003). Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112, 1831–1842.
- Krebs M, Brunmair B, Brehm A, Artwohl M, Szendroedi J, Nowotny P, Roth E, Fürnsinn C, Promintzer M, Anderwald C, Bischof M, Roden M (2007). The Mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes*. 56, 1600–1607.
- Krikos A, Laherty CD, Dixit VM (1992). Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267, 17971–17976.
- Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G (1999). Interference of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol (Lond)* 514, 471–481.
- Krippeit-Drews P, Lang F, Haussinger D, Drews G (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 426, 552–554.
- Kristal BS, Matsuda M, Yu BP (1996). Abnormalities in the mitochondrial permeability transition in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 222, 519–523.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60, 619–642.
- Kubisch HM, Wang J, Bray TM, Phillips JP (1997). Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress. *Diabetes* 46, 1563–1566.
- Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ, Phillips JP (1994). Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9956–9959.
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279, 4127–4135.
- Kuehl Jr FA, Egan RW (1980). Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* 210, 978–984.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 278, 8135–8145.
- Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, Schaffer JE, McDaniel ML (2004). cAMP dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 279, 8938–8945.

**L**

- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127, 1109–1122.
- Laight DW, Desai KM, Änggard EE, Carrier M (2000). Endothelial dysfunction accompanies a pro-oxidant, pro-diabetic challenge in the insulin resistant, obese Zucker rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 402, 95–99.
- Lammert E, Cleaver O, Melton D (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564–567.

- Lander HM (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11, 118–124.
- Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493–497.
- Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, Viguerie-Bascands N, Levi-Meyrueis C, Fleury C, Pecqueur C, Nibbelink M, André M, Casteilla L, Ricquier D (1997). *Biochem Biophys Res Commun* 235, 760–764.
- Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Volund A, Eshes JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY (2007). Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356, 1517–1526.
- Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, Sohal RS (1998). Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med* 25, 1089–1097.
- Lautier D, Luscher P, Tyrrell RM (1992). Endogenous glutathione levels modulate both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inducible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis* 13, 227–232.
- Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG (1994). Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5987–5991.
- Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, Weir GC (2003). Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time: adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. *J Biol Chem* 278, 2997–3005.
- Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, and Weir GC (2002b). Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51, 413–423.
- Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC (2002a). Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem* 277, 10912–10921.
- Leahy JL (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36, 197–209.
- Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M, Diehl AM (1999). Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology* 29, 677–687.
- Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084–2090.
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20, 463–466.
- Lepore DA, Shinkel TA, Fiscaro N, Mysore TB, Johnson LE, d'Apice AJ, Cowan PJ (2004). Enhanced expression of glutathione peroxidase protects islet beta cells from hypoxia-reoxygenation. *Xenotransplantation* 11, 53–59.
- Leverve XM (2007). Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med* 35, S454–S460
- Leverve XM, Fontaine E (2001). Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52, 221–229.
- Leverve XM, Guigas B, Detaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E, Wiernsperger NF (2003). Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab* 29, 6S88–6S94.
- Levine RL (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 790–796.
- Li LX, Skorpen F, Egeberg K, Hals-Jorgensen I, Grill V (2001). Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 273–277.



- Li N, Karin M (1999). Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress ? *FASEB J* 13, 1137–1143.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479–489.
- Li T, Shi MM, Forman HJ (1997). Increased transcription of the regulatory subunit of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in rat lung epithelial L2 cells exposed to oxidative stress or glutathione depletion. *Arch Biochem Biophys* 342, 126–133.
- Li X, Chen H, Epstein PN (2006). Metallothionein and catalase sensitize to diabetes in nonobese diabetic mice. Reactive oxygen species may have a protective role in pancreatic beta cells. *Diabetes* 55, 1592–1604.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ (2003). Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates cell apoptosis. *J Biol Chem* 278, 471–478.
- Lin, S.J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.A., Culotta, V.C., Fink, G.R., and Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344–348.
- Lindenboim L, Haviv R, Stein R (1995). Inhibition of drug-induced apoptosis by survival factors in PC 12 cells. *J Neurochem* 64, 1054–1063.
- Ling Z, Pipeleers DG (1996). Prolonged exposure of human beta cells to elevated glucose levels results in sustained cellular activation leading to a loss of glucose regulation. *J Clin Invest* 98, 2805–2812.
- Ling ZC, Efendic S, Wibom R, Abdel-Halim SM, Ostenson CG, Landau BR, Khan A (1998). Glucose metabolism in Goto-Kakizaki rat islets. *Endocrinology* 139, 2670–2675.
- Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE (2001). *J Biol Chem* 276, 14890–14895.
- Lithgow GJ, White TM, Hinerfeld DA, Johnson TE (1994). *J Gerontol* 49, B270–B276.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147–157.
- Longo VD, Finch CE (2003). *Science* 299, 1342–1346.
- Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996). *J Biol Chem* 271, 12275–12280.
- Lopez-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G (2002). Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32, 882–889.
- Lortz S, Tiedge M (2003). Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* 34, 683–688.
- Lortz S, Tiedge M, Nachtwey T, Karlsten AE, Nerup J, Lenzen S (2000). Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes* 49, 1123–1130.
- Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M, Soleti A, Filipponi F, Mosca F, Boggi U, Del Prato S, Masiello P, Marchetti P (2007). Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes Metab* 33, 340–345.

## M

- Maclean N, Ogilvie R (1955). Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* 4, 367–376.
- Maechler P, Jornot L, Wollheim CB (1999). Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274, 27905–27913.

- Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (2003). Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52, 726–733.
- Maedler K, Schumann DM, Schulthess F, Oberholzer J, Bosco D, Berney T, and Donath MY (2006). Aging correlates with decreased betacell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: a potential role for Fas and pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 55, 2455–2462.
- Maedler K, Sergeev P, Ehses JA, Mathe Z, Bosco D, Berney T, Dayer JM, Reinecke M, Halban PA, Donath MY (2004). Leptin modulates cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8138–8143.
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY (2002). Glucose-induced cell production of IL-1 contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110, 851–860.
- Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50, 69–76.
- Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY (2001). Glucose induces  $\beta$ -cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50, 1683–1690.
- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, and Goldstein BJ (2001). Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* 276, 21938–21942.
- Maiese K, Morhan SD & Chong ZZ (2007). Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res* 4, 63–71.
- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers D (1982). Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 927–930.
- Malik VS, Schulze MB, Hu FB (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 84, 274–288.
- Mandrup-Poulsen T (2001).  $\beta$ -cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes* 50, S58–S63.
- Manini TM, Everhart JE, Patel KV, Schoeller DA, Colbert LH, Visser M, Tylavsky F, Bauer DC, Goodpaster BH, Harris TB (2006). Daily activity energy expenditure and mortality among older adults. *JAMA* 296, 171–179.
- Manzella D, Barbieri M, Ragno E, Paolisso G (2001). Chronic administration of pharmacologic doses of vitamin E improves the cardiac autonomic nervous system in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 73, 1052–1057.
- Marchetti P, Bugliani M, Lupi R, Marselli L, Masini M, Boggi U, Filipponi F, Weir GC, Eizirik DL, Cnop M (2007). The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50, 2486–2494.
- Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S (2004). Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5535–5541.
- Marfella R, Quagliaro L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D (2001). Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest* 108, 635–636.
- Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83–95.
- Marshak S, Leibowitz G, Bertuzzi F, Socci C, Kaiser N, Gross DJ, Cerasi E, Melloul D (1999). Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48, 1230–1236.
- Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stange G, Van De Casteele M, Pipeleers D (2005). Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 280, 20389–20396.

- Martin MU, Wesche H (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1592, 265–280.
- Masiello P (2006). Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic beta-cell mass. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 873–893.
- Masoro EJ (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35, 299–305.
- Masoro EJ (2006). Dietary restriction-induced life extension: a broadly based biological phenomenon. *Biogerontology* 7, 153–155.
- Mathews C, Leiter E (1999b). Resistance of ALR/Lt islets to free radical mediated diabetogenic stress is inherited as a dominant trait. *Diabetes* 48, 2189–2196.
- Mathews CE, Bagley R, Leiter EH (2004). ALS/Lt: a new type 2 diabetes mouse model associated with low free radical scavenging potential. *Diabetes* 53 S125–S129.
- Mathews CE, Leiter EH (1999a). Constitutive differences in antioxidant defense status distinguish alloxan-resistant and alloxan-susceptible mice. *Free Radic Biol Med* 27, 449–455.
- Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, Iannacone M, Accili D, Cantley LC, Kahn CR (2002). Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest* 109, 141–149.
- Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, LeGuen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH (1997). Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 34, 638–644.
- McCord JM, Fridovich I (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radic Biol Med* 5, 363–369.
- McCurdy CE, Davidson RT, Cartee GD (2005). Calorie restriction increases the ratio of phosphatidylinositol 3-kinase catalytic to regulatory subunits in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E996–1001.
- Mellado-Gil JM, Aguilar-Diosdado M (2004). High glucose potentiates cytokine and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. *J Endocrinol* 183, 155–162.
- Merry BJ (2000). Calorie restriction and age-related oxidative stress. *Ann NY Acad Sci* 908, 180–198.
- Merry BJ (2002). Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1340–1354.
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle PA (1993). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 12, 2005–2015.
- Meyer TE, Kovács SJ, Ehsani AA, Klein S, Holloszy JO, Fontana L (2006). Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J Am Coll Cardiol* 47, 398–402.
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG (1999). *Nature* 402, 309–313.
- Mihm MJ, Jing L, Bauer JA (2000). Nitrotyrosine causes selective vascular endothelial dysfunction and DNA damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 36, 182–187.
- Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH (2007). Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450, 712–716.
- Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, Perrella MA, Mitsialis SA, Kourembanas S (2001). Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8798–8803.

- Mine T, Miura K, Okutsu T, Mitsui A, Kitahara Y (2004). Gene expression profile in the pancreatic islets of Goto-Kakizaki (GK) rats with repeated postprandial hyperglycemia. *Diabetes* 53, S2475A.
- Mitchell P (1977). Vectorial chemiosmotic processes. *Annu Rev Biochem* 46, 996–1005.
- Modak MA, Datar SP, Bhonde RR, Ghaskadbi SS (2007). Differential susceptibility of chick and mouse islets to streptozotocin and its co-relation with islet antioxidant status. *J Comp Physiol* 177, 247–257.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *JAMA* 289, 76–79.
- Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002–2012.
- Moncada S, Palmer RM (1991). Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by glucocorticoids: yet another explanation for their anti-inflammatory effects? *Trends Pharmacol Sci* 12, 130–131.
- Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Reunanen A (2004). Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 362–366.
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, Pypaert M, Shulman GI (2005). Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115, 3587–3593.
- Moriscot C, Pattou F, Kerr-Conte J, Richard MJ, Lemarchand P, Benhamou PY (2000). Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islets and INS-1 insulin-secreting cells. *Diabetologia* 43, 625–631.
- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd (1995). Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub>-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 332, 1198–1203.
- Movassat J, Portha B (1999).  $\beta$ -cell growth in the neonatal Goto-Kakizaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia* 42, 1098–1106.
- Movassat J, Saulnier C, Serradas P, Portha B (1997). Impaired development of pancreatic  $\beta$ -cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 40, 916–925.
- Mukai K, Morimoto H, Okaiuchi Y, Nagaoka S (1993). Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. *Lipids* 28, 753–756.
- Mullenbach GT, Tabrizi A, Irvine BD, Bell GI, Tainer JA, Halliwell RA (1988). Selenocysteine's mechanism of incorporation and evolution revealed in cDNAs of three glutathion peroxidases. *Protein Eng* 2, 239–246.
- Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cochemé HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RAJ, Brand MD (2003). Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation—studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from  $\alpha$ -Phenyl-N-Tert-Butylnitron. *J Biol Chem* 278, 48534–48545.
- Mysore TB, Shinkel TA, Collins J, Salvaris EJ, Fiscaro N, Murray-Segal LJ, Johnson LE, Lepore DA, Walters SN, Stokes R, Chandra AP, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Cowan PJ (2005). Overexpression of glutathione peroxidase with two isoforms of superoxide dismutase protects mouse islets from oxidative injury and improves islet graft function. *Diabetes* 54, 2109–2116.

## N

- Nakazaki M, Kakei M, Koriyama N, Tanaka H (1995). Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 44, 878–883.
- Negre-Salvayre A, Augé N, Duval C, Robbesyn F, Thiers JC, Nazzari D, Benoist H, Salvayre R (2002). Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol* 352, 62–71.

- Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L (1997). *FASEB J* 11, 809–815.
- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Fertans VJ, Finkel T (2000). Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20, 7311–7318.
- Nicholls DG (2006). The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1757, 459–466.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorck MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790.
- Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, Sonoda K, Senokuchi T, Matsuo T, Kukidome D, Wake N, Matsumura T, Miyamura N, Sakakida M, Kishikawa H, Araki E (2003). Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26, 1507–1512.
- Niskanen LK, Salonen JT, Nyssönen K, Uusitupa MIJ (1995). Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabetic Medicine* 12, 802–808.
- Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM (2001). Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J Biol Chem* 276, 46104–46110.
- Nohl H, Hegner D (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo. *Eur J Biochem* 82, 563–567.
- Nomikos IN, Wang Y, Lafferty KJ (1989). Involvement of O<sub>2</sub> radicals in 'autoimmune' diabetes. *Immunol Cell Biol* 67, 85–87.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP (1995). Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 44, 1054–1058.

## O

- O'Neill LA (2006). How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18, 3–9.
- Oberley LW (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 5, 113–124.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Eagle AR, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A (2007). Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120.
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA* 295, 1549–1555.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2002). Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9010–9014.
- Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR (1999). Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 276, C507–C510.
- Oliveira PJ, Seica R, Santos DL, Rolo AP, Sardao VA, Ferreira FM, Palmeira CM, Santos MS, Moreno AJ (2004). Vitamin E or coenzyme Q10 administration is not fully advantageous for heart mitochondrial function in diabetic Goto Kakizaki rats. *Mitochondrion* 3, 337–345.
- Olson LK, Qian J, Poitout V (1998). Glucose rapidly and reversibly decreases insulin gene transcription in INS-1 cells via decrements in binding activity of STF-1 and C-1 activator. *Mol Endocrinol* 12, 207–219.
- Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP (1993). Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 92, 514–519.

Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CVE, Towle HC, Robertson RP, Stein R (1995). Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9127–9131.

Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S (1999). Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 48, 1414–1417.

Ostergaard H, Tachibana C, Winther JR (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J Cell Biol* 166, 337–345.

## P

Packer L (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 53 1050S-1055S.

Palmeira CM, Santos DL, Seça R, Moreno AJ, Santos MS (2001). Enhanced mitochondrial testicular antioxidant capacity in Goto-Kakizaki diabetic rats: role of coenzyme Q. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1023–C1028.

Palmer RM, Ferrige JAG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.

Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169–183.

Paolisso G, Balbi V, Volpe C, Varricchio G, Gambardella A, Saccomanno F, Ammendola S, Varricchio M, D'Onofrio F (1995). Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. *J Am Coll Nutr* 14, 387–392.

Paolisso G, D'Amore A, Balbi V, Volpe C, Galzerano D, Giugliano D, Sgambato S, Varricchio M, D'Onofrio F (1994a) Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* 266, E261–E268.

Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F (1993a). Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulindependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 57, 650–656.

Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F (1994b). Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism* 43, 1426–1429.

Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F (1993b). Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 16, 1433–1437.

Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E (1995). A high concentration of fasting plasma nonesterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38, 1213–1217.

Pascal SM, Guiot Y, Pelengaris S, Khan M, Jonas JC (2008). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E92–E102.

Pearl R (1928). *The Rate of Living, Being an Account of Some Experimental Studies on the Biology of Life Duration* (New York: Alfred A. Knopf).

Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouielaud F, Miroux B (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276, 8705–8712.

Peng J, Jones GL, Watson K (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med* 28, 1598–1606.

- Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW (2001). A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest* 107, 853–860.
- Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP (2003). Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* 31, 1312–1315.
- Perrin D, Soulage C, Pequignot JM, Geloën A (2003). Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 46, 1489–1496.
- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004). Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350, 664–671.
- Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ, Hagen TM (2008). Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life* 60, 362–367.
- Peterside IE, Selak MA, Simmons RA (2003). Impaired oxidative phosphorylation in hepatic mitochondria of growth retarded rats alters glucose metabolism. *Am J Physiol* 285, E1258–E1264.
- Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F (2001). The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* 276, 12030–12034.
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56, 1783–1791.
- Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP (2003). Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* 290, 234–245.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429, 771–776.
- Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky K (1998). Role of apoptosis in failure of  $\beta$ -cell mass compensation for insulin resistance and  $\beta$ -cell defects in the male Zucker diabetes fatty rat. *Diabetes* 47, 358–364.
- Pigeolet E, Remacle J (1991). Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free Rad Biol Med* 11, 191–195.
- Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L (2001). Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 50, 1983–1991.
- Pino MF, Ye DZ, Linning KD, Green CD, Wicksteed B, Poitout V, Olson LK (2005). Elevated glucose attenuates human insulin gene promoter activity in INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells via reduced nuclear factor binding to the A5/core and Z element. *Mol Endocrinol* 19, 1343–1360.
- Pipelleers DG, in 't Veld PA, Pipeleers-Marichal MA, Gepts W, van de Winkel M (1987). Presence of pancreatic hormones in islet cells with MHC-class II antigen expression. *Diabetes* 36, 872–876.
- Piquet MA, Fontaine E, Sibille B, Filippi C, Keriél C, Leverve XM (1996). *Biochem J* 317, 667–674.
- Piquet MA, Nogueira V, Devin A, Sibille B, Filippi C, Fontaine E, Roulet M, Rigoulet M, Leverve XM (2000). *FEBS Lett* 468, 239–242.
- Piro S, Anello M, Di Pietro C, Lizzio MN, Patanè G, Rabuazzo AM, Vigneri R, Purrello M, Purrello F (2002). Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism* 51, 1340–1347.
- Pobezhimova TP, Voinikov VK (2000). Biochemical and physiological aspects of ubiquinone function. *Membr Cell Biol* 13, 595–602.

Poitout V, Olson LK, Robertson RP (1996) Chronic exposure of TC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE-3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest* 97, 1041–1046.

Poitout V, Robertson RP (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29, 351–366.

Portha B (2003). Transmitted beta-cell dysfunction as a cause for type 2-diabetes. *Med Sci (Paris)* 19, 847–853.

Portha B (2005). Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diabetes Metab Res Rev* 21, 495–504.

Portha B, Giroix M-H, Serradas PP, Gangnerau MN, Movassat J, Rajas F, Bailbé D, Plachot C, Mithieux G, Marie JC (2001). Beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat. Information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50, 89–93.

Portha B, Lacraz G, Dolz M, Giroix MH, Homo-Delarche F, Movassat J (2007). Defective functional  $\beta$ -cell mass and type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2, 785–795.

Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix M-H, Bailbé D, Gangnerau M-N, Dolz M, Turrel-Cuzin C, Movassat J. The GK rat  $\beta$ -cell: a prototype for diseased human beta cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol* (sous presse).

Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R (2002). Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in  $\beta$ -cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51, S405–S413.

Puppo A, Halliwell B (1988). Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J* 249, 185–190.

Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296, 295–309.

## R

Rabinovitch A (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 14, 129–151.

Rachek LI, Musiyenko SI, LeDoux SP, Wilson GL (2007). Palmitate induced mitochondrial deoxyribonucleic acid damage and apoptosis in I6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 148, 293–299.

Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD (2008) Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8215–8220.

Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC (1983). Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24, 366–371.

Rahier J, Guiot Y, Sempoux C. Diabète de type 2 et déficit des cellules B (2004). In : Selam JL, ed. *Journées annuelles de diabétologie de l'Hôtel-Dieu*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 15–20.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 344, 254–257.

Ramsey JJ, Harper ME, Weindruch R (2000). Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 946–968.

Rattan SI (2001). Applying hormesis in aging research and therapy. *Hum Exp Toxicol* 20, 281–285.

Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD (1988) Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37, 1020–1024.



- Reaven, G.M. 2005. The insulin resistance syndrome : definition and dietary approaches to treatment. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 391–406.
- Redox Signalling in Human Disease and Ageing, Catholic University, Rome, Italy, 20 to 23 April 2006 (EMBO Conference Series 2006).
- Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Moller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B (1999) Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 448, 120–122.
- Rhee SG (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312, 1882–1883.
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA (2005). Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr Opin Cell Biol* 17, 183–189.
- Rhodes CJ (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380–384.
- Rhodes CJ, White MF (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *Eur J Clin Invest* 32, 3–13.
- Richard MJ, Guiraud P, Monjo AM, Favier A (1992). Development of a simple antioxidant screening assay using skin human fibroblasts. *Free Rad Res Comms* 5, 303–314.
- Richards SK, Parton LE, Leclerc I, Rutter GA, Smith RM (2005). Over-expression of AMP-activated protein kinase impairs pancreatic {beta}-cell function in vivo. *J Endocrinol* 187, 225–235.
- Richter C, Park JW, Ames BN (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465–6467.
- Ricquier D (2005). Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* 64, 47–52.
- Ricquier D, Bouillaud F (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol (Lond)* 529, 3–10.
- Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E, Ouhabi R, Guérin B (1998). Quantitative analysis of mechanisms affecting the yield of oxidative phosphorylation: Dependence upon both fluxes and forces. *Mol Cell Biochem* 184, 35–52.
- Ritzel RA, Butler AE, Rizza RA, Veldhuis JD, Butler PC (2006). Relationship between beta-cell mass and fasting blood glucose concentration in humans. *Diabetes Care* 29, 717–718.
- Robbins MJ, Sharp RA, Slonim AE, Burr IM (1980). Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia* 18, 55–58.
- Robertson RP (2004a). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet cells in diabetes. *J Biol Chem* 279, 42351–42354.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V (2004b). Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53, S119–S124.
- Robertson RP, Harmon JS (2006). Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet ! cell. *Free Radic Biol Med* 41, 177–184.
- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, and Walseth TF (1992). Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90, 320–325.
- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF (1992). Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90, 320–325.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.
- Rösen P, Wiernsperger NF (2006). Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 22, 323–330.

Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 29, 362, 801-809.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588–590.

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M & Freeman BA (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 269, 26066–26075.

Rubner M (1908). Teil III. Das Wachstumsproblem und die Lebensdauer des Menschen und einiger Säugetiere vom energetischen Standpunkt aus betrachtet. In: *Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehungen zum Wachstum und der Ernährung*, M. Rubner (ed.) Berlin: R. Oldenbourg Verlag, pp. 127–208.

Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I (2003). Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375, 1–16.

Ryter SW, Alam J, Choi AM (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86, 583–650.

## S

Saito K, Yaginuma N, Takahashi T (1979). Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *Tohoku J Exp Med* 129, 273–283.

Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E (2003). Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 216–222.

Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S (2002). Reduced  $\beta$ -cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85–96.

Saldeen J (2000). Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 141, 2003–2010.

Salonen JT, Nyyssönen K, Tuomainen TP, Mäenpää PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch J, Helmrich SP, Salonen R (1995). Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *BMJ* 311, 1124–1127.

Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, Macarthur H, Misko TP, Currie MG, Cuzzocrea S, Sikorski JA, Riley DP (1999). A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 286, 304–306.

Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G (1997). Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 46, 1853–1858.

Santos DL, Palmeira CM, Seïça R, Dias J, Mesquita J, Moreno AJ, Santos MS (2003). Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem* 246, 163–170.

Santos MS, Santos DL, Palmeira CM, Seïça R, Moreno AJ, Oliveira CR (2001). Brain and liver mitochondria isolated from diabetic Goto-Kakizaki rats show different susceptibility to induced oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 223–230.

Sarkar SA, Gunter J, Bouchard R, Reusch JEB, Wiseman A, Gill RG, Hutton JC, Pugazhenti S (2007). Dominant negative mutant forms of the cAMP response element binding protein induce apoptosis and decrease the anti-apoptotic action of growth factors in human islets. *Diabetologia* 50, 1649–1659.

Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K (2008). The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 149, 2208–2218.

- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orholm-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316, 1331–1336.
- Schenk S, Horowitz JF (2007). Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117, 1690–1698.
- Schenk S, Saberi M, Olefsky JM (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118, 2992–3002.
- Scheuner D, Kaufman RJ (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with  $\beta$ -cell failure and diabetes. *Endocr Rev* 29, 317–333.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10, 2247–2258.
- Schroedl C, McClintock DS, Budinger GR & Chandel NS (2003). Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L922–L931.
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6, 280–293.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M (2007). A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341–1345.
- Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A (2002). Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 321, 89–96.
- Semenza G (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64, 993–998.
- Sempoux C, Guiot Y, Dubois D, Moulin P, Rahier J (2001). Morphological evidence for abnormal beta-cell function. *Diabetes* 50, S172–S177.
- Sena CM, Nunes E, Gomesa A, Santosc MS, Proençad T, Martinse MI, Seïça RM (2008). Supplementation of coenzyme Q10 and  $\alpha$ -tocopherol lowers glycosylated hemoglobin level and lipid peroxidation in pancreas of diabetic rats. *Nutrition Research* 28, 113–121.
- Seo YJ, Lee JW, Lee EH, Lee HK, Kim HW, Kim YH (2004). Role of glutathione in the adaptive tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Free Radic Biol Med* 37, 1272–1281.
- Serradas P, Gangnerau MN, Giroix MH, Saulnier C, Portha B (1998). Impaired pancreatic beta cell function in the fetal GK rat. Impact of diabetic inheritance. *J Clin Invest* 101, 899–904.
- Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM, Favier R (2003). Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35, 24–32.

- Sharma A, Olson LK, Robertson RP, Stein R (1995). The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15-cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9, 1127–1134.
- Sharma S, Dewald O, Adroque J, Salazar RL, Razeghi P, Crapo JD, Bowler RP, Entman ML, Taegtmeyer H (2006). Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 40, 2223–2231.
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6658–6663.
- Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger RH (1997). Role of nitric oxide in obesity-induced  $\beta$ -cell disease. *J Clin Invest* 100, 290–295.
- Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2498–2502.
- Shin CS, Moon BS, Park KS, Kim SY, Park SJ, Chung MH, Lee HK (2001) Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care* 24, 733–737.
- Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, Mossman BT (1991). Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266, 24398–24403.
- Sies H (1991) Oxidative stress, oxidants and antioxidants. In: Sies H (ed.) *Oxidative stress*. Academic Press, London.
- Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K (1997). Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J Biol Chem* 272, 27812–27817.
- Silva JP, Shabalina IG, Dufour E, Petrovic N, Backlund EC, Hultenby K, Wibom R, Nedergaard J, Cannon B, Larsson NG (2005). SOD2 overexpression: enhanced mitochondrial tolerance but absence of effect on UCP activity. *EMBO J* 24, 4061–4070.
- Simmons R (2005). Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab* 16, 390–394.
- Simmons RA (2006). Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 40, 917–922.
- Simmons RA (2007). Developmental origins of diabetes: the role of epigenetic mechanisms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14, 13–16.
- Sinclair DA (2005). Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 126, 987–1002.
- Sinclair DA, Lin SJ, Guarente L (2006). Life-span extension in yeast. *Science* 312, 195–197.
- Skulachev VP (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 100–124.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshzhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445, 881–885.
- Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC (1993). Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7255–7259.
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H (1994). Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 74, 121–133.
- Sohal RS, Weindruch R (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59–63.
- Soltaninassab SR, Sekhar KR, Meredith MJ, Freeman ML (2000). Multi-faceted regulation of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *J Cell Physiol* 182, 163–170.

Soulage C, Zarrouki B, Soares AF, Lagarde M, Geloën A (2008). Lou/C obesity-resistant rat exhibits hyperactivity, hypermetabolism, alterations in white adipose tissue cellularity, and lipid tissue profiles. *Endocrinology* 149, 615–625.

Souza F, Simpson N, Raffo A, Saxena C, Maffei A, Hardy M, Kilbourn M, Goland R, Leibel R, Mann JJ, Van Heertum R, Harris PE (2006). Longitudinal noninvasive PET-based beta cell mass estimates in a spontaneous diabetes rat model. *J Clin Invest* 116, 1506–1513.

Speakman JR (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *J Exp Biol* 208, 1717–1730.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277, 44784–44790.

Stadtman ER, Levine RL (2000). Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899, 191–208.

Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH, 1982. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31, 694–700.

Steinberg D, Parathasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase atherogenicity. *N Engl J Med* 320, 915–924.

Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, Ghosh S, Baker A, Snorrardottir S, Bjarnason H, Ng MC, Hansen T, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, Gudnason V, Chen G, Huang H, Lashley K, Doumatey A, So WY, Ma RC, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, van Vliet-Ostapchouk JV, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Rotimi C, Gurney M, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2007). A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 39, 770–775.

Stumvoll, M., Goldstein, B.J., and van Haeften, T.W. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 365:1333–1346.

Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q (2007). SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 6, 307–319.

Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR (1996). Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)* 90, 255–260.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995). Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296–299.

Svensson AM, Östenson CG, Jansson L (2000). Age-induced changes in pancreatic islet blood flow: evidence for an impaired regulation in diabetic GK rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E1139–E1144.

Svensson AM, Östenson CG, Sandler S, Efendic S, Jansson L (1994). Inhibition of nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine causes a preferential decrease in pancreatic islet blood flow in normal rats and spontaneously diabetic GK rats. *Endocrinology* 135, 849–853.

## T

Tähepõld P, Vaage J, Starkopf J, Valen G (2003). Hyperoxia elicits myocardial protection through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism in the rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125, 650–660.

Tajiri Y, Moller C, Grill V (1997). Long term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits  $\beta$ -cell function. *Endocrinology* 138, 273–280.

Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB (2003). Hydrogen peroxide activates NF $\kappa$ B through tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278, 24233–24241.

- Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256, 677–686.
- Talbot DA, Brand MD (2005). Uncoupling protein 3 protects aconitase against inactivation in isolated skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1709, 150–156.
- Talbot DA, Lambert AJ, Brand MD (2004). Production of endogenous matrix superoxide from mitochondrial complex I leads to activation of uncoupling protein 3. *FEBS Lett* 556, 111–115.
- Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP (1999). Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10857–10862.
- Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP (2002). A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12363–12368.
- Tang C, Han P, Oprescu AI, Lee SC, Gyulxhandanyan AV, Chan GN, Wheeler MB, Giacca A (2007). Evidence for a role of superoxide generation in glucose-induced beta-cell dysfunction in vivo. *Diabetes* 56, 2722–2731.
- Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA (1995). Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys* 316, 70–76.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15, 319–326.
- Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS (1998). Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\alpha$  on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274, H883–H891.
- Tessem JS, Jensen JN, Pelli H, Dai XM, Zong XH, Stanley ER, Jensen J, DeGregori J (2008). Critical roles for macrophages in islet angiogenesis and maintenance during pancreatic degeneration. *Diabetes* 57, 1605–1617.
- Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sönksen PH (1996). Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 91, 575–582.
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733–1742.
- Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S (1998). Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 47, 1578–1585.
- Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S (1999). Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia* 42, 849–855.
- Tonks NK (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. 1. *Cell* 121, 667–670.
- Tran PO, Parker SM, LeRoy E, Franklin CC, Kavanagh TJ, Zhang T, Zhou H, Vliet P, Oseid E, Harmon JS, Robertson RP (2004). Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 53988–53993.
- Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N (2002). Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 39, 117–122.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335–344.
- Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3–8.
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys* 237, 408–414.

Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 217, 401–410.

Tzatsos A, Kandrор KV (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 26, 63–76.

## U

Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200–205.

Unger RH (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44, 863–870.

Unger RH (2004). in *Diabetes Mellitus: a Fundamental and Clinical Text* (LeRoith, D., Olefsky, J., and Taylor, S., eds) 3<sup>rd</sup> Ed, pp. 141–149, Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia.

Unger RH, Grundy S (1985). Hyperglycemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 28, 119–121.

Unger RH, Orci L (2001). Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 15, 312–321.

Upston JM, Terentis AC, Stocker R (1999). Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins : implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J* 13, 977–994.

Urata Y, Yamamoto H, Goto S, Tsushima H, Akazawa S, Yamashita S, Nagataki S, Kondo T (1996). Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of g-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in mouse endothelial cells. *J Biol Chem* 271, 15146–15152.

Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 285, 1393–1396.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aurnann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 252, 38–53.

## V

Van der Vliet A, Eiserich JP, Kaur H, Cross CE, Halliwell B (1996). Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol* 269, 175–184.

Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT (1998). Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273, 18092–18098.

Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, Alcalde L, Martí M, Costa M, Serradell, L, Dominguez O, Fernández-Llamazares J, Julian JF, Sanmartí A, Pujol-Borrell R (1998). Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 65, 722–727.

Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, Dapas F, Caffau C, Zilli M (1997). Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol* 26, 871–879.

Veyrat-Durebex C, Alliot J (1997). Changes in pattern of macronutrient intake during aging in male and female rats. *Physiol Behav* 62, 1273–1278.

Veyrat-Durebex C, Boghossian S, Alliot J (1998). Age-related changes in adaptive mechanisms of macronutrient self-selection: evidence for a sexual dimorphism. *Mech Ageing Dev* 103, 223–234.

Vidal-Puig, AJ, Grujie D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 275, 16258–16266.

Vignais PV (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428–1459.

Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V (1996). Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 13, 715–719.

Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 361, 2017–2023.

## W

Wallace DC (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76, 781–821.

Wallace DC (2008). Mitochondria as Chi. *Genetics* 179, 727–735.

Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L (2001). Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 50, 2786–2791.

Wang RN, Rosenberg L (1999). Maintenance of  $\beta$ -cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol* 163, 181–190.

Wang X, Li H, De Leo D, Guo W, Koshkin V, Fantus IG, Giacca A, Chan CB, Der S, Wheeler MB (2004). Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes* 53, 129–140.

Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispé JR (1996). Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am J Physiol* 271, L150–L158.

Wasserman WW, Fahl WE (1997). Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch Biochem Biophys* 344, 387–396.

Watson WH, Yang X, Choi YE, Jones DP, Kehrer JP (2004). Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci* 78, 3–14.

Weindruch R, Walford RL (1988). *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction* (Springfield, IL, USA: Charles C. Thomas).

Weir GC, Bonner-Weir S (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53, S16–S21.

Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A (2001). Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50, S154–S159.

Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115–24.

Welch WJ (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063–1081.

Wellen KE, Hotamisligil GS (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111–1119.

Welsh N, Margulis B, Borg LA, Wiklund HJ, Saldeen J, Flodstrom M, Mello MA, Andersson A, Pipeleers DG, Hellerstrom C, Eizirik DL (1995). Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets : implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol Med* 1, 806–820.

Welsh N, Cnop M, Kharroubi I, Bugliani M, Lupi R, Marchetti P, Eizirik DL (2005). Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes* 54, 3238–3244.



White F (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E413–E422.

Wiernsperger NF (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 29, 579–585.

Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Byks H, Zozulińska D, Wykretowicz A, Kaźmierczak M (1995). Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 27, 193–197.

Will JC, Byers T (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nutr Rev* 54, 193–202.

Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA (1996). Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2, 87–90.

Wrede CE, Dickson LM, Lingohr MK, Briaud I, Rhodes CJ (2002). Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1). *J Biol Chem* 277, 49676–49684.

## X

Xu B, Moritz JT, Epstein PN (1999). Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse cells. *Free Radic Biol Med* 27, 830–837.

## Y

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M (2001a). Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50, 1491–1494.

Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M (2001b). Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276, 25096–25100.

Yang J, Robert CE, Burkhardt BR, Young RA, Wu J, Gao Z, Wolf BA (2005). Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 54, 3217–3228.

Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA (1990). Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 258, 564–570.

Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S (2003). Selective  $\alpha$ -cell loss and  $\beta$ -cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2300–2308.

Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T (1995). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38, 201–210.

Yu BP (1996). Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21, 651–668.

## Z

Zarse K, Schulz TJ, Birringer M, Ristow M (2007). Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB J* 21, 1271–1275.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS, McCarthy MI, Hattersley AT (2007) Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336–1341.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med*, 33, p.337.

Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 105, 745–755.

Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, Newgard CB, Unger R (1997). Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6386–6390.

Zierath, JR, Wallberg-Henriksson H (2002). From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Ann N Y Acad Sci* 967, 120–134.

Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N (2003). Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 38, 47–52.

# **ANNEXES**



## The GK rat beta-cell: A prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes?

B. Portha<sup>a,\*</sup>, G. Lacraz<sup>a</sup>, M. Kergoat<sup>b</sup>, F. Homo-Delarche<sup>a</sup>, M.-H. Giroix<sup>a</sup>, D. Bailbé<sup>a</sup>, M.-N. Gangnerau<sup>a</sup>, M. Dolz<sup>a</sup>, C. Tourel-Cuzin<sup>a</sup>, J. Movassat<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Groupe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, UMR CNRS 7059, Université Paris-Diderot/UP7, Paris, France

<sup>b</sup> MERCK-SERONO, Centre de Recherche, Chilly-Mazarin, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 February 2008

Received in revised form 3 June 2008

Accepted 12 June 2008

#### Keywords:

Type 2 diabetes

GK rat

Beta-cell

Development

Neogenesis

Glucotoxicity

Inflammation

Oxidative stress

Insulin secretion

Metabolic programming

Genetic

Epigenetic

### ABSTRACT

Increasing evidence indicates that decreased functional beta-cell mass is the hallmark of type 2 diabetes (T2D) mellitus. Nowadays, the debate focuses on the possible mechanisms responsible for abnormal islet microenvironment, decreased beta-cell number, impaired beta-cell function, and their multifactorial aetiologies. This review is aimed to illustrate to what extent the Goto–Kakizaki rat, one of the best characterized animal models of spontaneous T2D, has proved to be a valuable tool offering sufficient commonalities to study these aspects. We propose that the defective beta-cell mass and function in the GK model reflect the complex interactions of multiple pathogenic players: (i) several independent loci containing genes responsible for some diabetic traits (but not decreased beta-cell mass); (ii) gestational metabolic impairment inducing an epigenetic programming of the pancreas (decreased beta-cell neogenesis and/or proliferation) which is transmitted to the next generation; and (iii) loss of beta-cell differentiation due to chronic exposure to hyperglycemia/hyperlipidemia, inflammatory mediators, oxidative stress and to perturbed islet microarchitecture.

© 2008 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Type 2 diabetes (T2D) arises when the endocrine pancreas fails to secrete sufficient insulin to cope with the metabolic demand (DeFronzo, 1988; Donath and Halban, 2004; Weir and Bonner-Weir, 2004; Rhodes, 2005), because of beta-cell secretory dysfunction and/or decreased beta-cell mass. Hazard of invasive sampling and lack of suitable non-invasive methods to evaluate beta-cell mass and beta-cell functions are strong limitations for studies of the living pancreas in human. In such a perspective, appropriate rodent models are essential tools for identification of the mechanisms that increase the risk of abnormal beta-cell mass/function and of T2D. Some answers to these major questions are available from studies using the endocrine pancreas of the Goto–Kakizaki (GK) rat model of T2D. It is the aim of the present paper to review the common features that makes studies of the GK beta-cell so compelling.

### 1. The Goto–Kakizaki Wistar (GK) rat, a valuable model of spontaneous T2D

The GK line was established by repeated inbreeding from Wistar (W) rats selected at the upper limit of normal distribution for glucose tolerance (Goto et al., 1975, 1988; Portha et al., 2001, 2007; Östenson, 2001; Portha, 2005).

Until the end of the 1980s, GK rats were bred only in Sendai (Goto et al., 1975). Colonies were then initiated with breeding pairs from Japan, in Paris, France (Portha et al., 1991), Stockholm, Sweden (Östenson, 2001), Cardiff, UK (Lewis et al., 1996), Coimbra, Portugal (Duarte et al., 2004), Tampa, USA (Villar-Palasi and Farese, 1994). Some other colonies existed for shorter periods during the 1990s in London, UK (Hughes et al., 1994), Aarhus, Denmark, and Seattle, USA (Metz et al., 1999). There are also GK rat colonies derived from Paris in Oxford, UK (Wallis et al., 2004) and Brussels, Belgium (Sener et al., 2001). Also, GK rats are available commercially from the Japanese breeders Charles River Japan (Yokohama), Oriental Yeast (Tokyo), Clea (Osaka), and Takeda Lab Ltd. (Osaka), and from Taconic, USA ([www.taconic.com](http://www.taconic.com)).

\* Corresponding author at: Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, CNRS UMR 7059, Université Paris-Diderot, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France. Tel.: +33 1 44 27 50 11; fax: +33 1 44 27 78 91.

E-mail address: [portha@univ-paris-diderot.fr](mailto:portha@univ-paris-diderot.fr) (B. Portha).

In our colony (GK/Par subline) maintained since 1989, the adult GK/Par body weight is 10–30% lower than that of age- and sex-matched control animals. In male GK/Par rats, non-fasting plasma glucose levels are typically 10–14 mM (6–8 mM in age-matched Wistar (W) outbred controls). Despite the fact that GK rats in the various colonies bred in Japan and outside over 20 years have maintained rather stable degree of glucose intolerance, other characteristics such as beta-cell number, insulin content and islet metabolism and secretion have been reported to differ between some of the different colonies, suggesting that different local breeding environment and/or newly introduced genetic changes account for contrasting phenotypic properties.

Presently it is not clear whether the reported differences are artefactual or true. Careful and extensive identification of GK phenotype within each local subline is therefore necessary when comparing data from different GK sources (Table 1). As an illustration of this point, we have recently compared insulin and glucagon release by GK rats obtained from Taconic (GK/Tac) to that of GK/Par rats, using the perfused pancreas technique (Fig. 1). Despite no significant difference as far as body weight, basal postabsorptive plasma glucose level and glucose tolerance to i.v. glucose in vivo are concerned (8 weeks old males), a milder impairment of insulin release in response to glucose (preservation of first phase) or arginine, together with an increased glucagons release in response to arginine, were found in the GK/Taconic as compared to the GK/Par rats. For further details concerning the pathogenic sequence culminating in the chronic hyperglycemia at adult age in the GK/Par rat, please refer to recent reviews (Portha et al., 2001; Östenson, 2001; Portha, 2005; Portha et al., 2007).

## 2. Less beta-cells

### 2.1. T2D human pancreas

Whether beta-cell mass is decreased in T2D has been controversial for a long time (Maclean and Ogilvie, 1955; Gepts, 1957; Saito et al., 1979; Stefan et al., 1982; Rahier et al., 1983; Kloppel et al., 1985; Clark et al., 1988; Sempoux et al., 2001; Sakuraba et al., 2002). These discrepancies are in part due to the paucity of available data in humans. It is difficult to obtain pancreatic tissue from humans, since this usually only becomes available at autopsy, when the pancreas may have undergone autolysis. Also, reliable clinical information about autopsy cases is often unavailable. It is therefore not surprising that there are few studies of islet morphology in humans with diabetes, and in most of these, only small numbers of cases were included. However, it was suggested a long time ago that beta-cell mass is in fact reduced in T2D (Hellerström, 1984; Kloppel et al., 1985). Indeed several recent studies utilizing post-mortem and surgical pancreas specimens have provided valuable information on the pathogenesis of islet beta-cell failure in T2D (Guiot et al., 2001; Sakuraba et al., 2002; Butler et al., 2003; Yoon et al., 2003; Deng et al., 2004; Anello et al., 2005) and all of them have shown a reduction in beta-cell mass in T2D. Among these is a landmark study of beta-cell volume together with markers of beta-cell proliferation and apoptosis, taking advantage of the unique autopsy material (124 human pancreases) available at the Mayo Clinic to study from cases with and without diabetes and matched for obesity (Butler et al., 2003). The study showed relative beta-cell volume to be increased by 50% in obese compared with lean nondiabetic pancreas and was attributed to increased neogenesis of islets from exocrine ductal tissue. IGT obese and T2D obese subjects had a 40% and 63% beta-cell volume deficit respectively, compared with weight-matched controls. Lean T2D subjects had a 41% deficit of beta-cell volume compared with lean controls. Furthermore, the decreased volume

was not a consequence of reduced beta-cell proliferation, but was associated with increased beta-cell death by apoptosis (Butler et al., 2003). This last finding was confirmed in an independent study, with increased activities of caspase-3 and caspase-8 (Marchetti et al., 2004). Interestingly, these last authors reported that metformin was found to exert an anti-apoptotic effect on the human diabetic beta-cells in vitro, which was paralleled by a reduction of caspase-3 and caspase-8 activities (Marchetti et al., 2004). It is important to remark that, even if accelerated, the rate of beta-cell apoptosis in T2D rarely progresses to near-complete loss, even after decades of the disease. Although it is often assumed that accelerated apoptosis of beta-cells is important for the pathogenesis of T2D, limitations in beta-cell replication and/or neogenesis could be just as important. It is remarkable that despite the decreased total pancreatic beta-cell mass, the percentage of beta-cells within isolated islets was only slightly reduced (by 10%) in T2D patients as compared with controls (Del Guerra et al., 2005). Moreover, the fact that loss of beta-cell mass was evident in subjects with IGT (Butler et al., 2003) suggests that beta-cell mass changes are not necessarily confined to late-stage T2D. Some glucagon or insulin positive cells were observed in the pancreatic ducts in T2D pancreases (Yoon et al., 2003). Beta-cell neogenesis might be increased in T2D because larger numbers of duct cells were found to be insulin immunoreactive in T2D than in normal controls (Jones and Clark, 2001). These findings support alpha and beta-cell neogenesis from precursor duct cells in adult T2D patients, in the face of a low beta-cell replication rate (Yoon et al., 2003).

Most of these studies in human pancreatic tissues suffer from methodological limitations: (1) the relative beta-cell volume is generally used as a surrogate of beta-cell mass. As total pancreas weight is not available, this approach will be in error to the extent that there were differences in the overall mean pancreatic weight among groups; (2) it is difficult to distinguish between the two mechanisms, cell formation and cell death, in human tissue sections mainly because dead cells are removed rapidly from the islet by macrophages and neighboring cells, making it hard to quantify cell death; (3) although cell proliferation can be quantified in tissue sections using markers, this only provides a single snapshot in time; (4) these studies cannot supply prospective informations, given that they were done at autopsy. The beta-cell mass in the patients before onset of the disease is unknown. Thus individuals susceptible to diabetes possibly have limited beta-cell mass early in life, may be even in utero, due to genetic or environmental factors. If such were the case, the decrease in beta-cell mass as seen once T2D is there, would not necessarily be the consequence of the disease itself.

### 2.2. GK rat pancreas

In the adult hyperglycemic GK/Par rats (males or females), total pancreatic beta-cell mass is decreased (by 60%) (Portha et al., 2001; Movassat et al., 1997). This alteration of the beta-cell population cannot be ascribed to increased beta-cell apoptosis but is related, at least partly, to significantly decreased beta-cell replication as measured in vivo (Portha et al., 2001). The islets isolated by standard collagenase procedure from adult GK/Par pancreases, show limited decreased beta-cell number (by 15% only) and low insulin content compared with control islets (Giroix et al., 1999). The islet DNA content was decreased to a similar extent, consistent with our morphometric data, which indicate that there is no major change in the relative contribution of beta-cells to total endocrine cells in the GK islets. In addition, the insulin content, when expressed relative to DNA, remains lower in GK islets than in control (inbred W/Par) islets, which supports a very limited degranulation in the beta-cells of diabetic animals (Giroix et al., 1999). The distribution of various

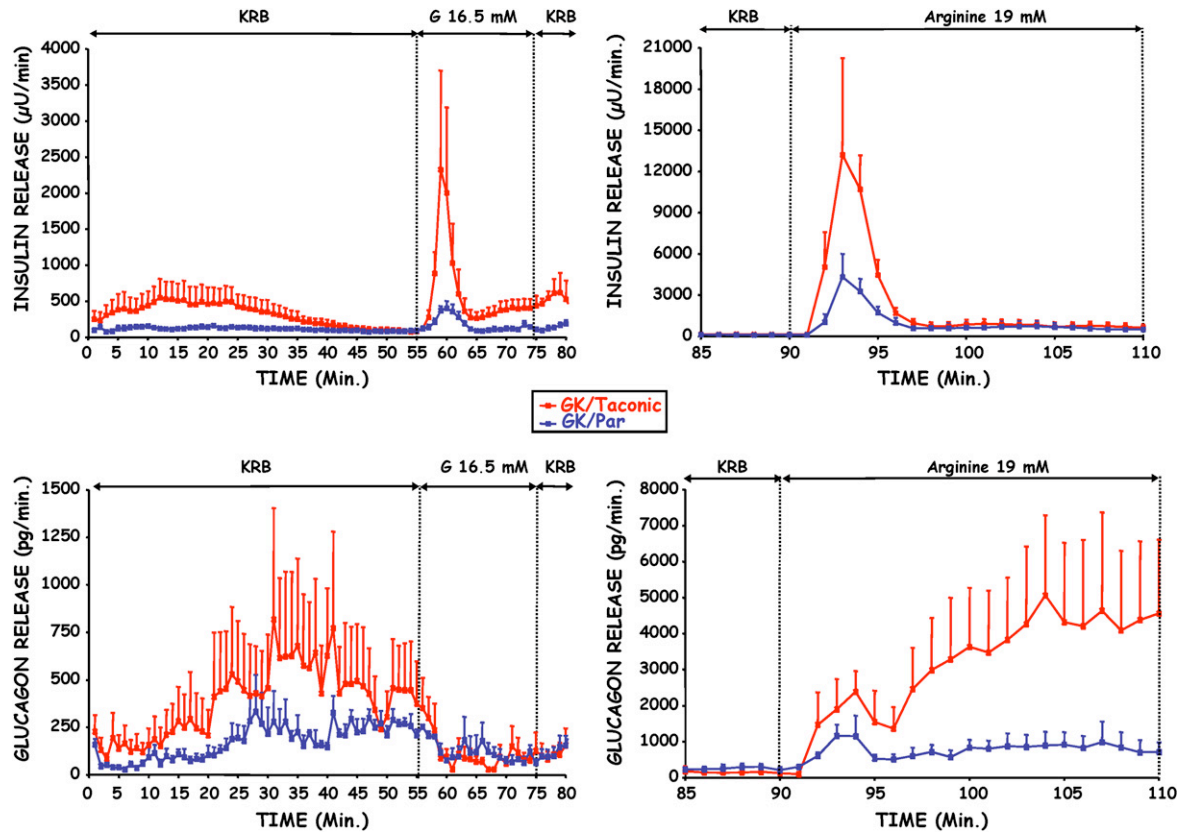
**Table 1**  
Similarities and discrepancies of the pancreatic islet/beta-cell phenotypes in the different GK rat sublines so far reported in the literature (March 2008)

Pancreas/islet/beta-cell phenotype	GK/Par	GK/Jap	GK/Sto	GK/UK	GK/Dal	GK/Sea	GK/Coi	GK/Tac
Reduction in beta-cell mass compared with age-/weight-matched controls	✓	✓	No	?	?	?	?	?
Normal beta-cell apoptosis	✓	✓	No	?	?	?	?	?
Reduced beta-cell proliferation	✓	✓	✓	?	?	?	?	?
Decreased beta-cell neogenesis	✓	?	?	?	?	?	?	?
Slightly decreased alpha-cell proportion within the islets	✓	?	No	?	?	?	?	?
Perturbed microenvironment within and around the islets	✓	✓	?	?	?	?	?	?
Fibrosis, arteriosclerosis, fat infiltration	✓	✓	?	?	?	?	?	?
Macrophage infiltration of the islets	✓	?	?	?	?	?	?	?
Multiple beta-cell functional defects	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	?
Maintenance of active proinsulin gene transcription and translation	✓	?	✓	?	?	?	?	?
Normal proinsulin biosynthesis and processing	✓	✓	✓	✓	?	?	?	?
Slight decrease of beta-cell insulin content	✓	✓	✓	✓	✓	No	✓	?
Markedly reduced activity of the insulin release mechanism, especially in response to glucose	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Reduced GLUT2 expression/glucose uptake	No	No	No	No	✓	?	?	?
Reduced glucokinase expression/glucose phosphorylation	No	No	No	?	?	?	?	?
Decreased islet glucose oxidation/glycolysis ratio	✓	✓	✓/no	✓	?	?	?	?
Reduced FAD-glycerophosphate dehydrogenase activity	✓	✓	✓	?	?	?	?	?
Reduced glucose-induced mitochondrial membrane hyperpolarization	✓	✓	✓	?	?	?	?	?
Lower ATP/ADP ratio in response to glucose	✓	?	✓/no	✓	?	No	?	?
Impaired islet calcium metabolism	✓	✓	✓	✓	?	?	?	?
Decreased activation of islet PI kinases and phospholipase C by glucose	✓	?	?	?	?	✓	?	?
increase basal islet cAMP level, in relation to increased expression of AC1, AC2, AC3, G <sub>s</sub> , G <sub>o</sub> lf	✓	?	✓	?	?	?	?	?
Increased expression of UCP-2	✓	?	✓	?	?	✓	?	?
Increased islet levels of nitrotyrosine and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine	?	✓	?	?	?	?	?	?
Increased expression of manganese-superoxide and Cu/Zn superoxide dismutases	✓	?	?	?	?	?	?	?
Increased expression of catalase and glutathione peroxidase	✓	?	?	?	?	?	?	?
Reduced expression of islet SNAREs and SNARE-modulating proteins: synaptotagmin, VAMP-2, syntaxin-1A, SNAP-25, nSec1 and Munc 13-1	✓	✓	✓	?	?	?	?	?
Increased actin expression	No	✓	✓	?	?	?	?	?
Beta-cell responsiveness to sulfonylureas and GLP-1	✓	✓	✓	✓	?	✓	?	?
Polygenic aetiology	✓	?	✓	?	?	?	?	?
Maternal hyperglycemia in pregnancy is an environmental risk factor for diabetes	✓	?	?	?	?	?	?	?

GK islet cell types appears to differ between some of the GK rat colonies. Thus, in the Stockholm colony (GK/Sto) beta-cell density and relative volume of insular cells were alike in adult GK rat and control W rats (Östenson, 2001; Abdel-Halim et al., 1993; Guenifi et al., 1995). Similar results were reported in a GK colony in Dallas (GK/Dal) (Ohneda et al., 1993).

A meaningful set of data from our group (Movassat and Portha, 1999; Miralles and Portha, 2001; Plachot et al., 2001; Calderari et al., 2007) suggests that the permanently reduced beta-cell mass in the GK/Par model indeed reflects a limitation of beta-cell neogenesis during early fetal life and thereafter. Follow-up of the animals after delivery revealed that GK/Par pups become overtly hyperglycemic for the first time after 3–4 weeks of age only (i.e. during the weaning period). Despite normoglycemia, total beta-

cell mass was clearly decreased (by 60%) in the GK pups when compared with age-related W pups (Movassat et al., 1997). Since this early beta-cell growth retardation in the prediabetic GK/Par rat pups cannot be ascribed to decreased beta-cell replication, nor to increased apoptosis (Movassat et al., 1997), we postulated that the recruitment of new beta-cells from the precursor pool (beta-cell neogenesis) was defective in the young prediabetic GK/Par rat. A comparative study of the development of GK/Par and W pancreases indicates that the beta-cell deficit (reduced by more than 50%) starts as early as fetal age 16 days (E16) (Miralles and Portha, 2001). During the time-window E16–E20, we detected an unexpected anomaly of proliferation and apoptosis of undifferentiated ductal cells in the GK pancreatic rudiments (Miralles and Portha, 2001; Calderari et al., 2007). Therefore, the decreased cell prolifer-



**Fig. 1.** Insulin (upper panels) and glucagon release (lower panels) in GK/Par (blue symbols,  $n=5$  and GK/Tac (from commercial source, Taconic) (red symbols,  $n=6$ ) male rat pancreases (isolated perfused pancreases) in the presence of 16.7 mM glucose or 19 mM arginine. When not otherwise indicated, the perfusion medium (KRB) contained no glucose. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

eration and survival in the ductal compartment of the pancreas where the putative endocrine precursor cells localize, suggests that the impaired development of the beta-cell in the GK fetus could result from the failure of the proliferative and survival capacities of the endocrine precursor cells. Importantly, data from our group indicate that defective signaling through the Igf2/Igf1-R pathway represents a primary anomaly since Igf2 and Igf1-R protein expressions are already decreased within the GK pancreatic rudiment at E13.5, at a time when beta-cell mass (first wave of beta-cell expansion) is in fact normal (Calderari et al., 2007). Low levels of pancreatic Igf2 associated with beta-cell mass deficiency are maintained thereafter within the fetal pancreas (Serradas et al., 2002). We have also published data illustrating a poor proliferation and/or survival of the endocrine precursors also during neonatal and adult life (Movassat et al., 1999; Plachot et al., 2001). All together these arguments support the notion that an impaired capacity of beta-cell neogenesis (either primary in the fetus, or compensatory in the newborn and the adult) results from the permanently decreased pool of endocrine precursors in the GK/Par pancreas (Movassat et al., 2007).

During the last few years, some important informations concerning the determinants (morbid genes vs. environment impact) for basal hyperglycemia and glucose intolerance in the GK model, have been supplied. Hyperglycemia experienced during the fetal and/or early postnatal life may contribute to programming of the endocrine pancreas (Simmons, 2006). Such a scenario also potentially applies to the GK/Par model, as GK/Par mothers are slightly hyperglycemic through their gestation and during the suckling period (Serradas et al., 1998). Concerning the potential maternal influence on the development of T2D in the GK model, Gauguier et

al. (1994) reported that adult offspring of GK/Par females crossed with W males have a more marked hyperglycemia than adult offspring of W females crossed with GK males, suggesting higher maternal inheritance. However, this conclusion was not confirmed in other studies (Abdel-Halim et al., 1994; Gill-Randall et al., 2004) and cross-breeding experiments do not overcome the difficulty to isolate the respective contribution of genetic vs. intrauterine environmental factors. Recently, Gill-Randall et al. (2004) have used a rat embryo transfer technique to examine more convincingly that major point. First, these authors showed that offspring from GK embryos transferred in the uterus of euglycemic W mother still develop basal hyperglycemia and postprandial glucose intolerance when adults, therefore highlighting a predominant role for genetic factors (Gill-Randall et al., 2004). Second, they also showed that exposure of the W embryo to hyperglycemia in utero (as seen in the GK pregnant mother) increases the risk of hyperglycemia in adult W life (Gill-Randall et al., 2004), this clearly illustrating the notion that there exists indeed a diabetogenic role for the GK intrauterine environment. The Randall's study however did not address to insulin secretion and beta-cell mass. We have preliminary unpublished data using the same experimental embryo-transfer strategy, suggesting that GK embryos transferred in the uterus of euglycemic W mother still develop deficiency of pancreatic insulin stores and beta-cell mass when adults, to the same extent as the GK rats from our stock colony. While this preliminary conclusion rather favours a major role for inheritance of morbid genes, additional studies are needed to really eliminate the option that the gestational diabetic pattern of the GK/Par mothers does not contribute to establish and/or maintain the transmission of endocrine pancreas programming from one GK/Par generation to the next one.

Studies on the offspring in crosses between GK/Par and W rats demonstrated that F1 hybrid fetuses, regardless of whether the mother was a GK or a W rat, exhibit decreased beta-mass and glucose-induced insulin secretion closely resembling those in GK/GK fetuses (Serradas et al., 1998). This finding indicates that conjunction of GK genes from both parents is not required for defective beta-cell mass to be fully expressed. We have also shown that to have one GK parent is a risk factor for a low beta-cell mass phenotype in young adults, even when the other parent is a normal W rat (Calderari et al., 2006).

Two functional point mutations in the promoter region of the adenylyl cyclase type 3 (AC3) gene have been reported in both islets and peripheral blood of GK/Sto rats and are associated to beta-cell AC3 over expression and increased cAMP generation (Abdel-Halim et al., 1998). The contribution if any, of such a mutation to the GK beta-cell growth defect is so far unknown.

Gauguier et al. (1996) using a quantitative trait locus (QTL) approach, have identified six independently segregating loci containing genes regulating fasting plasma glucose and insulin levels, glucose tolerance, insulin secretion and adiposity in GK/Par rats. The same conclusion was drawn by Galli et al. (1996) using GK/Sto. This established the polygenic inheritance of diabetes-related parameters in the GK rats whatever their origin. Both studies found the strongest evidence of linkage between glucose tolerance and markers spanning a region on rat chromosome 1, called Niddm1 locus. The Niddm1i locus, located at the telomeric end of chromosome 1 in the GK rat, is also a T2D susceptibility locus in humans and corresponds to human chromosome 10q24–q26 (Duggirala et al., 1999; Grant et al., 2006). While it must be recognized that many of the glucose-controlling locus variants reported in the GK/Par and GK/Sto rats (Gauguier et al., 1996; Galli et al., 1996; Wallis et al., 2004) were associated in fact with hyperinsulinemia or enhanced insulin secretion (and paradoxically not with the reverse), more recent works using congenic technology have identified on the Niddm1i locus a 3.5 cM region containing approximately ten genes, as a major susceptibility locus for defective insulin secretion (Lin et al., 2001). It has been recently reported that beta-cell mass is intact in Niddm1i subcongenics (Granhall et al., 2006). Finally, no QTL association with beta-cell mass or beta-cell size could be found in the GK/Par rat (Ktorza and Gauguier, personal communication of unpublished data). Therefore, the likelihood that a genotype alteration contributes to the low beta-cell mass phenotype in the GK/Par rat is reduced. The raised question to be answered now is whether or not epigenetic perturbation of gene expression occurs in the developing GK pancreas and contributes to the alteration of early beta-cell growth. *Igf2* and *Igf1r* genes are good candidates for such a perspective.

### 3. A perturbed beta-cell microenvironment within and around the islets

#### 3.1. T2D human islets

Many changes in the islet architecture of T2D subjects (Wittingen and Frey, 1974; Orci et al., 1975; Saito et al., 1979; Baetens et al., 1979; Yoon et al., 2003) have been described including fibrosis, deposition of hyalin-like material replacing beta-cells, abnormal beta-cell distribution within islets, reduced size and number of islets (Yoon et al., 2003; Butler et al., 2003), arteriosclerosis, and fat infiltrations (Butler et al., 2003; Zhao et al., 2003). A prominent finding in the diabetic patients was increased alpha-cell proportions within the islets in some (Yoon et al., 2003; Deng et al., 2004) but not all (Del Guerra et al., 2005) studies, and remarkable heterogeneity of morphological changes of islets within the

same lobe of the pancreas (Yoon et al., 2003). This is not correlated to significant alteration of glucagon release since measurement of glucagon secretion by perfused T2D islets did not reveal marked differences versus control preparations (Deng et al., 2004).

One of the features also present in islets of most humans with T2D is amyloid deposits (Clark et al., 1988; O'Brien et al., 1994; Saito et al., 1979; Westermark and Wilander, 1978; Sempoux et al., 2001; Butler et al., 2003). The role of islet amyloid in the islet pathogenesis in T2D remains controversial. One argument that has been made against the pathogenic importance of both islet amyloid in T2D and cerebral amyloid in Alzheimer's disease is that not all affected cases have amyloid present (Butler et al., 2003). It is possible that the formation of islet amyloid is secondary to hyperglycemia and not of primary importance in the pathophysiology of T2D.

Since low-grade chronic inflammation has received increasing attention in recent years as an important pathophysiological mechanism in adipocyte insulin-resistance and atherosclerosis, inflammatory phenomena may also target the islet in T2D. Very recent data indeed support such a view since increased numbers of immune cells, specifically macrophages, were found associated with pancreatic islets in T2D (Ehse et al., 2007a). Increased islet-derived inflammatory factors such as interleukins (IL6, IL8), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage inflammatory protein (MIP1 alpha) are produced and released when human islet are exposed to a T2D milieu (Ehse et al., 2007a). Further, this inflammatory response was found to be biologically functional as conditioned medium from human islets exposed to a T2D milieu could induce increased migration of monocytes and neutrophils. This migration was blocked by IL8 neutralization and IL8 was localized to human alpha-cells (Ehse et al., 2007a). Thus, islet-derived inflammatory factors are regulated by the T2D milieu and may contribute to the macrophage infiltration of the human islets. Whether the presence of macrophages is causative to T2D islet pathology requires further investigation. Possibly, early infiltration of macrophages may be beneficial to islet function and plasticity. However, as the disease progresses, macrophages may play a role in accelerating pancreatic islet cell dysfunction and death. Macrophages also may be present after beta-cell death, acting to phagocytose dead islet tissue.

#### 3.2. GK rat islets

The adult GK/Par pancreas exhibits two different populations of islets in situ: large islets with pronounced fibrosis (Portha et al., 2001) and heterogeneity in the staining of their beta-cells, and small islets with heavily stained beta-cells and normal architecture. One striking morphologic feature of GK rat islets is the occurrence of these big islets characterized by connective tissue separating strands of endocrine cells (Goto et al., 1988; Suzuki et al., 1992; Guenifi et al., 1995). Accordingly, the mantle of glucagon and somatostatin cells is disrupted and these cells are found intermingled between beta-cells. These changes increase in prevalence with ageing (Suzuki et al., 1992).

Chronic inflammation at the level of the GK/Par islet has recently received demonstration and it is now considered as a pathophysiological contributor in GK diabetes (Ehse et al., 2007a, 2007b). Using an Affymetrix microarray approach to evaluate islet gene expression in freshly isolated adult GK/Par islets, we found that 34% of the 71 genes found to be overexpressed, belong to inflammatory/immune response gene family, and 24% belong to extracellular matrix (ECM)/cell adhesion gene family (Homo-Delarche et al., 2006). Numerous macrophages (CD68<sup>+</sup> and MHC class II<sup>+</sup>) and granulocytes were found in/around adult GK/Par islets (Homo-Delarche et al., 2006). Up-regulation of the MHC class II gene was also reported in a recent study of global expression profiling in GK



islets from commercial source (Taconic) (Ghanaat-Pour et al., 2007). Immunolocalization with anti-fibronectin and anti-vWF antibodies indicated that ECM deposition progresses from intra- and perislet vessels, as it happens in microangiopathy (Homo-Delarche et al., 2006). These data demonstrate that a marked inflammatory reaction accompanies GK/Par islet fibrosis and suggest that islet alterations develop in a way reminiscent of microangiopathy (Ehse et al., 2007b). The previous reports by our group and others that increased blood flow and altered vascularisation are present in the GK/Par and GK/Sto models (Atef et al., 1994; Svensson et al., 1994, 2000) are consistent with such a view. The increased islet blood flow in GK rats may be accounted for by an altered vagal nerve regulation mediated by nitric oxide, since vagotomy as well as inhibition of NO synthase normalized GK/Sto islet flow (Svensson et al., 1994). In addition, islet capillary pressure was increased in GK/Sto rats (Carlsson et al., 1997), this defect was restored after 2 weeks of normalization of glycemia by phlorizin treatment. However the precise relationship between islet microcirculation and beta-cell secretory function remains to be established.

#### 4. Multiple beta-cell functional defects

##### 4.1. T2D human islets

The insulin release defects of T2D patients have been extensively studied *in vivo* and are mainly characterized by impairment of glucose-stimulated insulin release. Commonly found alterations of insulin secretion in T2D patients include reduced or absent first-phase response to intravenous glucose (Kahn, 2001), delayed or blunted release after ingestion of mixed meals (Polonsky et al., 1998), alterations in rapid pulses and ultradian oscillations (Schmitz et al., 2002). In addition, second-phase insulin secretion and response to nonglucose stimuli may also be reduced *in vivo* (Weyer et al., 1999; Weir and Bonner-Weir, 2004). More direct assessment of the properties of the diabetic beta-cell using isolated islets is needed to better look for alterations associated with and/or responsible for impaired insulin secretion in T2D. So far, informations related to the functional characteristics of islets from T2D patients are scarce but relatively convergent. Several groups (Fernandez-Alvarez et al., 1994; Lin et al., 2002; Deng et al., 2004; Marchetti et al., 2004; Del Guerra et al., 2005) have recently reported multiple abnormalities of insulin secretion in islets isolated from T2D donors.

The secretion defect in T2D is probably more severe than could be accounted for solely by the reduction in beta-cell mass (Ahren, 2005). The demonstration that human beta-cells maintain active insulin gene transcription and translation even in amyloid-containing islets and that insulin cleavage is normal in most beta-cells (Sempoux et al., 2001), suggests that the major beta-cell functional problem in T2D is abnormal coupling of insulin secretion. Because islet insulin content was only slightly decreased, by <30%, in the islets of T2D patients (Ostenson et al., 2006), it is not likely that the mechanism behind the impaired insulin secretion involves deficient insulin stores but rather reduced activity of the release mechanism.

Beta-cells in T2D showed modest signs of ER stress when studied in pancreatic samples or isolated islets maintained at physiological glucose concentration. However, exposure to increased glucose levels induced ER stress markers in T2D islet cells, which therefore may be more susceptible to ER stress induced by metabolic perturbations (Marchetti et al., 2007). Accordingly, it has been proposed that factors others than ER stress may play a prominent role in beta-cell dysfunction and death, or that beta-cells in T2D face a condition of ER stress that is relatively compensated for periods of

time, but exacerbates in case of metabolic decompensation, thus contributing to beta-cell damage (Marchetti et al., 2007).

In islets isolated from the pancreas of multiorgan donors who were affected by T2D, it has been observed a clearly reduced insulin release in response to glucose *in vitro*, whereas the secretion in response to leucine, glutamine or the non-fuel secretagogue arginine, was only slightly affected (Deng et al., 2004; Marchetti et al., 2004; Del Guerra et al., 2005). The pulsatile nature of glucose-induced insulin release was preserved in T2D islets, but the amplitude of the pulses was reduced (Lin et al., 2002). Glucose stimulation normally results in the transfer of reducing equivalents to the respiratory chain, leading to hyperpolarization of the mitochondrial membrane and generation of ATP. The expression of the SLC2A2/GLUT2 gene was repeatedly reported reduced in islets from T2D patients (Gunton et al., 2005; Ostenson et al., 2006; Del Guerra et al., 2005), while the islet glucokinase expression was reported normal (Ostenson et al., 2006) or reduced (Gunton et al., 2005; Del Guerra et al., 2005). In addition, the activity of FAD-glycerophosphate dehydrogenase, glutamate-oxalacetate transaminase, or glutamate-pyruvate transaminase was lower in T2D islets than in control cells (Fernandez-Alvarez et al., 1994). In T2D islets, glucose-induced activation of glucose oxidation and mitochondrial membrane hyperpolarization was reduced (Del Guerra et al., 2005; Anello et al., 2005); ATP levels were lower at high glucose and the ATP/ADP ratio was blunted, in response to glucose stimulation (Anello et al., 2005). Further support to the concept that mitochondria in the diabetic beta-cell are in an altered state comes from electron microscopy examinations: the density volume of these organelles was significantly higher in T2D beta-cells than in control cells, due to mitochondrial swelling and enlargement (Anello et al., 2005). In the T2D islets, the increased protein expression of complex I and complex V of the respiratory chain (Anello et al., 2005) does not support the possibility for a reduced electron flux through the respiratory chain. Rather the increased expression of UCP-2 (Anello et al., 2005) could be responsible for the reduced hyperpolarization of the mitochondrial membrane, lower ATP levels, ATP/ADP ratio, and eventually, of the reduced insulin release in response to glucose. UCP-2 protein expression could be activated by an increased formation of reactive oxygen species (Krauss et al., 2003).

An association between impaired insulin response to glucose in T2D islets and greatly reduced expression of islet SNARE complex and SNARE-modulating proteins has been recently reported (Ostenson et al., 2006). The secretory vesicle SNAREs, synaptotagmin and VAMP-2, the target membrane-SNAREs, syntaxin-1A and SNAP-25, and the cytosolic SNARE-modulating proteins nSec1 and Munc 13-1, were decreased on either or both mRNA and protein levels. Also actin levels were increased in T2D islets relative to the nondiabetic controls (Ostenson et al., 2006).

Nitrotyrosine derives from the reaction of superoxide and nitric oxide and is considered a reliable marker of oxidative stress. Also 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentration was significantly higher in T2D than control islets, and it was correlated with the degree of glucose-stimulated insulin release impairment (Del Guerra et al., 2005). The concept that the functional defects found in T2D islets are related at least in part to increased oxidative stress, is also consistent with the reports of enhanced oxidative stress-related DNA damage (Sakuraba et al., 2002), increased expression of protein kinase C- $\beta$ 2 and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced-oxidase (Marchetti et al., 2004) and reduced expression of manganese-superoxide and Cu/Zn superoxide dismutases (Sakuraba et al., 2002; Marchetti et al., 2004) in T2D pancreases. On the contrary, the increased expression of catalase and glutathione peroxidase in T2D islets (Marchetti et al., 2004) suggests an attempt to enhance the elimination of ROS through

pathways different from dismutase activity. Accordingly, in vitro 24-h exposure to glutathione (Del Guerra et al., 2005) or metformin (Marchetti et al., 2004), significantly improved glucose-stimulated insulin release and decreased nitrotyrosine concentration in T2D islets. These data provide direct evidence that reducing islet cell oxidative stress is a potential target for therapeutic approaches of the diabetic human beta-cell. They also suggest that the functional decline of T2D islets may not be relentless and can be, at least in part, reversible. This last conclusion is also supported by the observation that the impaired insulin release in islets of T2D patients can be reversed in vitro by GLP-1 (Ostenson et al., 2006). Such a normalization of the insulin response after GLP-1 in T2D patients was demonstrated in previous in vivo studies (Gutniak et al., 1992).

Recently, islets of T2D patients demonstrated marked down-regulation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT, also called hypoxia-induced factor 1 beta or HIF1 ) which regulates a number of genes involved in vascular function and hypoxic response including VEGF, PAI1 and EPO (Gunton et al., 2005).

Fig. 2 illustrates a compendium of the abnormal intracellular sites so far identified in human T2D islets.

The causes underlying the defective insulin secretion in T2D are complex and multiple. It is also liable that one single defect is not sufficient for eliciting a defective function of that degree as diabetes develops, because compensation in other mechanisms may take place. The determinants for beta-cell dysfunction in T2D include genetic, environmental and intrauterine/perinatal factors (Gerich, 1998).

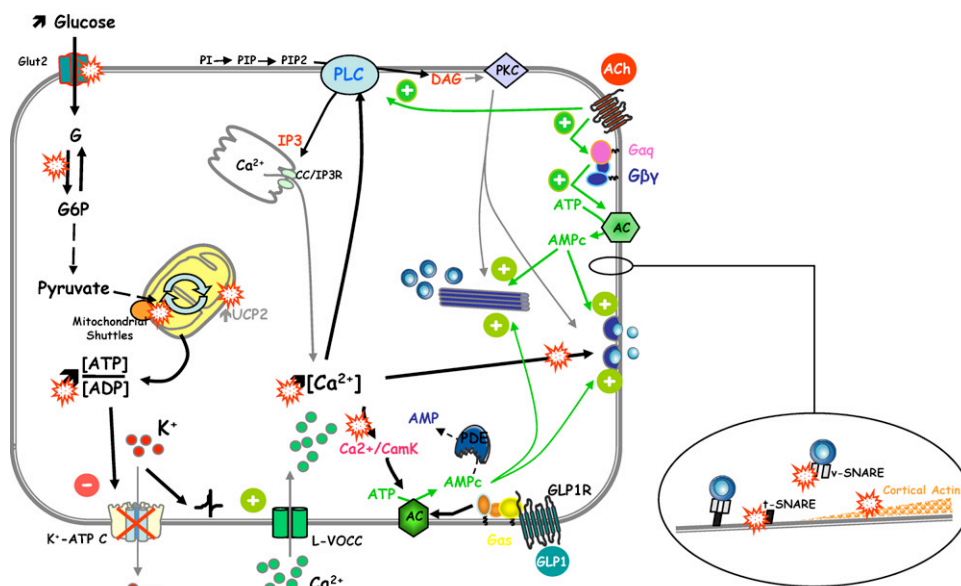
While several rare monogenic forms diabetes (maturity-onset diabetes of the young, MODY), have been described, the genetic basis of T2D is clearly much more complex. T2D is believed to be a polygenic disease in which variations within multiple genes, each adding some risk (Laakso, 2007; Frayling and Mc Carthy, 2007). Through various genetic approaches, polymorphisms within numerous genes relating to pancreatic islet function have been dis-

covered that are associated with decreased/increased risk of T2D. Of particular note are polymorphisms of PPARγ, PPARγ coactivator 1-α (PGC1α), transcription factor Kruppel-like factor 11 (KLF11), transcription factor 7-like 2 (TCF7L2), calpain 10 (CAP10), KCNJ11 (Kir6.2), and allele III of a variable number tandem repeat 0.5 kb upstream of the insulin genes (INS-VNTR) (Laakso, 2007). For the majority of these polymorphisms, it is uncommon for a significantly increased T2D risk to be shown in more than one or a few population cohorts, consistent with enormous heterogeneity in heritability for this condition. Apparent exceptions are the variants in the transcription factor TCF7L2 and of KCNJ11 (Kir6.2) (Laakso, 2007; Frayling and Mc Carthy, 2007). Interestingly, the increased risk of T2D conferred by variants in TCF7L2 involves the enteroinsular axis, enhanced expression of the gene in islets, and impaired insulin secretion (Lyssenko et al., 2007).

There is also evidence, that maternal hyperglycemia in diabetic pregnancy is also an early life environmental risk factor for T2D (Dabelea and Pettitt, 2001). In other words, the intrauterine metabolic environment may exert remote effects on the adult beta-cell health (metabolic imprinting of the beta-cell) (Simmons, 2006).

#### 4.2. GK rat islets

As for pancreatic beta-cell mass, there is some controversy regarding the content of pancreatic hormones in GK rats. In the adult hyperglycemic GK/Par rats (males), total pancreatic insulin stores are decreased by 60–40% (Portha et al., 2001). In other GK rat colonies (Stockholm, Japan, Seattle, Tampa), insulin store values have been found similar or more moderately decreased, compared with control rats (Östenson et al., 1993b; Abdel-Halim et al., 1993; Suzuki et al., 1997; Salehi et al., 1999; Metz et al., 1999). No major alteration in pancreatic glucagon content, expressed per pancreatic weight, has been demonstrated in GK/Sto rats (Abdel-Halim et al., 1993), although the total alpha-cell mass was decreased by about 35% in adult GK/Par rats (Movassat et al., 1997). The periph-



**Fig. 2.** Model for defective glucose-induced insulin release and the abnormal intracellular sites so far identified in the beta-cells obtained from humans with T2D. Where data are available, the impaired sites in the beta-cell are indicated with the symbol: .  
**Abbreviations**—Glut: glucose transporter; AC, adenylate cyclases; G s, G q: subunits of heterotrimeric G proteins; G : and subunits of heterotrimeric G proteins; PI, PIP, PIP2: phosphoinositides; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; DAG: diacylglycerol; IP3: inositol-3-phosphate; UCP-2: uncoupling protein 2; tSNARE, v-SNARE: SNARE proteins (syntaxin-1A, SNAP-25, VAMP-2, Munc 18, Munc 13-1, synaptophysin); L-VOCc: L-type calcium channel modulated by the membrane polarization; CC/IPR3: calcium channel modulated by receptor to IP3; K/ATP C: potassium channel modulated by the ATP/ADP ratio; Ca<sup>2+</sup>/CamK: calcium calmoduline kinase; Ach: acetylcholine; M3-R: muscarinic receptor isoform 3; GLP-1: glucagon-like peptide 1; GLP-1-R: GLP-1 receptor. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

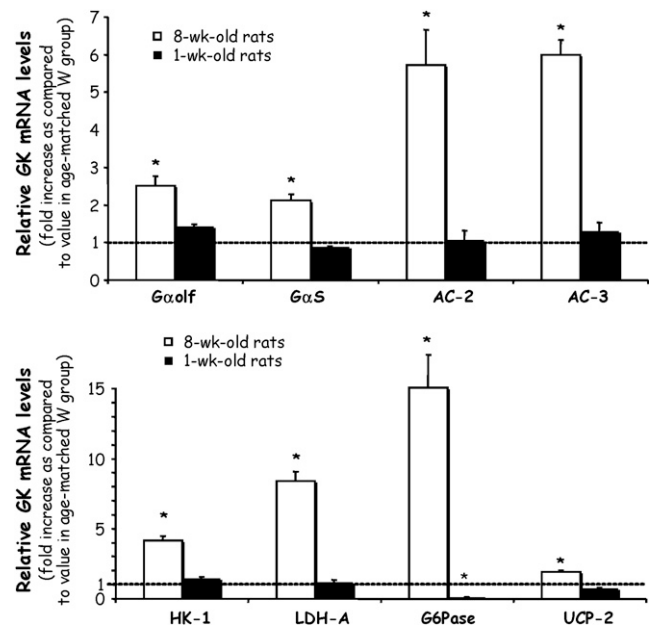
eral localization of glucagon-positive cells in W islets was replaced in GK/Sto rats with a more random distribution throughout the core of the islets (Guest et al., 2002). Pancreatic somatostatin content was slightly but significantly increased in GK/Sto rats (Abdel-Halim et al., 1993).

Glucose-stimulated insulin biosynthesis in freshly isolated GK/Par, GK/Jap or GK/Sto islets has been reported grossly normal (Giroix et al., 1993b; Nagamatsu 1999; Guest et al., 2002). The rates of biosynthesis, processing and secretion of newly synthesized (pro)insulin were comparable (Guest et al., 2002). This is remarkable in the face of markedly lower prohormone convertase PC2 immunoreactivity and expression in the GK/Sto islets, while the expression patterns of insulin, PC1, PC2, carboxypeptidase E (CPE) remained normal (Guest et al., 2002). Circulating insulin immunoreactivity in GK/Sto rats was predominantly insulin 1 and 2 in the expected normal ratios with no (pro)insulin evident. The finding that proinsulin biosynthesis and processing of proinsulin appeared normal in adult GK rats suggests that the depletion of secreted constituents in beta-cells does not arise from a failure to recognize glucose as an activator of prohormone biosynthesis and granule biogenesis. Rather it points to an inability of the beta-cell population as a whole to meet the demands upon insulin secretion imposed by chronic hyperglycemia in vivo. Although circulating insulin levels did not differ between GK and W rats, they were inappropriate for the level of glycemia, indicative of a secretory defect.

Impaired glucose-stimulated insulin secretion has been repeatedly demonstrated in GK rats (whatever the colony), in vivo (Portha et al., 1991; Gauguier et al., 1994, 1996; Galli et al., 1996; Salehi et al., 1999), in the perfused isolated pancreas (Portha et al., 1991; Östenson et al., 1993a, 1993b; Abdel-Halim et al., 1993, 1994, 1996), and in freshly isolated islets (Östenson et al., 1993a, 1993b; Giroix et al., 1993a, 1993b; Hughes et al., 1994). A number of alterations or defects have been shown in the stimulus-secretion coupling for glucose in GK islets. GLUT2 is underexpressed, but not likely to the extent that it could explain the impairment of insulin release (Ohneda et al., 1993). This assumption is supported by the fact that glucokinase/hexokinase activities are normal in GK rat islets (Östenson et al., 1993a; Tsuura et al., 1993; Giroix et al., 1999). In addition, glycolysis rates in GK rat islets are unchanged or increased compared with control islets (Östenson et al., 1993b; Giroix et al., 1993a, 1993b, 1993c; Hughes et al., 1994, 1998; Ling et al., 1998, 2001). Furthermore, oxidation of glucose has been reported decreased (Giroix et al., 1993b), unchanged (Östenson et al., 1993b; Hughes et al., 1994, 1998; Giroix et al., 1993c), or even enhanced (Ling et al., 1998). Also, lactate dehydrogenase gene expression (this paper, Fig. 3) and lactate production (Ling et al., 1998) are increased and pyruvate dehydrogenase activity is decreased (Zhou et al., 1995) in GK rat islets. In GK/Par islets, we showed that mitochondria of exhibit a specific decrease in the activities of FAD-dependent glycerophosphate dehydrogenase (Giroix et al., 1993b, 1993c) and branched-chain ketoacid dehydrogenase (Giroix et al., 1999). Although this certainly could contribute to lower oxidation rates, it does not exclude other mechanisms. Indeed, we found that the beta-cells of adult GK/Par rats had a significantly smaller mitochondrial volume compared to control beta-cells (Serradas et al., 1995). No major deletion or restriction fragment polymorphism could be detected in mtDNA from adult GK/Par islets (Serradas et al., 1995); however, they contained markedly less mtDNA than in control islets. The lower islet mtDNA was paralleled by decreased content of some islet mt mRNAs such as cytochrome b (Serradas et al., 1995). In accordance with this, insufficient increase of ATP generation in response to high glucose was shown by our group (Giroix et al., 1993c). This supports the hypothesis that the defective insulin response to glucose in GK islet is accounted for by an impaired ATP

production, closure of the ATP-regulated K<sup>+</sup>-channels (Tsuura et al., 1993) and impaired elevation of intracellular [Ca<sup>2+</sup>] (Hughes et al., 1998; Marie et al., 2001; Dolz et al., 2005). Such a view validated in the GK/Par beta-cell, is however contradictory to the reports in GK/Sto and GK/Sea islets that the rate of ATP production is unimpaired (Ling et al., 1998; Metz et al., 1999). Other energy metabolism defects identified in GK/Sto islets, include increased glucose cycling due to increased glucose-6-phosphatase activity (Östenson et al., 1993b; Ling et al., 1998); impaired glycerol phosphate shuttle due to markedly reduced activity of the FAD-linked glycerol phosphate dehydrogenase (Östenson et al., 1993a; MacDonald et al., 1996), and decreased pyruvate carboxylase activity (MacDonald et al., 1996). It is possible that these alterations may affect ATP concentrations locally. However, the enzyme dysfunctions were restored by normalization of glycemia in GK/Sto rats (MacDonald et al., 1996; Ling et al. unpublished observations), but with only partial improvement of glucose-induced insulin release. Hence, it is likely that these altered enzyme activities result from a glucotoxic effect rather than being primary causes behind the impaired secretion. Also, lipotoxic effects leading to defective insulin release have been observed in GK rats on high-fat diet (Shang et al., 2002; Briaud et al., 2002), possibly mediated by a mechanism partly involving modulation of UCP-2 expression.

Phosphoinositides (Dolz et al., 2005) and cyclic AMP metabolism (Dolz et al., 2005, 2006) are also affected in GK/Par islets. While car-



**Fig. 3.** mRNA expression was altered in islets freshly isolated from adult (8-week-old) diabetic or neonatal (1-week-old) prediabetic GK/Par rats. Quantitative real-time PCR was used to measure expression in islets with age-matched correction for expression of the control S18 gene.

Of the cAMP metabolism genes, adenylyl cyclase isoforms 2 (AC2) and 3 (AC3) together with the subunits G<sub>s</sub> and G<sub>o</sub> of the heterotrimeric G proteins, were significantly increased in adult GK islets when compared to adult control Wistar islets. By contrast, their expression in neonatal GK rats islets did not differ significantly from the controls. This is consistent with the view that the increased cAMP production by adult GK islets reflects an acquired adaptation possibly ascribed to gluco-lipotoxicity.

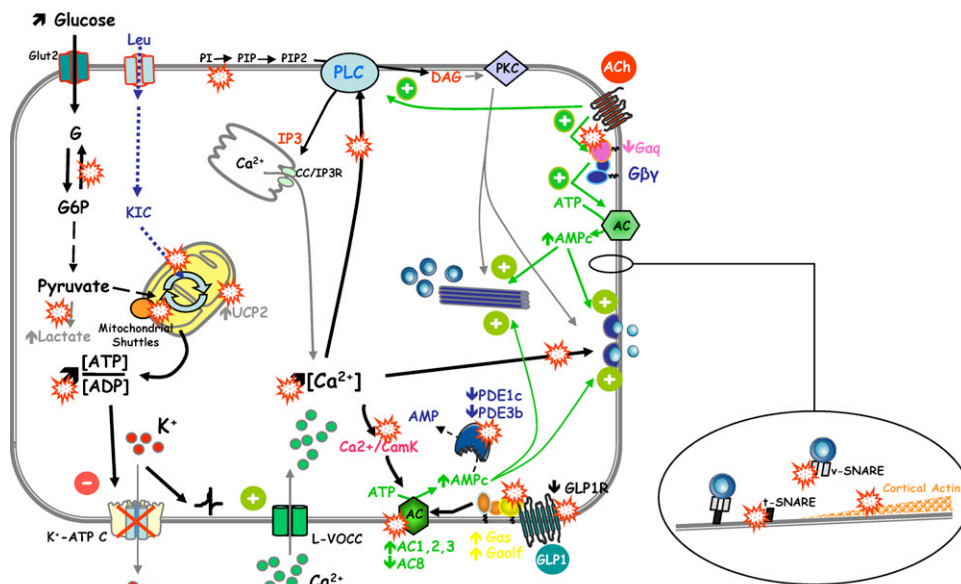
Concerning some proteins involved in glucose metabolism pathway or control of mitochondrial oxidative phosphorylation, hexokinase-1 (HK-1), lactate dehydrogenase A (LDH-A), glucose-6-phosphatase (G6Pase) and uncoupling protein-2 (UCP-2) were significantly increased in adult GK islets when compared to adult control Wistar islets. By contrast, their expression in neonatal GK rats islets did not differ significantly from the controls. \**p* < 0.01 as compared to age-related control group.

bachol was able to promote normal inositol generation in GK/Par islets, high glucose failed to increase inositol-phosphate accumulation (Giroix, unpublished data). The inability of glucose to stimulate IP<sub>3</sub> production is not related to defective phospholipase C activity per se (total activity in islet homogenates is normal). It is rather linked to abnormal targeting of the phosphorylation of phosphoinositides: the activity of phosphatidylinositol kinase, which is the first of the two phosphorylating activities responsible for the generation of phosphatidylinositol biphosphate, is clearly reduced (Giroix, unpublished data). Moreover, deficient calcium handling and ATP supply in response to glucose probably also contribute to abnormal activation of PI kinases and phospholipase C.

Concerning cAMP, it is remarkable that its intracellular content is very high in GK/Par beta-cells already at low glucose (Dolz et al., 2005). This is related to increased expression of the adenylyl cyclase isoforms 1, 2 and 3, and of the G<sub>s</sub> and G<sub>olf</sub> proteins while the phosphodiesterases PDE3B and PDE1C isoforms are decreased (Dolz et al., 2005, 2006). Furthermore, cAMP is not further enhanced at increasing glucose concentrations (at variance with the situation in normal beta-cells) (Dolz et al., 2005, 2006). This suggests that there exists a block in the steps linking glucose metabolism to activation of adenylyl cyclase in the GK/Par beta-cell. An attractive possibility which has been explored in the GK/Sto rat, is that increased AC3 is due to functional mutations in the promoter region of the AC3 gene (Abdel-Halim et al., 1998). We do not retain this hypothesis in the GK/Par islet since we found that the expression of the AC1, 2 and 3, and of the G<sub>s</sub> and G<sub>olf</sub> proteins, are not increased in the prediabetic GK/Par islets (Fig. 3). The constitutively increased cAMP production may enhance the activity of lactate dehydrogenase (Derda et al., 1980). This would in turn lead to increased glucose utilization and reduced cytoplasmic pool of NADH. It is well documented that altered NADH/NAD ratio is associated with impaired glucose-induced insulin release (Eto et al., 1999). The increased cAMP production has also offered the possibility to fully restore the beta-cell secretory competence to glucose

in GK/Par as well as GK/Sto islets (Abdel-Halim et al., 1996; Dolz et al., 2006) with a clear biphasic response (Dolz et al., 2006). This also proves that the glucose-incompetence of the GK/Par beta-cell is not irreversible, and emphasizes the usefulness of GLP-1 as a therapeutic agent in T2D. Also, cholinergic stimulation has been demonstrated to restore glucose-induced insulin secretion from GK/Sto as well as GK/Par islets (Guenifi et al., 2001; Dolz et al., 2005). We have proposed that such a stimulation is not mediated through activation of the PKC pathway, but via a paradoxical activation of the cAMP/PKA pathway to enhance Ca<sup>2+</sup>-stimulated insulin release in the GK/Par beta-cell (Dolz et al., 2005).

Along to these upstream abnormalities, important defects reside late in signal transduction i.e., in the exocytotic machinery. Indeed, glucose-stimulated insulin secretion was markedly impaired in GK/Sto, GK/Jap, GK/Sea and GK/Par islets also when the islets were depolarized by a high concentration of potassium chloride and the ATP-regulated K<sup>+</sup>-channels kept open by diazoxide (Okamoto et al., 1995; Abdel-Halim et al., 1996; Metz et al., 1999). Similar results were obtained when insulin release was induced by exogenous calcium in electrically permeabilized GK/Jap islets (Okamoto et al., 1995). In fact, markedly reduced expression of several exocytotic SNARE complex proteins, important for the docking and fusion between insulin granules and beta-cell membrane, have been demonstrated in GK/Sto and GK/Jap islets (Nagamatsu et al., 1999; Gaisano et al., 2002; Zhang et al., 2002). Thus, a reduced number of docking granules accounts for impaired beta-cell secretion (Ohara-Imaizumi et al., 2004) and this defect may partly be related to glucotoxicity (Gaisano et al., 2002). Actin cytoskeleton has been implicated also in regulated exocytosis. It has been proposed that in secretory cells, actin network under the plasma membrane acts as a physical barrier preventing the access of secretory granules to the membrane. The level of total actin protein evaluated by western blotting has been found similar in GK/Par and W islets (Movassat, unpublished data), at variance with reports in others GK rat lines (Nagamatsu et al., 1999; Gaisano et al., 2002). However, confocal



**Fig. 4.** Model for defective glucose-induced insulin release and the abnormal intracellular sites so far identified in the beta-cell of the diabetic GK rats from the different sources. Where data are available, the impaired sites in the beta-cell are indicated with the symbol: ⚡. Abbreviations—Glut2: glucose transporter isoform 2; Leu: leucine; KIC: keto-isocaproate; AC: adenylyl cyclase isoforms; G<sub>s</sub>, G<sub>olf</sub>, G<sub>q</sub>: subunits of heterotrimeric G proteins; G<sub>βγ</sub>: and subunits of heterotrimeric G proteins; PI, PIP, PIP<sub>2</sub>: phosphoinositides; PLC: phospholipase C; PKC: protein kinase C; DAG: diacylglycerol; IP<sub>3</sub>: inositol-3-phosphate; UCP-2: uncoupling protein 2; tSNARE, v-SNARE: SNARE proteins (syntaxin-1A, SNAP-25, VAMP-2, Munc 18); L-VOCC: L-type calcium channel modulated by the membrane polarization; CC/IP3R: calcium channel modulated by receptor to IP<sub>3</sub>; K<sup>+</sup>/ATP C: potassium channel modulated by the ATP/ADP ratio; Ca<sup>2+</sup>/CamK: calcium calmoduline kinase; Ach: acetylcholine; M3-R: muscarinic receptor isoform 3; GLP-1: glucagon-like peptide 1; GLP-1-R: GLP-1 receptor; PDE: cAMP-dependant phosphodiesterase isoforms. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

analysis of the distribution of phalloidin-stained cortical actin filaments revealed a higher density of the cortical actin web nearby the plasma membrane in GK/Par islets as compared to W. Moreover preliminary functional results suggest that the higher density of actin cortical web in the GK/Par islets contribute to the defects in glucose-induced insulin secretion exhibited by GK islets (Movassat, unpublished data).

Other intriguing aspects of possible mechanisms behind defective glucose-induced insulin release in GK/Sto rat islets are the findings of dysfunction of islet lysosomal enzymes (Salehi et al., 1999), as well as marked impairment of the glucose-heme oxygenase-carbon monoxide signaling pathway (Mosén et al., 2005). Diminished levels and/or abnormal activation of several PKC isoenzymes in GK/Sto islets could also account for the defective signals downstream to glucose metabolism, responsible for impaired insulin secretion (Warwar et al., 2006). Peroxovanadium is an inhibitor of islet protein-tyrosine phosphatase (PTP) activities that was shown to enhance glucose-stimulated insulin secretion from GK/Sto islets (Abella et al., 2003; Chen and Östenson, 2005). One possible target for this effect could be PTP sigma that is overexpressed in GK/Sto islets (Östenson et al., 2002). In addition, defects in islet protein histidine phosphorylation have been proposed to contribute to impaired insulin release in GK/Sea islets (Kowluru, 2003).

Considerable interest has recently been focused on the putative role of oxidative stress upon deterioration of beta-cell function/survival in diabetes. T2D in the GK/Jap rats is indeed associated

with beta-cell oxidative damages as attested by increased levels 8-OHdG and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins (Ihara et al., 1999), and treatment of GK/Jap rats with anti-oxydants provided some protection from glucose toxicity (Ihara et al., 2000). Recent data from our group indicate that the GK/Par beta-cell phenotype resulted in a reduced sensitivity to the acute deleterious effect of streptozotocin or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon the glucose-induced insulin secretion together with an increased expression of the antioxidant gene glutathione peroxidase-1 (Portha et al., 2007). This suggests that an increased expression of antioxidants may confer paradoxically greater ROS scavenging capacity to the GK/Par beta-cell.

Fig. 4 illustrates a compendium of the abnormal intracellular sites so far identified in the diabetic GK islets from the different sources.

There are several arguments indicating that the GK beta-cell secretory failure is, at least partially, related to the abnormal metabolic environment (gluco-lipototoxicity). When studied under in vitro static incubation conditions, islets isolated from normoglycemic (prediabetic) GK/Par pups, amplified their secretory response to high glucose, leucine or leucine plus glutamine to the same extent as age-related W islets (Portha et al., 2001). This suggests that there does not exist a major intrinsic secretory defect in the prediabetic GK/Par beta-cells which can be considered as normally glucose-competent at this stage, at least when tested in vitro. In the GK/Par rat, basal hyperglycemia and normal to very mild hypertriglyceridemia are observed only after weaning (Portha et al., 2001). The onset of a profound alteration in glucose-stimulated

**Table 2**  
Comparison of the endocrine pancreas phenotype in T2D patients and diabetic GK rats: many similarities, few discrepancies

Pancreas/islet/beta-cell phenotype	T2D patient	Diabetic GK/Par rat
Reduction in beta-cell mass compared with age-/weight-matched controls	✓	✓
Increased beta-cell death by apoptosis	✓	No
Reduced beta-cell proliferation	No	✓
Decreased beta-cell neogenesis	No	✓
Increased alpha-cell proportion within the islets	Yes/no	No
Perturbed microenvironment within and around the islets	✓	✓
Fibrosis, arteriosclerosis, fat infiltration	✓	✓
Islet amyloid	✓	No
Macrophage infiltration of the islets	✓	✓
Multiple beta-cell functional defects.	✓	✓
Maintenance of active proinsulin gene transcription and translation,	✓	✓
Normal proinsulin biosynthesis and processing	Unknown	✓
Slight decrease of beta-cell insulin content	✓	✓
Very modest signs of beta-cell ER stress	✓	Unknown
Markedly reduced activity of the insulin release mechanism, especially in response to glucose	✓	✓
Reduced GLUT2 expression	✓	No
Reduced glucokinase expression	Yes/no	No
Decreased islet glucose oxidation/glycolysis ratio	✓	✓
Reduced FAD-glycerophosphate dehydrogenase activity	✓	✓
Reduced glucose-induced mitochondrial membrane hyperpolarization	✓	✓
Lower ATP/ADP ratio in response to glucose	✓	✓
Impaired islet calcium metabolism	Unknown	✓
Decreased activation of islet PI kinases and phospholipase C by glucose	Unknown	✓
increase basal islet cAMP level, in relation to increased expression of AC1, AC2, AC3, G S, G olf	Unknown	✓
Increased expression of UCP-2	✓	✓
Increased islet levels of nitrotyrosine and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine	✓	✓
Reduced expression of manganese-superoxide and Cu/Zn superoxide dismutases	✓	No
Increased expression of catalase and glutathione peroxidase	✓	✓
Reduced expression of islet SNAREs and SNARE-modulating proteins: synaptotagmin, VAMP-2, syntaxin-1A,	✓	✓
SNAP-25, nSec1 and Munc 13-1		
Increased actin expression	✓	No
Major decrease (90%) in expression of the transcription factor ARNT (HIF1 )	✓	Unknown
Beta-cell responsiveness to sulfonylureas and GLP-1	✓	✓
Polygenic aetiology	✓	✓
Increased risk of T2D conferred by variants in TCF7L2	✓	Unknown
Enhanced islet expression of TCF7L2	✓	✓
Maternal hyperglycemia in pregnancy is an environmental risk factor for diabetes	✓	✓

insulin secretion by the GK/Par beta-cell (after weaning) is time-correlated with the exposure to the diabetic milieu. These changes in islet function could be ascribed, at least in part, to a loss of differentiation of beta-cells chronically exposed to even mild chronic hyperglycemia and elevated plasma non-esterified fatty acids. The view that the lack of beta-cell reactivity to glucose as seen during the adult period when the GK rats are hyperglycemic in the basal state, at least partly reflects an acquired defect ascribed to gluco-lipototoxicity, is supported by the reports that chronic treatment of GK rats with phlorizin partially improved glucose-induced insulin release (Nagamatsu et al., 1999; Gaisano et al., 2002; Ling et al., 2001; Portha et al., 2007), while hyperlipidemia induced by high-fat feeding markedly impaired insulin secretion (Briaud et al., 2002).

However, there are now convincing indications in the GK/Sto rat, that two distinct loci encode separately defects in beta-cell glucose metabolism and insulin exocytosis (Granhall et al., 2006). Generation of a series of congenic rat strains harboring different parts of GK/Sto-derived Niddm1i has recently enabled fine mapping of this locus. Congenic strains carrying the GK genotype distally in Niddm1i displayed reduced insulin secretion in response to both glucose and high potassium, as well as decreased single-cell exocytosis. Interestingly, the gene encoding for transcription factor TCF7L2 is also located in this locus and has recently been identified as a candidate gene for T2D in humans (Grant et al., 2006). However, TCF7L2 RNA levels were not different in this GK strain compared with controls (Granhall et al., 2006). By contrast, the strain carrying the GK genotype proximally in Niddm1i exhibited both intact insulin release in response to high potassium and intact single-cell exocytosis, but insulin secretion was suppressed when stimulated by glucose. Islets from this strain also failed to respond to glucose by increasing the cellular ATP-to-ADP ratio. Since the congenics had not developed overt hyperglycemia and their beta-cell mass was found normal, it was concluded their functional defects in glucose metabolism and insulin exocytosis were encoded by two distinct loci within Niddm1i (Granhall et al., 2006).

In conclusion, careful comparison of the alterations so far detected in the T2D human beta-cell population and those found in the diabetic GK beta-cell population (as it is summarized in Table 2), put into the front stage a number of striking commonalities. To the best of our knowledge, none of the rodent models of spontaneous T2D so far available have revealed so close appropriateness for modelling the human diabetic beta-cell. Of course, the GK beta-cell is not a blueprint for the diseased beta-cell in human. There are however sufficient similarities with high value, to justify more efforts to understand the aetiopathogenesis of T2D in this rat model.

## Acknowledgments

The GK studies done at UMR 7059 have been funded by the Centre National de la Recherche Scientifique, the French ANR (programme Physio 2006 – Prograbeta), the EFS/MSD European Foundation, MERCK-SERONO, French Diabetes Association and NEB Research Foundation. G. Lacraz is a recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

Abdel-Halim, S.M., Guenifi, A., Efendic, S., Östenson, C.-G., 1993. Both somatostatin and insulin responses to glucose are impaired in the perfused pancreas of the spontaneously non-insulin dependent diabetic GK (Goto-Kakizaki) rat. *Acta Physiol. Scand.* 148, 219–226.

Abdel-Halim, S.M., Guenifi, A., Luthman, H., Grill, V., Efendic, S., Östenson, C.G., 1994. Impact of diabetic inheritance on glucose tolerance and insulin secretion in spontaneously diabetic GK-Wistar rats. *Diabetes* 43, 281–288.

Abdel-Halim, S.M., Guenifi, A., Larsson, O., Berggren, P.O., Östenson, C.G., Efendic, S., 1996. Impaired coupling of glucose signal to the exocytotic machinery in diabetic GK rats; a defect ameliorated by cAMP. *Diabetes* 45, 934–940.

Abdel-Halim, S.M., Guenifi, A., He, B., Yang, B., Mustafa, M., Hojberg, B., Hillert, J., Bakhiet, M., Efendic, S., 1998. Mutations in the promoter of adenylyl cyclase (AC)-III gene, overexpression of AC-III mRNA, and enhanced cAMP generation in islets from spontaneously diabetic GK rat model of type-2 diabetes. *Diabetes* 47, 498–504.

Abella, A., Marti, L., Camps, M., Claret, M., Fernandez-Alvarez, J., Gomis, R., Guma, A., Viguier, N., Carpené, C., Palacin, M., Testar, X., Zorzano, A., 2003. Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 activity exerts an antidiabetic action in Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 52, 1004–1013.

Ahren, B., 2005. Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass. *Curr. Mol. Med.* 5, 275–286.

Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A.M., Purrello, F., Marchetti, P., 2005. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48, 282–289.

Atef, N., Portha, B., Penicaud, L., 1994. Changes in islet blood flow in rats with NIDDM. *Diabetologia* 37, 677–680.

Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Orci, L., 1979. Endocrine pancreas: three dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. *Science* 206, 1323–1325.

Briaud, I., Kelpel, C.L., Johnson, L.M., Tran, P.O., Poutout, V., 2002. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 51, 662–668.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P., 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.

Calderari, S., Gangnerau, M.N., Meile, M.J., Portha, B., Serradas, P., 2006. Is defective pancreatic beta-cell mass environmentally programmed in Goto Kakizaki rat model of type-2 diabetes? Insights from cross-breeding studies during the suckling period. *Pancreas* 33, 412–417.

Calderari, S., Gangnerau, M.N., Thibault, M., Meile, M.J., Alvarez, C., Kassis, N., Portha, B., Serradas, P., 2007. Defective IGF-2 and IGF-1R protein expressions in embryonic pancreas precede beta-cell mass anomaly in GK rat. *Diabetologia* 50, 1463–1471.

Carlsson, P.O., Jansson, L., Östenson, C.G., Kallskog, O., 1997. Islet capillary blood pressure increase mediated by hyperglycemia in NIDDM GK rats. *Diabetes* 46, 947–952.

Chen, J., Östenson, C.G., 2005. Inhibition of protein-tyrosine phosphatases stimulates insulin secretion in pancreatic islets of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* 30, 314–317.

Clark, A., Wells, C.A., Buley, I.D., Cruickshank, J.K., Vanhegan, R.I., Matthews, D.R., Cooper, G.J., Holman, R.R., Turner, R.C., 1988. Islet amyloid, increased alpha cells, reduced beta cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in pancreas in type-2 diabetes. *Diabetes Res.* 9, 151–160.

Dabelea, D., Pettitt, D.J., 2001. Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility. *J. Ped. Endocrinol. Metab.* 14, 1085–1091.

DeFronzo, R.A., 1988. Lilly Lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37, 667–687.

Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., Del Prato, S., Marchetti, P., 2005. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727–735.

Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.M., Frank, A., Veldedeoglu, E., Desai, N.M., Koeberlein, B., Wolf, B., Barker, C.F., Naji, A., Matschinsky, F.M., Markmann, J.F., 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53, 624–632.

Derda, D.F., Miles, M.F., Schweppe, J.S., Jungmann, R.A., 1980. Cyclic AMP regulation of lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 225, 11112–11121.

Dolz, M., Bailbé, D., Giroix, M.-H., Calderari, S., Gangnerau, M.N., Serradas, P., Rickenbach, K., Irminger, J.C., Portha, B., 2005. Restitution of defective glucose-stimulated insulin secretion in diabetic GK rat by acetylcholine uncovers paradoxical stimulatory effect of beta cell muscarinic receptor activation on cAMP production. *Diabetes* 54, 3229–3237.

Dolz, M., Bailbé, D., Movassat, J., Le Stunff, H., Kassis, K., Giroix, M.-H., Portha, B., 2006. Pivotal role of cAMP in the acute restitution of defective glucose-stimulated insulin release in diabetic GK rat by GLP-1. *Diabetes* 55 (Suppl. 1), A371.

Donath, M.Y., Halban, P.A., 2004. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581–589.

Duarte, A., Santos, M., Seica, R., Oliveira, C., 2004. Oxidative stress affects synaptosomal -aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats. The role of insulin. *Diabetes* 53, 2110–2116.

Duggirala, R., Blangero, J., Almasly, L., Dyer, T.D., Williams, K.L., Leach, R.J., O'Connell, P., Stern, M.P., 1999. Linkage of type 2 diabetes mellitus and of age at onset to a genetic location on chromosome 10q in Mexican Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1127–1140.

Ehses, J.A., Perren, A., Eppler, E., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K.J., Biollaz, G., Fontana, A., Reinecke, M., Homo-Delarche, F., Donath, M.Y., 2007a. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356–2370.

Ehses, J.A., Calderari, S., Irminger, J.C., Rickenbach, K., Serradas, S., Giroix, M.-H., Egli, A., Portha, B., Donath, M.Y., Homo-Delarche, F., 2007b. Islet Inflammation in type

- 2 diabetes: from endothelial to beta-cell dysfunction. *Curr. Immunol. Rev.* 3, 216–232.
- Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1999. Role of NADH shuttle system in glucose induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283, 981–985.
- Fernandez-Alvarez, J., Conget, I., Rasschaert, J., Sener, A., Gomis, R., Malaisse, W.J., 1994. Enzymatic, metabolic and secretory patterns in human islets of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 37, 177–181.
- Frayling, T.M., Mc Carthy, M.I., 2007. Genetic studies of diabetes following the advent of the genome-wide association study: where do we go from here? *Diabetologia* 50, 2229–2233.
- Gaisano, H.Y., Ostenson, C.G., Sheu, L., Wheeler, M.B., Efendic, S., 2002. Abnormal expression of pancreatic islet soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in GK rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 143, 4218–4226.
- Galli, J., Li, L.S., Glaser, A., Ostenson, C.G., Jiao, H., Fakhrai-Rad, H., Jacob, H.J., Lander, E.S., Luthman, H., 1996. Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat. Genet.* 12, 31–37.
- Gauguier, D., Nelson, I., Bernard, C., Parent, V., Marsac, C., Cohen, D., Froguel, P., 1994. Higher than paternal inheritance of diabetes in GK rats. *Diabetes* 43, 220–224.
- Gauguier, D., Froguel, P., Parent, V., Bernard, C., Bihoreau, M.T., Portha, B., James, M.R., Penicaud, L., Lathrop, M., Ktorza, A., 1996. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat. Genet.* 12, 38–43.
- Gepts, W., 1957. Contribution à l'étude morphologique des îlots de Langerhans au cours du diabète. *Ann. Soc. R. Sci. Med. Nat.* 10, 1.
- Gerich, J.E., 1998. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr. Rev.* 19, 491–503.
- Ghannat-Pour, H., Huang, Z., Lehtihet, M., Sjöholm, A., 2007. Global expression profiling of glucose-regulated genes in pancreatic islets of spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 135–150.
- Gill-Randall, R., Adams, D., Ollerton, R.L., Lewis, M., Alcolado, J.C., 2004. Type 2 diabetes mellitus – genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. *Diabetologia* 47, 1354–1359.
- Giroix, M.-H., Sener, A., Portha, B., Malaisse, W.J., 1993a. Preferential alteration of oxidative relative to total glycolysis in islets of rats with inherited or acquired non-insulin dependent diabetes. *Diabetologia* 36, 305–309.
- Giroix, M.-H., Vesco, L., Portha, B., 1993b. Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of non-insulin dependent diabetes. *Endocrinology* 132, 815–822.
- Giroix, M.-H., Sener, A., Bailbé, D., Leclercq-Meyer, V., Portha, B., Malaisse, W.J., 1993c. Metabolic, ionic and secretory response to D-glucose in islets from rats with acquired or inherited non-insulin dependent diabetes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50, 301–321.
- Giroix, M.-H., Saulnier, C., Portha, B., 1999. Decreased pancreatic islet response to L-leucine in the spontaneously diabetic GK rat: enzymatic, metabolic and secretory data. *Diabetologia* 42, 965–977.
- Goto, Y., Kakizaki, M., Masaki, N., 1975. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc. Jpn. Acad.* 51, 80–85.
- Goto, Y., Suzuki, K.-I., Sasaki, M., Ono, T., Abe, S., 1988. GK rat as a model of nonobese, noninsulindependent diabetes. Selective breeding over 35 generations. In: Shafir, E., Renold, A.E. (Eds.), *Lessons from Animal Diabetes*. Libbey, London, pp. 301–303.
- Granhall, C., Rosengren, A.H., Renström, E., Luthman, H., 2006. Separately inherited defects in insulin exocytosis and beta-cell glucose metabolism contribute to type 2 diabetes. *Diabetes* 55, 3494–3500.
- Grant, S.F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Magnusson, K.P., Walters, G.B., Palsdóttir, E., Jónsdóttir, T., Gudmundsdóttir, T., Gylfason, A., Saemundsdóttir, J., Wilensky, R.L., Reilly, M.P., Rader, D.J., Bagger, Y., Christiansen, C., Gudnason, V., Sigurdsson, G., Thorsteinsdóttir, U., Gulcher, J.R., Kong, A., Stefansson, K., 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 38, 320–323.
- Gueniff, A., Abdel-Halim, S.M., Höög, A., Falkmer, S., Ostenson, C.G., 1995. Preserved beta-cell density in the endocrine pancreas of young, spontaneously diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Pancreas* 10, 148–153.
- Gueniff, A., Simonsson, E., Karlsson, S., Ahren, B., Abdel-Halim, S.M., 2001. Carbachol restores insulin release in diabetic GK rat islets by mechanisms largely involving hydrolysis of diacylglycerol and direct interaction with the exocytotic machinery. *Pancreas* 22, 164–171.
- Guest, P.C., Abdel-Halim, S.M., Gross, D.J., Clark, A., Poutout, V., Amaria, R., Ostenson, C.G., Hutton, J.C., 2002. Proinsulin processing in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *J. Endocrinol.* 175, 637–647.
- Guiot, Y., Sempoux, C., Moulin, P., Rahier, J., 2001. No decrease of the beta-cell mass in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50 (Suppl. 1), S188.
- Gunton, J.E., Kulkarni, R.N., Yim, S.H., Okada, T., Hawthorne, W.J., Tseng, Y.H., Robertson, R.S., O'Connell, P.J., Ricordi, C., Gonzalez, F.J., Kahn, C.R., 2005. Loss of ARNT/HIF1 beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337–349.
- Gutniak, M., Orskov, C., Holst, J.J., Ahren, B., Efendic, S., 1992. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide 1 (7–36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 326, 1316–1322.
- Hellerström, C., 1984. The life story of the pancreatic beta cell. *Diabetologia* 26, 393–400.
- Homo-Delarche, F., Calderari, S., Irminger, J.C., Rickenbach, K., Gangnerau, M.N., Coulaud, J., Dolz, M., Halban, P., Portha, B., Serradas, S., 2006. Islet Inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes* 55, 1625–1633.
- Hughes, S.J., Suzuki, K., Goto, Y., 1994. The role of islet secretory function in the development of diabetes in the GK Wistar rat. *Diabetologia* 37, 863–870.
- Hughes, S.J., Faehling, M., Thorneley, C.W., Proks, P., Ashcroft, F.M., Smith, P.A., 1998. Electrophysiological and metabolic characterization of single beta-cells and islets from diabetic GK rats. *Diabetes* 47, 73–81.
- Ihara, Y., Toyokuni, S., Uchida, K., Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiai, H., Seino, Y., Yamada, Y., 1999. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 927–932.
- Ihara, Y., Yamada, Y., Toyokuni, S., Miyawaki, K., Ban, N., Adachi, T., Kuroe, A., Iwakura, T., Kubota, A., Hiai, H., Seino, Y., 2000. Antioxidant alpha-tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. *FEBS Lett.* 473, 24–26.
- Jones, L.C., Clark, A., 2001. Beta-cell neogenesis in type 2 diabetes 50 (Suppl. 1), 186–187.
- Kahn, S., 2001. The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4047–4058.
- Kloppel, G., Löhr, M., Habich, K., Oberholzer, M., Heitz, P.U., 1985. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv. Synth. Pathol. Res.* 4, 110–125.
- Kowluru, A., 2003. Defective protein histidine phosphorylation in islets from the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Am. J. Physiol.* 285, E498–E503.
- Krauss, S., Zhang, C.Y., Scorrano, L., Dalgaard, L.T., St-Pierre, J., Grey, S.T., Lowell, B.B., 2003. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta-cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* 112, 1831–1842.
- Laakso, M., 2007. Challenges in studies of the genetic basis of type 2 diabetes. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2, 451–459.
- Lewis, B., Ismail, I., Issa, B., Peters, J.R., Scanlon, M.F., 1996. Desensitization of somatostatin, TRH and GHRH responses to glucose in the diabetic GK rat hypothalamus. *J. Endocrinol.* 151, 13–17.
- Lin, J.M., Ortsäter, H., Fakhraid-Rad, H., Galli, J., Luthman, H., Bergsten, P., 2001. Phenotyping of individual pancreatic islets locates genetic defects in stimulus secretion coupling to Niddm1i within the major diabetes locus in GK rats. *Diabetes* 50, 2737–2743.
- Lin, J.M., Fabregat, M.E., Gomis, R., Bergsten, P., 2002. Pulsatile insulin release from islets isolated from three subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 988–993.
- Ling, Z.C., Efendic, S., Wibom, R., Abdel-halim, S.M., Ostenson, C.G., Landau, B.R., Khan, A., 1998. Glucose metabolism in Goto-Kakizaki rat islets. *Endocrinology* 139, 2670–2675.
- Ling, Z.C., Hong-Lie, C., Ostenson, C.G., Efendic, S., Khan, A., 2001. Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islets. *Diabetes* 50 (Suppl. 1), 108–112.
- Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melandar, M., Almgren, P., Sjogren, M., Ling, C., Eriksson, K.F., Lethagen, A.L., Mancarella, R., Berglund, G., Tuomi, T., Nilsson, P., Del Prato, S., Groop, L., 2007. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 117, 215562163.
- MacDonald, M.J., Efendic, S., Ostenson, C.-G., 1996. Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of the GK rat. *Diabetes* 45, 886–890.
- Maclean, N., Ogilvie, R., 1955. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* 4, 367–376.
- Marchetti, P., Del Guerra, S., Marselli, L., Lupi, R., Masini, M., Pollera, M., Bugliani, M., Boggi, U., Vistoli, F., Mosca, F., Del Prato, S., 2004. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional effects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5535–5541.
- Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Boggi, U., Weir, G.C., Eizirik, D., Cnop, M., 2007. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50, 2486–2494.
- Marie, J.C., Bailbé, D., Gylfe, E., Portha, B., 2001. Defective glucose-dependent cytosolic Ca<sup>2+</sup> handling in islets of GK and nSTZ rat models of type2 diabetes. *J. Endocrinol.* 169, 169–176.
- Metz, S.A., Meredith, M., Vadakekalam, J., Rabaglia, M.E., Kowluru, A.A., 1999. A defect late in stimulus secretion coupling impairs insulin secretion in Goto-Kakizaki diabetic rats. *Diabetes* 48, 1754–1762.
- Miralles, F., Portha, B., 2001. Early development of beta-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50 (Suppl. 1), 84–88.
- Mosén, H., Salehi, A., Alm, P., Henningsson, R., Jimenez-Felststrom, J., Ostenson, C.G., Efendic, S., Lundquist, I., 2005. Defective glucose-stimulated insulin release in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rat coincides with reduced activity of the islet carbon monoxide signaling pathway. *Endocrinology* 146, 1553–1558.
- Movassat, J., Portha, B., 1999. Beta-cell growth in the neonatal Goto-Kakizaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia* 42, 1098–1106.
- Movassat, J., Calderari, S., Fernández, E., Martín, M.A., Escrivá, F., Plachot, C., Gangnerau, M.N., Serradas, P., Álvarez, C., Portha, B., 2007. Type 2 diabetes—a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes Obesity Metabolism* 9, 187–195.
- Movassat, J., Saulnier, C., Serradas, P., Portha, B., 1997. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 40, 916–925.

- Nagamatsu, S., Nakamichi, Y., Yamamura, C., Matsushima, S., Watanabe, T., Azawa, S., Furukawa, H., Ishida, H., 1999. Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: Restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* 48, 2367–2373.
- Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Kikuta, T., Nagai, S., Nakamichi, Y., Nagamatsu, S., 2004. TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic beta-cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat beta-cells. *Biochem. J.* 381, 13–18.
- O'Brien, T.D., Butler, A.E., Roche, P.C., Johnson, K.H., Butler, P.C., 1994. Islet amyloid polypeptide in human insulinomas: evidence for intracellular amyloidogenesis. *Diabetes* 43, 329–336.
- Ohneda, M., Johnson, J.H., Inman, L.R., Chen, L., Suzuki, K.I., Goto, Y., Alam, T., Ravazzola, M., Orci, L., Unger, R.H., 1993. GLUT2 expression and function in beta-cells of GK rats with NIDDM. *Diabetes* 42, 1065–1072.
- Okamoto, Y., Ishida, H., Tsuura, Y., Yasuda, K., Kato, S., Matsubara, H., Nishimura, M., Mizuno, N., Ikeda, H., Seino, Y., 1995. Hyperresponse in calcium-induced insulin release from electrically permeabilized pancreatic islets of diabetic GK rats and its defective augmentation by glucose. *Diabetologia* 38, 772–778.
- Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Amherdt, M., Ravazzola, M., Weisswange, A., Dobbs, R., Perrelet, A., Unger, R., 1975. Cell contacts in human islets of Langerhans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 841–844.
- Östenson, C.G., Abdel-Halim, S.M., Rasschaert, J., Malaisse-Lagae, F., Meuris, S., Sener, A., Efendic, S., Malaisse, W.J., 1993a. Deficient activity of FAD-linked glycerophosphate dehydrogenase in islets of GK rats. *Diabetologia* 36, 722–726.
- Östenson, C.G., Khan, A., Abdel-Halim, S.M., Guenifi, A., Suzuki, K., Goto, Y., Efendic, E., 1993b. Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islets from the spontaneously diabetic GK rat. *Diabetologia* 36, 3–8.
- Östenson, C.G., 2001. The Goto-Kakizaki rat. In: Sima, A.A.F., Shafir, E. (Eds.), *Animal Models of Diabetes: A Primer*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 197–211.
- Östenson, C.G., Sandberg-Nordqvist, A.C., Chen, J., Hallbrink, M., Rotin, D., Langel, U., Efendic, S., 2002. Overexpression of protein tyrosine phosphatase PTP sigma is linked to impaired glucose-induced insulin secretion in hereditary diabetic Goto-Kakizaki rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 945–950.
- Ostenson, C., Gaisano, H., Sheu, L., Tibell, A., Bartfai, T., 2006. Impaired gene and protein expression of exocytotic soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor complex proteins in pancreatic islets of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 55, 435–440.
- Plachot, C., Movassat, J., Portha, B., 2001. Impaired beta-cell regeneration after spatial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type 2 diabetes. *Histochem. Cell. Biol.* 116, 131–139.
- Polonsky, K.S., Given, B.D., Hirsch, L.J., Tillil, H., Shapiro, E.T., Beebe, C., Frank, B.H., Galloway, J.A., Van Cauter, E., 1998. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 318, 1231–1239.
- Portha, B., Serradas, P., Bailbé, D., Suzuki, K., Goto, Y., Giroix, M.-H., 1991. beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes* 40, 486–491.
- Portha, B., Giroix, M.-H., Serradas, P.P., Gangnerau, M.N., Movassat, J., Rajas, F., Bailbé, D., Plachot, C., Mithieux, G., Marie, J.C., 2001. Beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat. Information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50, 89–93.
- Portha, B., 2005. Programmed disorders of beta-cell development and function as one cause for type 2 diabetes? The GK rat paradigm. *Diab. Metab. Res. Rev.* 21, 495–504.
- Portha, B., Lacraz, G., Dolz, M., Giroix, M.H., Homo-Delarche, F., Movassat, J., 2007. Defective functional beta-cell mass and type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2, 785–795.
- Rahier, J., Goebbels, R.M., Henquin, J.C., 1983. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24, 366–371.
- Rhodes, C.J., 2005. Type 2 diabetes – a matter of beta-cell life and death? *Science* 307, 380–384.
- Saito, K., Yaginuma, N., Takahashi, T., 1979. Differential volumetry of A, B and D cells in the pancreatic islets of diabetic and nondiabetic subjects. *Tohoku J. Exp. Med.* 129, 273–283.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., Yagihashi, S., 2002. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85–96.
- Salehi, A., Henningson, R., Mosén, H., Ostenson, C.G., Efendic, S., Lundquist, I., 1999. Dysfunction of the islet lysosomal system conveys impairment of glucose-induced insulin release in the diabetic GK rat. *Endocrinology* 140, 3045–3053.
- Schmitz, O., Brock, B., Hollingdal, M., Juhl, C.B., Porsken, N., 2002. High-frequency insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. *Diabetes Metab.* 28, 4S14–4S20.
- Sempoux, C., Guiot, Y., Dubois, D., Moulin, P., Rahier, J., 2001. Morphological evidence for abnormal beta-cell function. *Diabetes* 50 (Suppl. 1), S172–S177.
- Sener, A., Ladrrière, L., Malaisse, W.J., 2001. Assessment by D-[(3)H]mannoheptulose uptake of B-cell density in isolated pancreatic islets from Goto-Kakizaki rats. *Int. J. Mol. Med.* 8, 177–180.
- Serradas, P., Goya, L., Lacorne, M., Gangnerau, M.N., Ramos, S., Alvarez, C., Pascual-Leone, A.M., Portha, B., 2002. Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 392–397.
- Serradas, P., Gangnerau, M.N., Giroix, M.H., Saulnier, C., Portha, B., 1998. Impaired pancreatic beta cell function in the fetal GK rat. Impact of diabetic inheritance. *J. Clin. Invest.* 101, 899–904.
- Serradas, P., Giroix, M.-H., Saulnier, C., Gangnerau, M.N., Borg, L.A.H., Welsh, M., Portha, B., Welsh, N., 1995. Mitochondrial DNA content is specifically decreased in adult, but not fetal, pancreatic islets of the GK rat, a genetic model of non-insulin dependent diabetes. *Endocrinology* 136, 5623–5631.
- Shang, W., Yasuda, K., Takahashi, A., Hamasaki, A., Takehiro, M., Nabe, K., Zhou, H., Naito, R., Fujiwara, H., Shimono, D., Ueno, H., Ikeda, H., Toyoda, K., Yamada, Y., Kurose, T., 2002. Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* 25, 393–399.
- Simmons, R., 2006. Developmental origins of adult metabolic disease. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 35, 193–204.
- Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., Unger, R.H., 1982. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31, 694–700.
- Suzuki, K.-I., Goto, Y., Toyota, T., 1992. Spontaneously diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. In: Shafir, E. (Ed.), *Lessons from Animal Diabetes*. Smith-Gordon, London, pp. 107–116.
- Suzuki, N., Aizawa, T., Asanuma, N., Sato, Y., Komatsu, M., Hidaka, H., Itoh, N., Yamauchi, K., Hashizume, K., 1997. An early insulin intervention accelerates pancreatic beta-cell dysfunction in young Goto-Kakizaki rats, a model of naturally occurring noninsulin-dependent diabetes. *Endocrinology* 138, 1106–1110.
- Svensson, A.M., Östenson, C.G., Sandler, S., Efendic, S., Jansson, L., 1994. Inhibition of nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine causes a preferential decrease in pancreatic islet blood flow in normal rats and spontaneously diabetic GK rats. *Endocrinology* 135, 849–853.
- Svensson, A.M., Ostenson, C.G., Jansson, L., 2000. Age-induced changes in pancreatic islet blood flow: evidence for an impaired regulation in diabetic GK rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E1139–E1144.
- Tsuura, Y., Ishida, H., Okamoto, Y., Kato, S., Sakamoto, K., Horie, M., Ikeda, H., Okada, Y., Seino, Y., 1993. Glucose sensitivity of ATP-sensitive Kchannels is impaired in beta-cells of the GK rat. A new genetic model of NIDDM. *Diabetes* 42, 1446–1453.
- Villar-Palasi, C., Farese, R., 1994. Impaired skeletal muscle glycogen synthesis activation by insulin in the Goto-Kakizaki (GK) rat. *Diabetologia* 37, 885–888.
- Wallis, R.H., Wallace, K.J., Collins, S.C., Mc Ateer, M., Argoud, K., Bihoreau, M.T., Kaisaki, P.J., Gauguier, D., 2004. Enhanced insulin secretion and cholesterol metabolism in congenic strains of the spontaneously diabetic (type2) Goto Kakizaki rat are controlled by independent genetic loci in rat chromosome 8. *Diabetologia* 47, 1096–1106.
- Warwar, N., Efendic, S., Östenson, C.G., Haber, E.P., Cerasi, E., Nesher, R., 2006. Dynamics of glucose-induced localization of PKC isoenzymes in pancreatic beta-cells. Diabetes-related changes in the GK rat. *Diabetes* 55, 590–599.
- Weir, G., Bonner-Weir, S., 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 (Suppl.), S16–S21.
- Westermarck, P., Wilander, E., 1978. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15, 417–421.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D., Prateley, R., 1999. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 104, 787–794.
- Wittingen, J., Frey, C.F., 1974. Islet concentration in the head, body, tail and uncinate process of the pancreas. *Ann. Surg.* 412–414.
- Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., Lee, J.M., Son, H.Y., Kang, S.K., Kim, H.S., Lee, I.K., Bonner-Weir, S., 2003. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 8, 2300–2308.
- Zhang, W., Khan, A., Ostenson, C., Berggren, P.O., Efendic, S., Meister, B., 2002. Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1038–1044.
- Zhao, H.L., Lai, F., Tong, P., Zhong, D.R., Yang, D., Tomlinson, B., Chan, J., 2003. Prevalence and clinicopathological characteristics of islet amyloid in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 2759–2766.
- Zhou, Y.P., Ostenson, C., Ling, Z.C., Grill, V., 1995. Deficiency of pyruvate dehydrogenase activity in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Endocrinology* 136, 3546–3551.





# Defective functional $\beta$ -cell mass and Type 2 diabetes in the Goto–Kakizaki rat model

Bernard Portha<sup>†</sup>, G Lacraz, M Dolz, F Homo-Delarche, M-H Giroix and J Movassat

Increasing evidence indicates that decreased functional  $\beta$ -cell mass is the hallmark of Type 2 diabetes mellitus. Therefore, the debate focuses on the possible mechanisms responsible for an abnormal islet microenvironment, decreased  $\beta$ -cell number, impaired  $\beta$ -cell function and their multifactorial etiologies. The information available on the Goto–Kakizaki/Par rat line, one of the best characterized animal models of spontaneous Type 2 diabetes mellitus, are reviewed in such a perspective. We propose that the defective  $\beta$ -cell mass and function in the Goto–Kakizaki/Par model reflect the complex interactions of multiple pathogenic players, including several independent loci containing genes responsible for some diabetic traits (but not decreased  $\beta$ -cell mass), gestational metabolic impairment inducing an epigenetic programming of the pancreas (decreased  $\beta$ -cell neogenesis), which is transmitted to the next generation, and loss of  $\beta$ -cell differentiation due to chronic exposure to hyperglycemia, inflammatory mediators, oxidative stress and perturbed islet microarchitecture.

*Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2(6), 785–795 (2007)

Type 2 diabetes mellitus (DM) arises when the endocrine pancreas fails to secrete sufficient insulin to cope with the metabolic demand (review in [1]) owing to  $\beta$ -cell secretory dysfunction and/or decreased  $\beta$ -cell mass. Whether insulin secretory dysfunction is a cause or consequence of the disease is still debated, but there is mounting evidence that it may reflect changes in  $\beta$ -cell mass [2–7]. Although proposed nearly 50 years ago [8,9], the hypothesis that  $\beta$ -cell loss plays an important role in the pathogenesis of Type 2 DM has only recently come to the fore [1,2,10]. Type 2 DM is in fact made up of multiple forms, each of which is characterized to variable degrees by insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction, and which together lead to hyperglycemia. At each end of the spectrum are single-gene disorders that affect the ability of the  $\beta$ -cell to secrete insulin or the ability of the liver, muscle and fat cells to respond to insulin's actions.

patients is limited. Several groups have recently reported multiple abnormalities of insulin secretion in islets isolated from Type 2 DM donors, such as reduced insulin content, poor secretion in response to glucose (whereas leucine, glutamine or arginine challenge remained effective) associated with a marked alteration of mitochondrial function (diminished glucose oxidation, lower ATP:ADP ratio, impaired hyperpolarization of mitochondrial membrane and increased expression of uncoupling protein-2) and signs of increased oxidative stress [3–7].

Structural changes in the islets of Type 2 DM subjects have also been described, including arteriosclerosis, the deposition of amyloid-associated fibrosis and fat infiltrations [5,6].

All these stigmata may reflect the inability of the  $\beta$ -cell to adapt in the context of peripheral resistance. Hyperglycemia itself has been implicated to be toxic to  $\beta$ -cells, thus a self-reinforcing cycle of glucose intolerance and progressive  $\beta$ -cell injury could contribute to the progression of the disease. Whether insulin secretory dysfunction is a

## $\beta$ -cell mass dysfunction as a cause for human Type 2 DM

To date, information related to the functional characteristics of islets from Type 2 DM

## CONTENTS

$\beta$ -cell mass dysfunction as a cause for human Type 2 DM

GK rat model of spontaneous Type 2 DM

$\beta$ -cell population failure in the diabetic GK/Par rat

Expert commentary

Five-year view

Financial & competing interests disclosure

Key issues

References

Affiliations

<sup>†</sup>Author for correspondence  
Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, CNRS UMR 7059, Université Paris-Diderot, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France  
Tél.: +33 144 275 011  
Fax: +33 144 277 891  
[portha@univ-paris-diderot.fr](mailto:portha@univ-paris-diderot.fr)

**KEYWORDS:**  
 $\beta$ -cell, development, epigenetic, genetic, glucotoxicity, Goto–Kakizaki rat, inflammation, metabolic programming, neogenesis, oxidative stress, Type 2 diabetes

cause or consequence of the disease is still debated, but there is mounting evidence that it may be symptomatic of changes in  $\beta$ -cell mass.

Indeed, recent convincing studies utilizing postmortem and surgical pancreas specimens have provided valuable information on the pathogenesis of islet  $\beta$ -cell failure in Type 2 DM [4–7]. Among these is a landmark study of  $\beta$ -cell volume together with markers of  $\beta$ -cell proliferation and apoptosis in unaffected subjects and those with impaired fasting glucose (IFG) and Type 2 DM [5]. The study reported a 40 and 63% loss of islet  $\beta$ -cell volume in IFG and Type 2 DM obese subjects, respectively, compared with weight-matched controls. Lean Type 2 DM subjects had a 41% loss of  $\beta$ -cell volume compared with lean controls. Furthermore, the decreased volume was not a consequence of reduced  $\beta$ -cell proliferation but was associated with increased  $\beta$ -cell death by apoptosis. However, even if accelerated, the rate of  $\beta$ -cell apoptosis in Type 2 DM rarely progresses to near-complete loss, which leads to ketosis, even after decades of the disease. Although it is often assumed that accelerated apoptosis of  $\beta$ -cells is important for the pathogenesis of Type 2 DM, limitations in  $\beta$ -cell replication and/or neogenesis could be just as important. It is remarkable that, despite the decreased total pancreatic  $\beta$ -cell mass, the percentage of  $\beta$ -cells within isolated islets was only slightly reduced (by 10%) in Type 2 DM patients compared with controls [3]. Moreover, the fact that loss of  $\beta$ -cell mass was evident in subjects with IFG suggests that  $\beta$ -cell mass changes are not necessarily confined to late-stage Type 2 DM. Taken together, these findings underscore the structural and functional abnormalities in islet tissue of Type 2 DM subjects. It is also important to note that these studies in humans cannot supply prospective information, given that they were carried out at autopsy. The  $\beta$ -cell mass in these patients before onset of the disease is unknown. Thus, individuals susceptible to diabetes possibly have limited  $\beta$ -cell mass early in life, maybe even *in utero*, due to genetic or environmental factors. If such were the case, the decrease in  $\beta$ -cell mass, as seen once Type 2 DM is present, would not necessarily be the consequence of the disease itself.

In summary, now that the reduction in  $\beta$ -mass has been repeatedly established in humans with Type 2 DM, the debate focuses on the possible mechanisms responsible for decreased  $\beta$ -cell number and impaired  $\beta$ -cell function and their multifactorial etiology.

Hazard of invasive sampling and lack of suitable noninvasive methods to evaluate  $\beta$ -cell mass and functions are strong limitations for studies of the living pancreas in humans. Thus, appropriate rodent models are essential tools for identification of the mechanisms that increase the risk of abnormal  $\beta$ -cell mass/function and of Type 2 DM. Some answers to these major questions are available from studies using the Goto-Kakizaki (GK) rat model of Type 2 DM and they are reviewed in this paper. The GK rat is a nonobese substrain of Wistar rat origin, developing Type 2 DM early in life. Mild fasting hyperglycemia and postprandial glucose intolerance are primarily

due to impaired  $\beta$ -cell mass and function on the background of a polygenic inheritance. In addition, secondary defects in  $\beta$ -cell function and insulin action may superimpose (i.e., owing to chronic hyperglycemia [glucotoxicity]). Since the GK rat can be regarded as one of the best available rodent strains for the study of inherited Type 2 DM, it is extensively used in preclinical diabetes research.

#### GK rat model of spontaneous Type 2 DM

The GK line was established by repeated inbreeding from Wistar rats selected at the upper limit of normal distribution for glucose tolerance (FIGURE 1) [11–13].

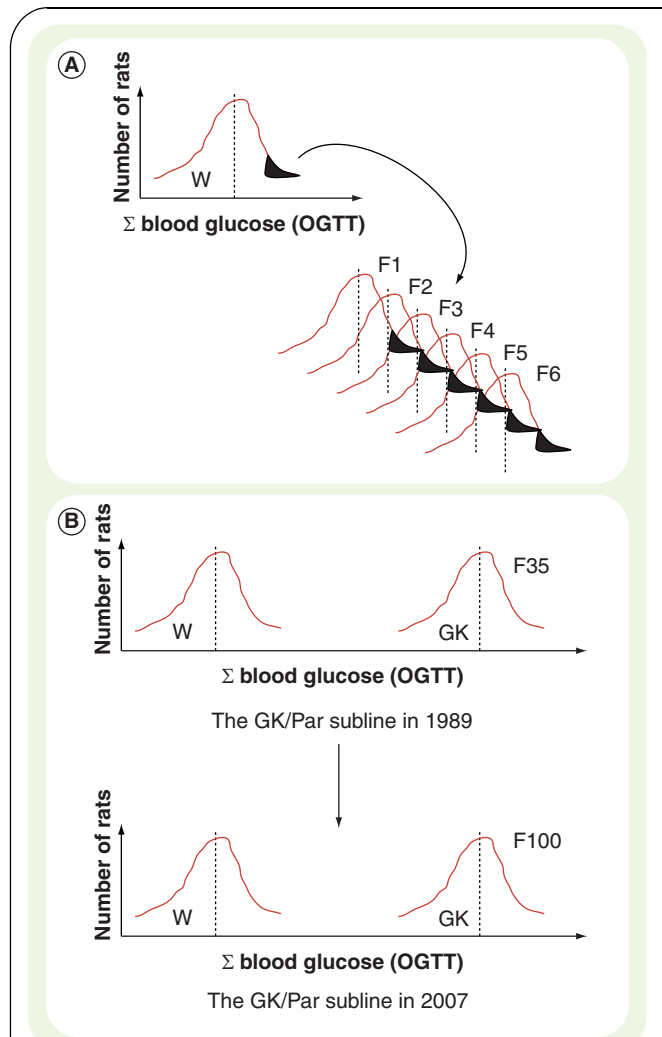


Figure 1. The Goto–Kakizaki rat line (Wistar strain) has been produced by Goto and colleagues in Tohoku University, Sendai, Japan, by selective breeding over many generations from a nondiabetic Wistar rat colony on the basis of glucose intolerance [11]. The diabetic state was reported to become stable after 30 generations of selective crosses. The distribution of the sum of blood glucose values is shown ( $\Sigma$  blood glucose) during a standardized OGTT in original parent Wistar rats, in (A) rats from generations F1 to F35 in the original Japanese colony and (B) in rats from generations F35 to F100 bred under our conditions in Paris from 1989 (subline GK/Par).

F: Generation; GK: Goto–Kakizaki; OGTT: Oral glucose tolerance test; W: Wistar.

The adult GK/Par body weight is 10–30% lower than that of age- and sex-matched control animals. In male GK/Par rats, nonfasting plasma glucose levels are typically 10–14 nM (6–8 nM in age-matched Wistar outbred controls). In GK/Par females, somewhat lower plasma glucose concentrations are noted. During the long-term inbreeding of the GK/Par rat subline within our colony (18 years), the animals maintained rather stable levels of glucose intolerance and impairment of glucose-induced insulin response (FIGURE 2). Nonfasting plasma insulin levels in GK rats from the different colonies were found to be similar or somewhat increased compared with age-matched controls [13]. However, other characteristics, such as  $\beta$ -cell number, insulin content and islet metabolism, were reported to vary between different colonies, suggesting that different local breeding environments and/or newly introduced genetic changes account for contrasting phenotypic properties, but it is not clear whether the reported differences are artefactual or true.

FIGURE 2 summarizes the GK/Par rat pathogenic sequence culminating in the chronic hyperglycemia at adult age.

**$\beta$ -cell population failure in the diabetic GK/Par rat**  
**Less  $\beta$ -cells within a perturbed islet microenvironment**

In the adult GK/Par, total pancreatic  $\beta$ -cell mass and pancreatic insulin stores are similarly decreased (by 60%) [12,14]. This alteration of the  $\beta$ -cell population cannot be ascribed to increased  $\beta$ -cell apoptosis but is related, at least partly, to significantly decreased  $\beta$ -cell replication [12]. The islets isolated by standard collagenase procedure from adult GK/Par pancreases show limited decreased  $\beta$ -cell number (by only 15%) and low insulin content compared with control islets [15]. The islet DNA content was decreased to a similar extent, consistent with our morphometric data, which indicate that there is no major change in the relative contribution of  $\beta$ -cells to total endocrine cells in the GK islets. In addition, the insulin content, when expressed relative to DNA, remains lower in GK islets than in control (inbred Wistar/Par) islets, which supports some degranulation in the  $\beta$ -cells of diabetic animals [15].

Moreover, the adult GK/Par pancreas exhibits two different populations of islets *in situ*: large islets that are disrupted by connective tissue [12] and display heterogeneity in the staining of the  $\beta$ -cells; and small islets with heavily stained  $\beta$ -cells and normal architecture.

Chronic inflammation has received increasing attention in recent years as an important pathophysiological mechanism in human Type 2 DM and it could also affect pancreatic  $\beta$ -cells [1]. Using an Affymetrix microarray approach to evaluate islet gene expression in adult GK/Par islets, we found that 34% of the 71 genes

found to be overexpressed belong to the inflammatory/immune response gene family, and 24% belong to the extracellular matrix (ECM)/cell adhesion gene family [16]. As published recently, numerous macrophages (CD68<sup>+</sup> and MHC class II<sup>+</sup>) and granulocytes were found in and around adult GK/Par islets (FIGURE 3) [16]. Immunolocalization with antifibronectin and anti-von Willebrand factor antibodies indicated that ECM deposition progresses from intra- to peri-islet vessels, as happens in microangiopathy. These data demonstrate that a marked inflammatory reaction accompanies GK/Par islet fibrosis and suggest that islet alterations develop in a way reminiscent of microangiopathy. The previous reports by our group and others that abnormal blood flow and altered vascularization are present in the GK model are consistent with such a view [17–19].

**Limited expansion of  $\beta$ -cell mass as a consequence of chronic  $\beta$ -cell neogenesis limitation**

Careful follow-up of the animals after delivery revealed that GK/Par pups become overtly hyperglycemic for the first time as early as 3–4 weeks of age (i.e., during the weaning period). Despite normoglycemia, total  $\beta$ -cell mass was clearly decreased (by 60%) in the GK pups when compared with age-related Wistar pups (FIGURE 2) [14]. Since this early  $\beta$ -cell growth retardation in the prediabetic GK/Par rat pups cannot be ascribed to decreased  $\beta$ -cell replication, nor to increased apoptosis [14], we postulated that the recruitment of new  $\beta$ -cells from the precursor pool ( $\beta$ -cell neogenesis) was defective in the young prediabetic GK/Par rat.

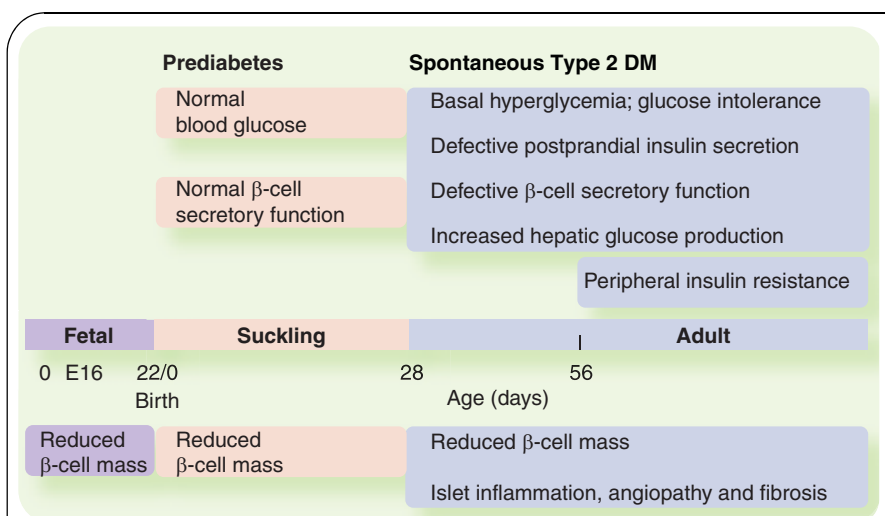


Figure 2. The time-course of diabetes in the GK/Par rat model. Males and females are similarly affected and their diabetic state is stable over 72 weeks of follow-up [12]. In adult GK rats, plasma insulin release *in vivo* in response to intravenous glucose is abolished. *In vitro* studies of insulin release with the isolated perfused pancreas or with perfused islets indicate that both the early and late phases of glucose-induced insulin release are markedly affected in the adult GK rat. Concerning insulin action in adult GK rats, decreased insulin sensitivity has been reported in the liver, in parallel to moderate insulin resistance in extrahepatic tissues (muscles and adipose tissues). Hyperglycemia is preceded by a period of normoglycemia, ranging from birth to weaning. Therefore, during this period, the young GK/Par rats can be considered to be prediabetic.

0: Day of conception; DM: Diabetes mellitus; E: Embryonic age; GK: Goto-Kakizaki.

A meaningful set of data from our group suggests that the permanently reduced  $\beta$ -cell mass in the GK/Par model indeed reflects a limitation of  $\beta$ -cell neogenesis during early fetal life and thereafter [20–23].

A comparative study of the development of GK/Par and Wistar pancreases indicates that the  $\beta$ -cell deficit (reduced by >50%) starts as early as fetal age 16 days (E16) [21]. During the time-window E16–E20, we detected an unexpected anomaly of proliferation and apoptosis of undifferentiated ductal cells in the GK pancreatic rudiments [21,23]. Therefore, the decreased cell proliferation and survival in the ductal compartment of the pancreas where the putative endocrine precursor cells localize suggests that the impaired development of the  $\beta$ -cell in the GK fetus could result from the failure of the proliferative and survival capacities of the endocrine precursor cells. Importantly, recent data from our group indicate that defective signaling through the IGF2/IGF1-receptor (IGF1-R) pathway represents a primary anomaly since IGF2 and IGF1-R protein expressions are already decreased within the GK pancreatic rudiment at E13.5, at a time when  $\beta$ -cell mass (first wave of  $\beta$ -cell expansion) is in fact normal [23]. Low levels of pancreatic IGF2 associated with  $\beta$ -cell mass deficiency is maintained thereafter within the fetal pancreas [24]. We also have unpublished data related to cross-breeding protocols between nondiabetic Wistar and diabetic GK rats: at E18.5, IGF2 protein expression is low in GK/GK, Wistar/GK and GK/Wistar pancreata, and similar low values are found in E18.5 crossed Wistar/GK and GK/Wistar fetuses, these values being similar to those observed in GK/GK fetuses of the same age. These findings rather support the hypothesis that the pancreatic IGF2 anomaly in the GK diabetic model is linked to a genetic determinant. This view is also consistent with the results of genetic analyses that linked a locus containing the gene encoding *Igf2* to diabetes in the GK rat [25]. The *Igf2* gene is subjected to paternal genomic imprinting [26]. However, because the *Igf2* expression is similarly affected in fetuses, regardless of whether the father is Wistar or GK, we cannot conclude to a simple change of *Igf2* gene imprinting in the GK rat.

In order to evaluate the capacity for  $\beta$ -cell compensatory growth later on, in this case during the neonatal period, we took advantage of our report that the destruction of the  $\beta$ -cell mass subsequent to streptozotocin (STZ) injection in the neonatal rat is followed by spontaneous regeneration through both differentiation of precursor cells (neogenesis) and increased proliferation of surviving  $\beta$ -cells [20]. Using this approach, we have shown that the regeneration capacity of the  $\beta$ -cell mass was impaired in STZ-treated newborn GK/Par rats. Since the index of  $\beta$ -cell proliferation in the STZ-treated GK/Par and Wistar neonates was identical and because the  $\beta$ -cell apoptotic rate remained minimal in both groups, it was concluded that the impaired  $\beta$ -cell regeneration of the GK/Par pancreas during the postnatal period results from defective neogenesis [20].

A similar conclusion was also drawn at adult age, from duct-cell remodeling and  $\beta$ -cell regeneration investigations after partial pancreatectomy in the adult GK/Par rat [22]. Ductal

proliferation and subsequent differentiation into both endocrine and exocrine cells has been described as an important active process during the first few days after pancreatectomy in nondiabetic rats. We therefore investigated the  $\beta$ -cell neof ormation from ducts by quantitation of single  $\beta$ -cells located in duct epithelium and  $\beta$ -cell clusters in close contact with ducts in the whole pancreas and also more specifically within focal areas of regeneration. Analysis of foci of regeneration clearly showed that, in the GK/pancreatectomy groups, contribution of  $\beta$ -cell regeneration within foci, compared with total  $\beta$ -cell neof ormation from ducts, was dramatically lower compared with Wistar/pancreatectomy rats.

Altogether, these data are consistent with the notion that poor proliferation and/or survival of the endocrine precursors during fetal, neonatal and adult life will result in a decreased pool of endocrine precursors in the pancreas and, hence, an impaired capacity for  $\beta$ -cell neogenesis (either primary in the fetus or compensatory in the newborn and adult rats).

#### Multiple $\beta$ -cell functional defects

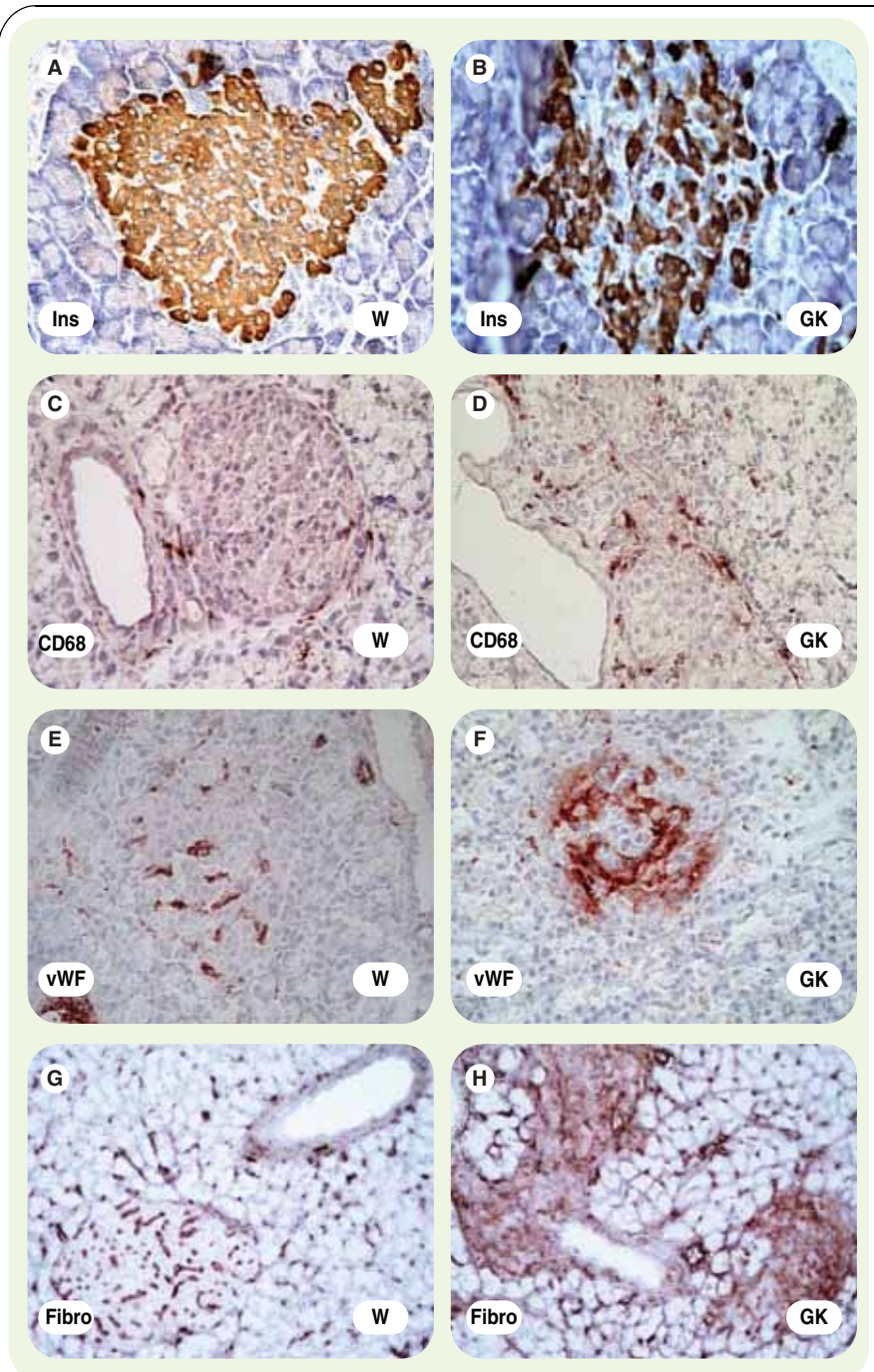
We have shown that impaired glucose-induced insulin release in GK/Par islets was associated with perturbation of multiple mitochondrial functions. More specifically, we reported that aerobic, but not anaerobic, glycolysis was impaired in GK/Par islets [27–29] and we showed that mitochondria of GK/Par islets exhibit a specific decrease in the activities of flavin adenine dinucleotide-dependent glycerophosphate dehydrogenase [27,29] and branched-chain ketoacid dehydrogenase [30]. Although this certainly contributes to lower oxidation rates, it does not exclude other mechanisms. Indeed, we found that the  $\beta$ -cells of adult GK/Par rats had a significantly smaller mitochondrial volume compared with control  $\beta$ -cells [31]. No major deletion or restriction fragment polymorphism could be detected in mtDNA from adult GK/Par islets [31]; however, they contained markedly less mtDNA than control islets. The lower islet mtDNA was paralleled by decreased content of some islet mitochondrial mRNAs, such as cytochrome b [31]. In accordance with this, insufficient increase of ATP generation in response to high glucose was shown by our group [27]. The defective activation of ATP generation is instrumental in the impaired insulin response to glucose as it correlated with impaired elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration [32,33]. This is a consequence of the failure by glucose to augment L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity due to insufficient plasma membrane depolarization, reflecting impaired closure of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels. Abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  handling by the endoplasmic reticulum might also participate in the defective  $\text{Ca}^{2+}$  signaling [32].

Phosphoinositides [33] and cAMP metabolism [34] are also affected in GK/Par islets. While carbachol was able to promote normal inositol generation in GK/Par islets, high glucose failed to increase inositol-phosphate (IP) accumulation [33]. The inability of glucose to stimulate IPs production is not related to defective phospholipase C activity *per se* (total activity in islet homogenates is normal). It is rather linked to abnormal targeting of the phosphorylation of phosphoinositides: the activity of

phosphatidylinositol kinase (PI-K), which is the first of the two phosphorylating activities responsible for the generation of phosphatidylinositol biphosphate, is clearly reduced [33]. Moreover, deficient calcium handling and ATP supply in response to glucose probably also contribute to abnormal activation of PI-K and phospholipase C. Concerning cAMP, it is remarkable that its intracellular content is very high in GK/Par  $\beta$ -cells already at low glucose levels [33]. This is related to increased expression of the cyclase isoforms 1, 2 and 3, and of the  $G_{\alpha S}$  and  $G_{\alpha olf}$  proteins, while the phosphodiesterases PDE3B and PDE1C isoforms are decreased [33,34]. Furthermore, cAMP is not further enhanced at increasing glucose concentrations (at variance with the situation in normal  $\beta$ -cells) [33,34]. This suggests that a block exists in the steps linking glucose metabolism to activation of adenylate cyclase in the GK/Par  $\beta$ -cell. This is in contrast with the capacity of the GK/Par  $\beta$ -cell to respond to glucagon-like peptide (GLP)-1, in such a way that it is able to restore the secretory competence to glucose with a clear biphasic response [34]. This proves that the glucose incompetence of the GK/Par  $\beta$ -cell is not irreversible, and emphasizes the usefulness of GLP-1 as a therapeutic agent in Type 2 DM.

Along with these upstream abnormalities, important defects reside late in signal transduction (i.e., in the exocytotic machinery). Indeed, glucose-stimulated insulin secretion was markedly impaired in GK islets when the islets were depolarized by a high concentration of KCl and the ATP-regulated  $K^+$  channels were kept open by diazoxide [35,36]. Similar results were obtained when insulin release was induced by exogenous calcium in electrically permeabilized GK rat islets [37]. In fact, markedly reduced expression of several exocytotic SNARE complex proteins, important for the docking and fusion between insulin granules and  $\beta$ -cell membrane, have been demonstrated in GK rat islets [38–40]. Thus, a reduced number of docking granules accounts for impaired  $\beta$ -cell secretion [41] and this defect may partly be related to glucotoxicity [39].

The actin cytoskeleton has also been implicated in regulated exocytosis. It has been proposed that, in secretory cells, the



**Figure 3.** Insulin labeling demonstrates the concomitant presence of (B) large fibrotic islets in adult GK pancreas compared with (A) age-matched control Wistar pancreas ( $\times 500$ ). Fibrosis is extensive in large GK islets, as shown by fibronectin (H) labeling ( $\times 250$ ). Of note, small intact islets coexist with large fibrotic islets (not shown). Inflammatory cells infiltrate the islets of adult GK rats. Compared with adult Wistar rats, numerous macrophages are present in and around GK islets, as shown by CD68 labeling ((D) vs (C);  $\times 500$ ). The concomitant presence of macrophages and granulocytes together with the quasi-absence of T and B cells and ED3 macrophages that are involved in autoimmune reaction (data not shown) suggests a pure inflammatory process in this model of Type 2 diabetes. Islet vascularization is altered in adult GK rats. (E) Labeling for vWF, a factor known to be produced by endothelial cells, shows the normal organization of islet vascularization in adult Wistar rats. (F) Islet vascularization differs markedly in age-matched GK rats and appears to be hypertrophied ( $\times 500$ ). GK: Goto-Kakizaki; vWF: von Willebrand factor; W: Wistar. Reproduced with permission from [16].

actin network under the plasma membrane acts as a physical barrier preventing the access of secretory granules to the membrane. The level of total actin protein evaluated by western blotting has been found to be similar in GK/Par and Wistar islets [J MOVASSAT, UNPUBLISHED DATA] conflicting with reports in other GK rat lines [42,43]. However, confocal analysis of the distribution of phalloidin-stained cortical actin filaments revealed a higher density of the cortical actin web near the plasma membrane in GK/Par islets compared with Wistar. Moreover, preliminary functional results suggest that the higher density of actin cortical web in the GK/Par islets contribute to the defects in glucose-induced insulin secretion exhibited by GK islets [J MOVASSAT, UNPUBLISHED DATA].

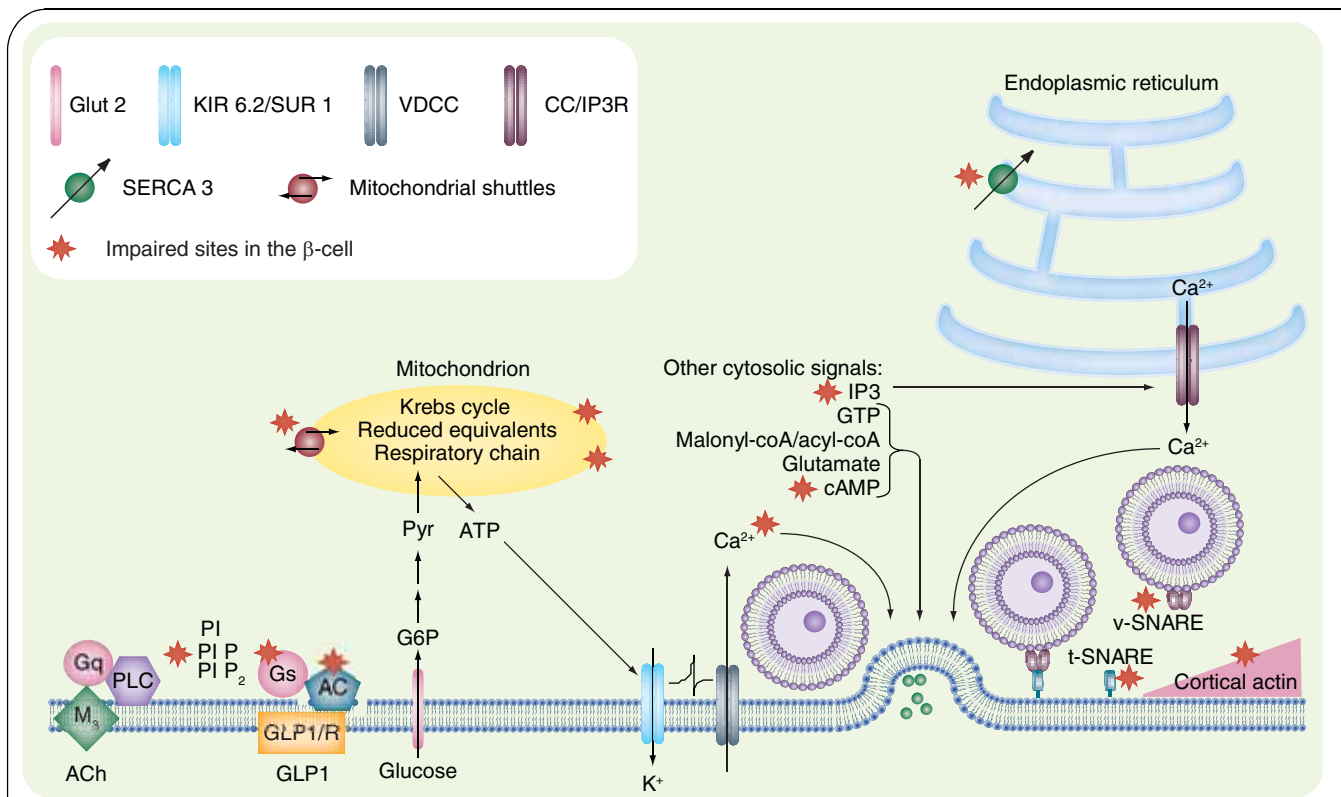
FIGURE 4 illustrates a compendium of the abnormal intracellular sites so far identified in the  $\beta$ -cells of the diabetic GK rats from the different sources.

Considerable interest has recently been focused on the putative role of oxidative stress upon deterioration of  $\beta$ -cell function/survival in diabetes. Type 2 DM in the GK rats is indeed associated with  $\beta$ -cell oxidative damage, as attested by increased levels of 8-OHdG and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins [42], and treatment of GK rats with antioxidants provided some protection from glucose toxicity [43]. Unpublished

data from our group indicate that the GK/Par  $\beta$ -cell phenotype resulted in a reduced sensitivity to the acute toxic effect of STZ (1 mM): GK islets showed strong resistance to STZ-induced inhibition of glucose-induced insulin secretion or KCl (50mM) compared with Wistar islets (FIGURE 5). Since the same pattern was observed in response to exogenous  $H_2O_2$ , this suggests that susceptibility to the  $\beta$ -cell toxin was controlled by the antioxidant status and that an increased expression of antioxidants may confer greater reactive oxygen species scavenging capacity to the GK  $\beta$ -cell. This correlates with an increased expression (2.7-fold) of the antioxidant gene glutathione peroxidase-1 in GK/Par islets compared with Wistar [16].

**Limited  $\beta$ -cell performance is partially related to the abnormal metabolic environment (gluco-lipototoxicity)**

When studied under *in vitro* static incubation conditions, islets isolated from hyperglycemic (prediabetic) GK/Par pups amplified their secretory response to high glucose, leucine or leucine plus glutamine to the same extent as age-related Wistar islets [12]. Therefore, a major intrinsic secretory defect does not exist in the prediabetic GK/Par  $\beta$ -cells, which can be considered as normally glucose-competent at this stage, at least when tested *in vitro*. Paradoxically, this contrasts with the situation *in vivo*, since we



**Figure 4. Model for defective glucose-induced insulin release and the abnormal intracellular sites so far identified in the  $\beta$ -cell of the diabetic GK rats from the different sources.** Where data are available, the impaired sites in the  $\beta$ -cell are indicated with a red star.

AC: Adenylate cyclase; ACh: Acetylcholine; CC/IP3R: Calcium channel modulated by IP3 binding; G6P: Glucose 6-phosphate; GK: Goto-Kakizaki; GLP: Glucagon-like peptide; KIR: Subunit of the ATP-dependent potassium channel; PI: Phosphatidylinositol; PLC: Phospholipase C; Pyr: Pyruvate; R: Receptor; SERCA3: Type 3 calcium-ATPase; SNAP: Soluble *N*-ethylmaleimide sensitive fusion protein-attachment protein; SUR: Sulfonylurea-binding subunit of the ATP-dependent potassium channel; tSNARE/v-SNARE: SNARE proteins (syntaxin-1A, SNAP-25, VAMP-2, Munc 18, Munc 13-1 and synaptophysin); VDCC: L-type calcium channel.

found a lack of insulin secretion in response to an intraperitoneal glucose challenge *in vivo* in prediabetic GK/Par pups [J MOVASSAT, D BAILBÉ, UNPUBLISHED DATA].

In the GK/Par rat, basal hyperglycemia and mild-to-moderate hypertriglyceridemia are observed only after weaning [12,14]. The onset of a profound alteration in glucose-stimulated insulin secretion by the GK/Par  $\beta$ -cell (after weaning) is time-correlated with the exposure to the diabetic milieu. These changes in islet function could be ascribed, at least in part, to a loss of differentiation of  $\beta$ -cells chronically exposed to even mild chronic hyperglycemia and elevated plasma nonesterified fatty acids, a process referred to as gluco-lipotoxicity. The view that the lack of  $\beta$ -cell reactivity to glucose, as seen during the adult period when the GK rats are hyperglycemic in the basal state, partly reflecting an acquired defect ascribed to gluco-lipotoxicity, is supported by reports that chronic treatment of GK rats with phlorizin partially improved glucose-induced insulin release (FIGURE 6) [38,39,44] [D BAILBÉ & B PORTHA, UNPUBLISHED DATA], while hyperlipidaemia induced by high-fat feeding markedly impaired insulin secretion [45].

#### Determinants (morbid genes vs environment) for early deficiency of the $\beta$ -cell mass in the GK/Par model

Concerning the potential maternal influence on the development of Type 2 DM in the GK model, Gauguier and colleagues reported that adult offspring of GK females crossed with Wistar males have a more marked hyperglycemia than adult offspring of Wistar females crossed with GK males, suggesting higher maternal inheritance [46]. However, this conclusion was not confirmed in other studies [47,48] and cross-breeding experiments do not overcome the difficulty of isolating the respective contribution of genetic versus intrauterine environmental factors. Recently, Gill-Randall and colleagues developed an embryo transfer system to examine the influence of genetic factors more thoroughly [48]. First, these authors showed that offspring from GK embryos transferred in the uterus of euglycemic Wistar mothers still develop Type 2 DM when adults, therefore highlighting a role for genetic factors. Second, they showed that offspring from Wistar embryos reared in hyperglycemic GK mothers were significantly hyperglycemic at adulthood [48]. Thus, in Wistar rats with no genetic risk of diabetes, exposure to hyperglycemia *in utero* (as seen in the GK pregnant mother) increases the risk of hyperglycemia in adult life [48], clearly illustrating a diabetogenic role for the GK intrauterine environment.

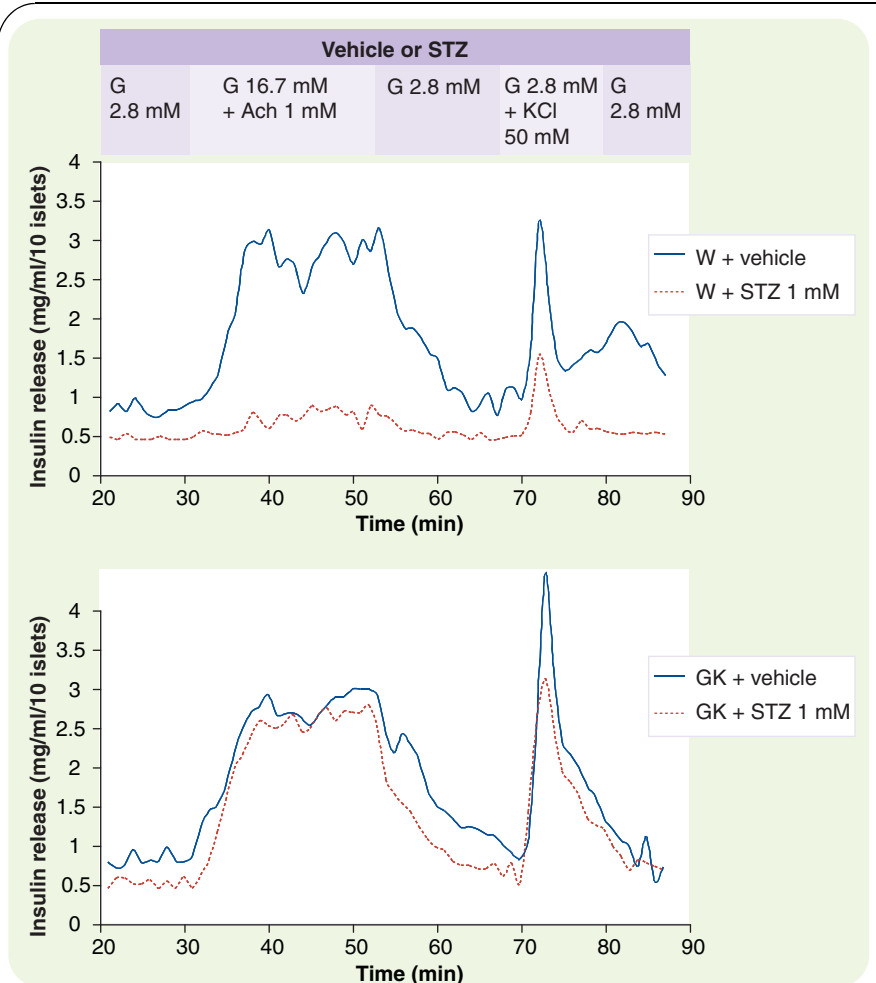


Figure 5. The GK  $\beta$ -cell is strongly resistant to oxidative stress as far as glucose- and KCl-induced insulin release are concerned. We measured the impact of several artificial oxidative agents on glucose- (glucose/acetylcholine-induced) and nonglucose-dependent (KCl-induced) insulin release. To compare the impact of oxidative stress on glucose-induced insulin release in the GK and Wistar rat  $\beta$ -cell, we chose an experimental condition where glucose competence is restored. For that purpose we combined acetylcholine with glucose (glucose/acetylcholine-induced insulin release) [33]. GK: Goto-Kakizaki; STZ: Streptozotocin; W: Wistar.

Concerning the impact of maternal hyperglycemia (as induced experimentally in the rat by STZ [49] or glucose infusion [50]) on  $\beta$ -cell function specifically, it has been long recognized that it persists into adult life and the second- and third-generation offspring. Another recent illustration is offered by observations in rat pups reared artificially on a high carbohydrate (HC) milk formula [51]: such alteration of nutrition during the suckling period only induces persistent adaptation of energy metabolism in adulthood (obesity, glucose intolerance and impaired insulin secretion) and the HC-fed females spontaneously transmitted their metabolic characteristics to their progeny without the pups themselves having to undergo any nutritional treatment [51]. Taken as a whole, information from the HC rat pup model [46], and from the offspring of mildly hyperglycemic rat mothers [52], suggests that hyperglycemia experienced during the fetal and/or early postnatal life contributes to programming of the endocrine pancreas. Such a

scenario also potentially applies to the GK/Par model, as GK/Par mothers are slightly hyperglycemic through their gestation and during the suckling period. Therefore, the gestational diabetic pattern of the GK/Par mothers may contribute *per se* (besides inherited disease genes) to establish and/or maintain the transmission of endocrine pancreas programming from one GK/Par generation to the next one. By such mechanism, the GK/Par rat can be viewed as a model of developmental programming for Type 2 DM (associated to programming for low  $\beta$ -cell mass), with a stable transgenerational transmission.

Two functional point mutations in the promoter region of the adenylyl cyclase type 3 (*AC3*) gene have been reported in both islets and peripheral blood of GK rats in the Stockholm colony and are associated with GK  $\beta$ -cell *AC3* overexpression and increased cAMP generation [53]. The contribution, if any, of such a mutation to the GK  $\beta$ -cell growth defect is so far unknown.

Gauguier and colleagues, using a quantitative trait locus (QTL) approach, have identified six independently segregating loci containing genes regulating fasting plasma glucose and insulin levels, glucose tolerance, insulin secretion and adiposity in GK/Par rats [25]. The same conclusion was drawn by Galli and colleagues using GK from the Stockholm colony [54]. This established the polygenic inheritance of diabetes-related parameters in the GK rat. Both studies found the strongest evidence of linkage between glucose tolerance and markers spanning a region on rat chromosome 1, the Niddm1 locus. While it must be recognized that many of the glucose-controlling locus variants reported were associated in fact with hyperinsulinemia or enhanced insulin secretion [25,54,55], more recent works using

congenic technology have identified on the Niddm1i locus a 3.5 cM region, containing approximately ten genes, as a major susceptibility locus for defective insulin secretion [56]. However, no QTL association with  $\beta$ -cell mass or size is found in the GK/Par rat [A KTORZA AND D GAUGUIER, UNPUBLISHED DATA]. Therefore, the likelihood that a genotype alteration contributes to the low  $\beta$ -cell mass phenotype in the GK/Par rat is reduced. The question raised is the following: does epigenetic perturbation of gene expression occur in the developing GK pancreas and does it contribute to the alteration of early  $\beta$ -cell growth? *igf2* and *igf1r* genes are good candidates for such a perspective.

In conclusion, the defective  $\beta$ -cell mass and function in the GK/Par model reflects the complex interactions of multiple pathogenic players:

- Several independent loci containing genes responsible for some diabetic traits (but not decreased  $\beta$ -cell mass);
- Gestational metabolic impairment inducing an epigenetic programming of the pancreas (decreased  $\beta$ -cell neogenesis), which is transmitted to the next generation;
- Loss of  $\beta$ -cell differentiation due to chronic exposure to hyperglycemia (glucotoxicity), inflammatory mediators and reactive oxygen species.

**Expert commentary**

Unraveling the pathways leading to  $\beta$ -cell death and impaired function may provide the basis for innovative therapy of Type 2 DM. This is particularly true when one considers the reversibility of impaired  $\beta$ -cell function and possibly  $\beta$ -cell mass. One example

might be agonists of GLP1 receptor (or inhibitors of the dipeptidyl peptidase IV enzyme that degrades endogenous GLP1), which restore glucose-induced insulin secretion and have beneficial effects on  $\beta$ -cell mass by stimulating proliferation and neogenesis in the GK/par model [34,57]. As these molecules are/will be in clinical use, they might not only restore insulin secretory pattern in Type 2 DM patients as convincingly shown [58], but also allow for some restoration of  $\beta$ -cell mass. Although there are arguments for believing that this may occur in humans as in animal models of reduced  $\beta$ -cell mass, it has never been documented directly and it will be difficult to do so as long as human  $\beta$ -cell mass cannot be measured noninvasively.

Finally, the GK/Par rat model can be viewed as a useful tool to study the molecular mechanisms of transgenerational inheritance of 'programmed diabetes risk associated with low  $\beta$ -cell mass'. Since a number of genes important in modulating fetal tissue growth are imprinted (particularly those involved in the control of the expression of

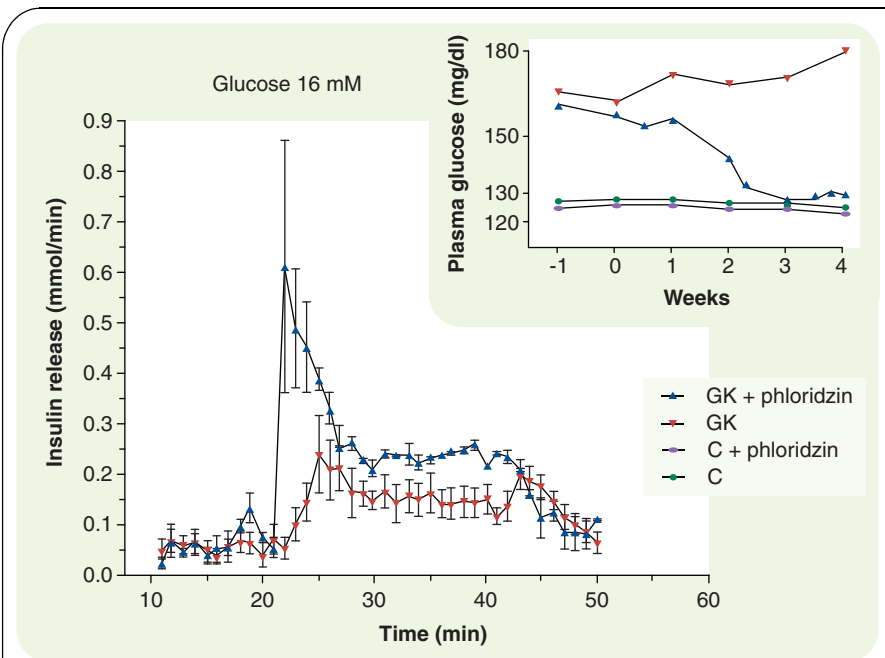


Figure 6. 4-week phlorizin treatment induced glycemic control close to normal in the adult GK rats as their basal (nonfed) plasma glucose levels were decreased from 9 to 6.5 mM. This resulted in partial restoration (first phase mostly) of the glucose-induced insulin release, as tested *in vitro* using the isolated perfused pancreas. GK: Goto-Kakizaki.



*igf2*), studies are warranted to determine whether epigenetic regulation of *igf2* and *igf1r* gene expression also occurs in the developing GK pancreas. Identification of specific epigenetic changes will allow new therapeutic targets and therapies to be developed to potentially prevent the onset of Type 2 DM.

#### Five-year view

Stem cells, with their potential of developing into pancreatic  $\beta$ -cells, appear to be the best prospect for overcoming the shortage of pancreatic tissue available for islet graft. However, current investigation is still in the preliminary stage and it will be many years before they can potentially be used in the clinical setting.

The *in situ* regeneration of existing islets has now become a distinct possibility. Pharmacological supplementation with factors known to induce  $\beta$ -cell replication and neogenesis might augment the regenerative processes. This is potentially applicable to Type 2 DM and Type 1 DM patients as well if associated downregulation of autoimmunity is sufficient to give the pancreas the breathing space to regenerate islets. Clearly, islet-regeneration research will soon match the level of interest currently focused on *in vitro* stem cell-based approaches.

One of the most important basic challenges with a view to islet regeneration is to determine the cellular origin of newly formed  $\beta$ -cells during regeneration. Since it is now clear that the pancreas has regenerative potential in embryonic, neonatal and even adult life, it will be of interest to understand why this does not happen in diabetes. There is also a need to identify the external factors

that trigger the precursor cells into replication/expansion and the  $\beta$ -cell into functional maturity.

At present, information regarding  $\beta$ -cell mass in diabetic patients is indirectly inferred from blood measurements of insulin secretion. Direct evaluation of  $\beta$ -cell mass in humans can be carried out at autopsy only and cannot be derived from prospective studies. Therefore, novel noninvasive determinations of the  $\beta$ -cell mass *in vivo* are urgently needed to provide direct quantitative follow-up for  $\beta$ -cell mass. Their set up will represent a major advance in evaluating islet regeneration in patients and in animal models as well.

#### Financial & competing interests disclosure

*This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, by the French ANR (Programme Physio 2006 – Pro-grabeta) and by a grant from the EFSD/MSD European Foundation. G Lacraz is a recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. M Dolz received doctoral fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale, the Association de Langue Française pour l'Étude du Diabète et des Maladies Métaboliques and the Société Française d'Endocrinologie. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.*

*No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.*

#### Key Issues

- Now that the reduction in  $\beta$ -mass and  $\beta$ -cell function has been clearly established in humans with Type 2 diabetes mellitus (DM), the debate focuses on the possible mechanisms responsible for these.
- Hazard of invasive sampling and lack of suitable noninvasive methods are strong limitations for studies of the living pancreas in humans.
- Appropriate inbred rodent models are essential tools for identification of genes and environmental factors that program the risk of deficient functional  $\beta$ -cell mass and Type 2 DM.
- The Goto–Kakizaki (GK) rat is a substrain of Wistar rat origin, developing spontaneous Type 2 DM early in life. Glucose intolerance is most likely primarily due to impaired  $\beta$ -cell mass and function on the background of a polygenic inheritance. In addition, secondary defects in  $\beta$ -cell function and insulin action may superimpose due to chronic hyperglycemia (gluco-lipotoxicity). A number of alterations or defects have been shown in the stimulus–secretion coupling for glucose in the GK  $\beta$ -cell.
- To date, the earliest alteration detected in the GK rat targets the size of  $\beta$ -cell population. Data suggest that the permanently reduced  $\beta$ -cell mass in the GK model reflects a limitation of  $\beta$ -cell neogenesis, starting from a failure of the proliferative and survival capacities of the undifferentiated cell compartment of the pancreas, where putative endocrine precursor cells reside.
- The GK rat model can be viewed as a useful tool to study the molecular mechanisms of transgenerational inheritance of 'programmed diabetes risk associated with low  $\beta$ -cell mass'.
- Studies are warranted to determine whether or not specific epigenetic changes (*igf2* and *igf1r* genes are currently the best candidates) might occur in the developing GK pancreas.
- Using glucagon-like peptide-1/R agonists as pharmacological agents, we have demonstrated that one can repopulate a previously deficient GK pancreas with new  $\beta$ -cells, and this is associated with durable glucose homeostasis improvement even beyond the end of treatment.
- These preclinical studies clearly support the effectiveness for regenerative medicine as a valid approach to cure Type 2 DM.

## References

- 1 Donath MY, Halban PA. Decreased  $\beta$ -cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581–589 (2004).
- 2 Weir G, Bonner-Weir S. Five stages of evolving  $\beta$ -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53(Suppl.), S16–S21 (2004).
- 3 Del Guerra S, Lupi R, Marselli L *et al.* Functional and molecular defects of pancreatic islets in human Type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727–735 (2005).
- 4 Anello M, Lupi R, Spanpinato D *et al.* Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic  $\beta$  cells from Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48, 282–289 (2005).
- 5 Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler P.  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with Type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110 (2003).
- 6 Zhao HL, Lai F, Tong P *et al.* Prevalence and clinicopathological characteristics of islet amyloid in chinese patients with Type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 2759–2766 (2003).
- 7 Deng S, Vatamaniuk M, Huang X *et al.* Structural and functional abnormalities in the islets isolated from Type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53, 624–632 (2004).
- 8 Kloppel G, Mattias L, Habich K *et al.* Islet pathology and the pathogenesis of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv. Synth. Pathol. Res.* 4, 110–125 (1985).
- 9 Hellerström C. The life story of the pancreatic  $\beta$  cell. *Diabetologia* 26, 393–400 (1984).
- 10 Rhodes CJ. Type 2 diabetes – a matter of  $\beta$ -cell life and death? *Science* 307, 380–384 (2005).
- 11 Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc. Jpn Acad.* 51, 80–85 (1975).
- 12 Portha B, Giroix MH, Serradas P *et al.*  $\beta$ -cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat. Information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50, 89–93 (2001).
- 13 Östenson CG. The Goto-Kakizaki rat. In: *Animal Models of Diabetes: A Primer*. Sima AAF, Shafrir E (Eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands 197–211 (2001).
- 14 Movassat J, Saulnier C, Serradas P, Portha B. Impaired development of pancreatic  $\beta$ -cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 40, 916–925 (1997).
- 15 Giroix MH, Saulnier C, Portha B. Decreased pancreatic islet response to L-leucine in the spontaneously diabetic GK rat: enzymatic, metabolic and secretory data. *Diabetologia* 42, 965–977 (1999).
- 16 Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger JC *et al.* Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of Type 2 diabetes, the GK Rat. *Diabetes* 55, 1625–1633 (2006).
- 17 Atef N, Portha B, Penicaud L. Changes in islet blood flow in rats with NIDDM. *Diabetologia* 37, 677–680 (1994).
- 18 Carlsson PO, Jansson L, Ostenson CG, Kallskog O. Islet capillary blood pressure increase mediated by hyperglycemia in NIDDM GK rats. *Diabetes* 46, 947–952 (1997).
- 19 Svensson AM, Ostenson CG, Jansson L. Age-induced changes in pancreatic islet blood flow: evidence for an impaired regulation in diabetic GK rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E1139–E1144 (2000).
- 20 Movassat J, Portha B.  $\beta$ -cell growth in the neonatal Goto-Kakizaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia* 42, 1098–1106 (1999).
- 21 Miralles F, Portha B. Early development of  $\beta$ -cells is impaired in the GK rat model of Type 2 diabetes. *Diabetes* 50(Suppl. 1), 84–88 (2001).
- 22 Plachot C, Movassat J, Portha B. Impaired  $\beta$ -cell regeneration after spatial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of Type II diabetes. *Histochem. Cell Biol.* 116, 131–139 (2001).
- 23 Calderari S, Gangnerau MN, Thibault M *et al.* Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes  $\beta$ -cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 50(7), 1463–1471 (2007).
- 24 Serradas P, Goya L, Lacorne M *et al.* Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of Type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 392–397 (2002).
- 25 Gauguier D, Froguel P, Parent V *et al.* Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nat. Genet.* 12, 38–43 (1996).
- 26 Lee JE, Pintar J, Efstratiadis A. Pattern of the insulin-like growth factor 2 gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* 119, 151–159 (1990).
- 27 Giroix MH, Sener A, Bailbé D, Leclercq-Meyer V, Portha B, Malaisse WJ. Metabolic, ionic and secretory response to D-glucose in islets from rats with acquired or inherited non-insulin-dependent diabetes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50, 301–321 (1993).
- 28 Giroix MH, Vesco L, Portha B. Functional and metabolic perturbations in isolated pancreatic islets from the GK rat, a genetic model of non-insulin dependent diabetes. *Endocrinology* 132, 815–822 (1993).
- 29 Giroix MH, Sener A, Portha B, Malaisse WJ. Preferential alteration of oxidative relative to total glycolysis in islets of rats with inherited or acquired non-insulin dependent diabetes. *Diabetologia* 36, 305–309 (1993).
- 30 Giroix MH, Saulnier C, Portha B. Decreased pancreatic islet response to L-leucine in the spontaneously diabetic GK rat: enzymatic, metabolic and secretory data. *Diabetologia* 42, 965–977 (1999).
- 31 Serradas P, Giroix MH, Saulnier C *et al.* Mitochondrial DNA content is specifically decreased in adult, but not fetal, pancreatic islets of the GK rat, a genetic model of non-insulin dependent diabetes. *Endocrinology* 136, 5623–5631 (1995).
- 32 Marie JC, Bailbé D, Gylfe E, Portha B. Defective glucose-dependent cytosolic  $Ca^{2+}$  handling in islets of GK and nSTZ rat models of Type 2 diabetes. *J. Endocrinol.* 169, 169–176 (2001).
- 33 Dolz M, Bailbé D, Giroix MH *et al.* Restitution of defective glucose-stimulated insulin secretion in diabetic GK rat by acetylcholine uncovers paradoxical stimulatory effect of  $\beta$ -cell muscarinic receptor activation on cAMP production. *Diabetes* 54, 3229–3237 (2005).
- 34 Dolz M, Bailbé D, Movassat J *et al.* Pivotal role of cAMP in the acute restitution of defective glucose-stimulated insulin release in diabetic GK rat by GLP-1. *Diabetes* 55(Suppl. 1), A371 (2006).
- 35 Abdel-Halim SM, Guenifi A, Larsson O, Berggren PO, Ostenson, CG, Efendic S. Impaired coupling of glucose signal to the exocytotic machinery in diabetic GK rats; a defect ameliorated by cAMP. *Diabetes* 45, 934–940 (1996).
- 36 Metz SA, Meredith M, Vadakekalam J, Rabaglia ME, Kowluru A. A defect late in stimulus-secretion coupling impairs insulin secretion in Goto-Kakizaki diabetic rats. *Diabetes* 48, 1754–1762 (1999).

- 37 Okamoto Y, Ishida H, Tsubura Y *et al.* Hyperresponse in calcium-induced insulin release from electrically permeabilized pancreatic islets of diabetic GK rats and its defective augmentation by glucose. *Diabetologia* 38, 772–778 (1995).
- 38 Nagamatsu S, Nakamichi Y, Yamamura C *et al.* Decreased expression of t-SNARE, syntaxin I and SNAP-25 in pancreatic  $\beta$ -cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* 48, 2367–2373 (1999).
- 39 Gaisano HY, Ostenson CG, Shew L, Wheeler MB, Efendic S. Abnormal expression of pancreatic islet soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors in GK rats is partially restored by phlorizin treatment and accentuated by high glucose treatment. *Endocrinology* 143, 4218–4226 (2002).
- 40 Zhang W, Khan A, Ostenson C, Berggren PO, Efendic S, Meister B. Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1038–1044 (2002).
- 41 Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Nagai S, Nakamichi Y, Nagamatsu S. TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic  $\beta$ -cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto–Kakizaki diabetic rat  $\beta$ -cells. *Biochem. J.* 381, 13–18 (2004).
- 42 Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K *et al.* Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cells of GK rats, a model of Type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 927–932 (1999).
- 43 Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S *et al.* Antioxidant  $\alpha$ -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of Type 2 diabetes. *FEBS Lett.* 473, 24–26 (2000).
- 44 Ling ZC, Hong-Lie C, Ostenson CG, Efendic S, Khan A. Hyperglycemia contributes to impaired insulin response in GK rat islets. *Diabetes* 50(Suppl. 1), 108–112 (2001).
- 45 Briaud I, Kelpel CL, Johnson LM, Tran PO, Poitout V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 51, 662–668 (2002).
- 46 Gauguier D, Nelson I, Bernard C *et al.* Higher than paternal inheritance of diabetes in GK rats. *Diabetes* 43, 220–224 (1994).
- 47 Abdel-Halim SM, Guenifi A, Luthman H, Grill V, Efendic S, Ostenson CG. Impact of diabetic inheritance on glucose tolerance and insulin secretion in spontaneously diabetic GK–Wistar rats. *Diabetes* 43, 281–288 (1994).
- 48 Gill-Randall R, Adams D, Ollerton RL, Lewis M, Alcolado JC. Type 2 diabetes mellitus – genes or intrauterine environment? An embryo transfer paradigm in rats. *Diabetologia* 47, 1354–1359 (2004).
- 49 Kervran A, Guillaume M, Jost A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 15, 387–393 (1978).
- 50 Bihoreau MT, Ktorza A, Kinebanyan MF, Picon L. Impaired glucose homeostasis in adult rats from hyperglycemic mothers. *Diabetes* 35, 979–984 (1986).
- 51 Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming: causes and consequences. *J. Biol. Chem.* 277, 1629–1632 (2002).
- 52 Gauguier D, Bihoreau MT, Ktorza A, Berthault MF, Picon L. Inheritance of diabetes mellitus as consequence of gestational hyperglycemia in rats. *Diabetes* 39, 734–739 (1990).
- 53 Abdel-Halim SM, Guenifi A, He B *et al.* Mutations in the promoter of adenylyl cyclase (*AC-III*) gene, overexpression of *AC-III* mRNA and enhanced cAMP generation in islets from the spontaneously diabetic GK rat model of Type 2 diabetes. *Diabetes* 47, 498–504 (1998).
- 54 Galli J, Li S, Barnard C *et al.* Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat. Genet.* 12, 31–37 (1996).
- 55 Wallis RH, Wallace KJ, Collins SC *et al.* Enhanced insulin secretion and cholesterol metabolism in congenic strains of the spontaneously diabetic (Type 2) Goto Kakizaki rat are controlled by independent genetic loci in rat chromosome 8. *Diabetologia* 47, 1096–1106 (2004).
- 56 Lin JM, Ortsäter H, Fakhraid-Rad H, Galli J, Luthman H, Bergsten P. Phenotyping of individual pancreatic islets locates genetic defects in stimulus secretion coupling to Niddm1 within the major diabetes locus in GK rats. *Diabetes* 50, 2737–2743 (2001).
- 57 Turrel C, Bailbé D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Persistent improvement of Type 2 diabetes in the Goto–Kakizaki rat model by expansion of the  $\beta$ -cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or Exendin-4. *Diabetes* 51, 1452–1452 (2002).
- 58 Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* 3, 1531–165 (2006).

#### Affiliations

- Bernard Portha  
Professor, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, CNRS UMR 7059, Université Paris-Diderot, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France  
Tel.: +33 144 275 011  
Fax: +33 144 277 891  
portha@univ-paris-diderot.fr
- G Lacraz, MSc  
Groupe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, UMR CNRS 7059, Université Paris-Diderot, UP7, Paris, France
- M Dolz, MD  
Groupe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, UMR CNRS 7059, Université Paris-Diderot, UP7, Paris, France
- F Homo-Delarche, MD, PhD  
Chargé de Recherche, Groupe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, UMR CNRS 7059, Université Paris-Diderot, UP7, Paris, France
- M-H Giroix, PhD  
Groupe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, UMR CNRS 7059, Université Paris-Diderot, UP7, Paris, France
- J Movassat, PhD  
Assistant Professor, Groupe Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Laboratoire de Physiopathologie de la Nutrition, UMR CNRS 7059, Université Paris-Diderot, UP7, Paris, France

## ORIGINAL ARTICLE

# Lack of starvation-induced activation of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of the Lou/C rats resistant to obesity

N Taleux<sup>1,2</sup>, I De Potter<sup>1</sup>, C Deransart<sup>3</sup>, G Lacraz<sup>2</sup>, R Favier<sup>2</sup>, XM Lerverve<sup>2</sup>, L Hue<sup>1,4</sup> and B Guigas<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Université catholique de Louvain and Institute of Cellular Pathology, Hormone and Metabolic Research Unit, Brussels, Belgium; <sup>2</sup>Bioénergétique Fondamentale et Appliquée INSERM U 884, Université J. Fourier, Grenoble, France and <sup>3</sup>UMR 836 Inserm-UJF-CEA 'Grenoble - Institut des Neurosciences', Grenoble, France

**Objective:** The AMP-activated protein kinase (AMPK) is involved in the control of food intake by the hypothalamus. The aim of this work was to investigate if modification of hypothalamic AMPK regulation could be related to the spontaneous food restriction of Lou/C rats, a strain resistant to obesity exhibiting a 40% reduction in caloric intake compared with their lean Wistar counterparts.

**Design:** Three-month-old male Lou/C rats were compared with age-matched male Wistar rats in both fed *ad libitum* and 24-h food deprivation state.

**Measurements and results:** We first confirmed that starvation activated both isoforms of AMPK catalytic  $\alpha$  subunits and enhanced the phosphorylation state of its downstream targets acetyl-CoA carboxylase and elongation factor 2 in the hypothalamus of Wistar rats. These changes were not observed in the hypothalamus of Lou/C rats. Interestingly, the starvation-induced changes in hypothalamic mRNA levels of the main orexigenic and anorexigenic neuropeptides were also blunted in the Lou/C rats. Analysis of the concentrations of circulating substrates and hormones known to regulate hypothalamic AMPK indicated that the starvation-induced changes in ghrelin, adiponectin and leptin were not observed in Lou/C rats. Furthermore, an increased phosphorylation state of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which admittedly mediates leptin signaling, was evidenced in the hypothalamus of the starved Lou/C rats, as well as modifications of expression of the leptin-sensitive genes suppressor of cytokine signaling-3 and stearoyl-coenzyme A desaturase 1. In addition, despite reduced leptin level in fed Lou/C rats, the phosphorylation state of hypothalamic STAT3 remained similar to that found in fed Wistar rats, an adaptation that could be explained by the concomitant increase in ObRb leptin receptor mRNA expression.

**Conclusion:** Activation of hypothalamic AMPK by starvation, which stimulates food intake through changes in (an)orexigenic neuropeptides in the normal rats, was not observed in the spontaneously hypophagic Lou/C rats.

*International Journal of Obesity* advance online publication, 4 December 2007; doi:10.1038/sj.ijo.0803759

**Keywords:** AMPK; hypothalamus; food intake; leptin; ghrelin; adiponectin

## Introduction

The hypothalamus plays a critical role in the regulation of energy homeostasis.<sup>1–3</sup> It regulates both feeding behavior and energy expenditure by integrating information from the periphery through nutrients and hormones such as glucose,

insulin, leptin, adiponectin and ghrelin. These signals are mainly integrated in the arcuate nucleus by discrete neurons that produce either the orexigenic neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP) or the anorexigenic pro-opiomelanocortin (POMC), the precursor of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone, and cocaine-amphetamine-related transcript (CART). NPY neurons release AgRP and NPY, and have reciprocal connections with an adjacent population of neurons releasing  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone and CART. All these neuropeptides are nutritionally regulated. Indeed, starvation decreases circulating glucose, insulin and leptin and increases ghrelin and adiponectin levels, which in turn activate orexigenic and inhibit anorexigenic neurons leading to food intake.<sup>4</sup>

Correspondence: Dr B Guigas, Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Postzone S1-P, Postbus 9600, Leiden 2300 RC, The Netherlands.

E-mail: b.guigas@lumc.nl

<sup>4</sup>These authors contributed equally and must be considered as joined last authors.

Received 2 May 2007; revised 25 September 2007; accepted 21 October 2007

Several studies have recently shown that the AMP-activated protein kinase (AMPK) plays a central role in the regulation of food intake by the hypothalamus.<sup>5–8</sup> AMPK is a heterotrimeric serine/threonine protein kinase containing a catalytic ( $\alpha$ ) subunit and two regulatory ( $\beta$  and  $\gamma$ ) subunits. AMPK is activated by an increase in AMP/ATP ratio as occurs after cellular ATP depletion. Therefore, AMPK was considered as a ‘fuel gauge’ involved in energy homeostasis at the cellular level by switching off anabolic pathways and turning on ATP-producing pathways, thereby allowing the cell to maintain its energy level.<sup>9,10</sup> More recently, AMPK has been proposed to participate in the regulation of whole body energy homeostasis at the level of hypothalamus.<sup>11–13</sup> The activation of hypothalamic AMPK during starvation and its inactivation upon refeeding are mediated by nutritional changes in circulating hormones and nutrients. Indeed, glucose, insulin and leptin, which are known to inhibit food intake, inactivate hypothalamic AMPK,<sup>5</sup> whereas ghrelin and adiponectin, which stimulate food intake, activate hypothalamic AMPK.<sup>6,14</sup> Antagonistic effects on food intake were also observed after pharmacological modulation of intra-hypothalamic ATP levels by intracerebroventricular injection of 2-deoxyglucose or the fatty acid synthase inhibitor C75.<sup>7</sup> Furthermore, overexpression of a constitutively active form of AMPK<sup>5</sup> or intracerebroventricular injection of AMPK activators in the hypothalamus<sup>6</sup> stimulated food intake and body weight gain, whereas expression of a dominant-negative mutant of AMPK<sup>5</sup> had opposite effects. This AMPK-mediated control of food intake involves modifications of the hypothalamic mRNA content of the major orexigenic and anorexigenic neuropeptides<sup>5,7,8</sup> but the underlying mechanisms are still unknown.<sup>11</sup>

While a growing body of evidence highlights the role of AMPK in the hypothalamic control of satiety and the development of hyperphagia,<sup>15,16</sup> its involvement in the mechanism(s) underlying resistance to obesity has not been studied. The aim of our work was to investigate whether perturbation of hypothalamic AMPK regulation could be detected in the spontaneously hypophagic Lou/C rats, a strain derived from Wistar rat<sup>17</sup> and resistant to age-related obesity.<sup>18–20</sup>

## Methods

### Animals

Three-month-old age-paired male Lou/C and Wistar rats were kept in a controlled temperature (20–23 °C) and light (12 h/12 h cycle) environment with *ad libitum* access to food and water. Starvation was induced by food withdrawal 24 h before killing (at 0900 hours). Pair-fed Wistar rats were restricted for 8 weeks to the same amount of calories ingested by the Lou/C rats and were also starved for 24 h before killing. In separate experiments, animals starved for 24 h were placed in individual cages and their cumulative food intake was measured during the first 4 h following refeeding.

All procedures were performed in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals.

### Isolation of hypothalamus and blood samples

After decapitation, hypothalamus was quickly removed (less than 1 min) and frozen in liquid nitrogen. The tissues were homogenized with ultra-turax in 750  $\mu$ l of lysis buffer (50 mM Hepes (pH 7.6), 50 mM KCl, 50 mM NaF, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 1 mM dithiothreitol, 5 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM vanadate, 1% NP40) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (4  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin, 1 mM benzamidin and 0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride). Supernatants (12 000 g, 10 min), which are referred to as ‘extracts’ in the text, were kept at –80 °C until analysis. Blood from truncated rats was sampled and kept 45 min at room temperature before centrifugation. The supernatant containing serum was then removed and kept at –80 °C for further analysis. For ghrelin assay, blood was sampled in tubes containing EDTA and supernatants were immediately acidified with 0.1 N HCl.

### AMPK assay

AMP-activated protein kinase was immunoprecipitated from hypothalamic extracts with specific antibodies directed against  $\alpha$ 1- or  $\alpha$ 2-AMPK catalytic subunits (gift from DG Hardie, Dundee) and activity was assayed as described.<sup>21</sup>

### Western blot analysis

Tissue extracts were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Expression of AMPK, eukaryotic elongation factor 2 (EF2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were assessed by immunoblots using  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-AMPK, EF2 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) and STAT3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) antibodies respectively. Total acetyl-CoA carboxylase (ACC) was determined using streptavidin linked to horseradish peroxidase (Bio-Rad, Munich, Germany). Phosphorylation state of ACC and EF2 were measured with anti-phospho-Ser79 (Upstate, Chicago, IL, USA)- and anti-phospho-Thr56 (gift from S Horman, Brussels)-specific antibodies respectively. Hypothalamic distribution of  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 isoform of AMPK was measured by immunoblotting 30  $\mu$ g of proteins from liver and hypothalamus extracts of Wistar rats. STAT3 phosphorylation was determined using specific anti-phospho-Tyr705 antibody (Cell Signaling) after immunoprecipitation of STAT3. Quantification was performed by densitometry using Image J 1.32 (NIH, USA).

### Measurement of blood parameters

Glucose and 3-hydroxybutyrate were measured enzymatically<sup>22</sup> and non-esterified fatty acids by colorimetric assay

(Wako Chemicals, Richmond, VA, USA). Serum hormone levels were determined with commercial dedicated kits (Linco Research, St Charles, MO, USA).

#### ATP assay

Hypothalamus was homogenized in ice-cold 1 M HClO<sub>4</sub>-25 mM EDTA and supernatants were neutralized with 2 M KOH/0.3 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS). ATP concentrations were determined by high-performance liquid chromatography.

#### RNA purification and quantitative reverse transcription-coupled real-time PCR

RNA was extracted from the tissues with the Tripure RNA Isolation reagent (Roche, Mannheim, Germany). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed and quantitative real-time PCR was then performed with SYBR Green Core Kit on an MyIQ thermal cycler (Bio-Rad). mRNA contents were normalized for actin mRNA and expressed relative to that in fed Wistar rat using the 2<sup>-T<sub>ΔC</sub></sup> method.<sup>23</sup> Primer sequences used are listed in Supplementary Table 1.

#### Statistics

The results are expressed as means ± s.e.m. The statistical significance of differences was assessed by analysis of variance followed by Fisher's protected least significant *post hoc* test using Statview 5.0.1. software (SAS Institute Inc., USA).

## Results

#### Spontaneous hypophagia of Lou/C rats

The spontaneous hypophagia of Lou/C rats is already present at 3 weeks of age, immediately after weaning, reaches a plateau (~-40%) at 8 weeks of age and then remains constant for the rest of their life (average food intake of 549 ± 17 vs 317 ± 3 kcal week<sup>-1</sup> for Wistar and Lou/C rats respectively, *P* < 0.05). Body weight of the 3-month-old rats used in our study was significantly reduced in Lou/C compared with Wistar (273 ± 6 vs 380 ± 6 g respectively, *P* < 0.05, *n* = 5), in agreement with previous reports.<sup>18,19</sup>

#### Lack of activation of AMPK by starvation in the hypothalamus of Lou/C rats

The activity of the α1 and α2 isoforms of AMPK was measured in hypothalamic extracts from fed and 24 h-starved Lou/C rats and from their age-related Wistar counterparts. In the fed state, the content and activity of both AMPK isoforms were not different in the two strains of rats (Figures 1a-c). The α2 AMPK activity was similar to that previously reported<sup>8</sup> but represented only 5% of the total activity of AMPK, in agreement with the repartition of α isoforms of AMPK reported for the whole brain.<sup>24</sup> Immunoblots with

specific antibodies confirmed that the α1 isoform of AMPK was predominant in the whole hypothalamus. The liver, which contains about equal amounts of both AMPK isoforms, was taken as a control (Figure 1d).

Starvation increased the activity of both isoforms of hypothalamic AMPK in Wistar rats (+36 and +77% for α1 and α2 respectively, *P* < 0.05; Figures 1a and b), as previously reported,<sup>5</sup> whereas it failed to do so in the Lou/C rats. Immunoblots showed that AMPK content was similar in all conditions thus excluding a long-term effect (Figure 1c). Interestingly, the lack of starvation-induced hypothalamic AMPK activation in Lou/C rats was associated with a 50% reduction in their cumulative food intake during the first 4 h following refeeding (Figure 1e). To know whether the lack of AMPK activation could be due to the lower caloric intake of the Lou/C rats, we repeated the experiment in a group of pair-fed Wistar rats (40% less calories than control Wistar rats). However, starvation was still able to activate AMPK in these food-restricted Wistar rats (Figures 1a and b).

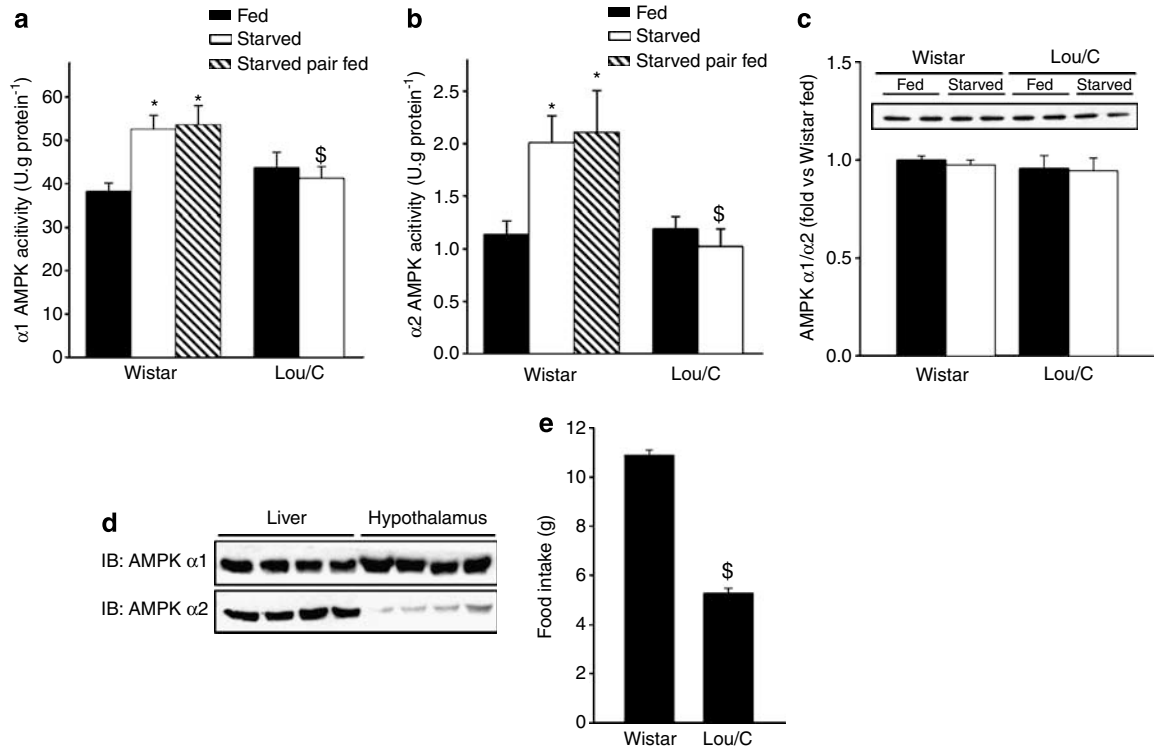
The phosphorylation state of ACC and EF2, two known targets of AMPK,<sup>25</sup> was increased by starvation in control Wistar but not in the Lou/C rats, the total ACC and EF2 contents being not affected (Figures 2a-d). This result confirms the lack of AMPK activation by starvation in the hypothalamus of Lou/C rats (Figure 1).

#### Lack of starvation-induced changes in mRNA levels of neuropeptides controlling food intake in the hypothalamus of Lou/C rats

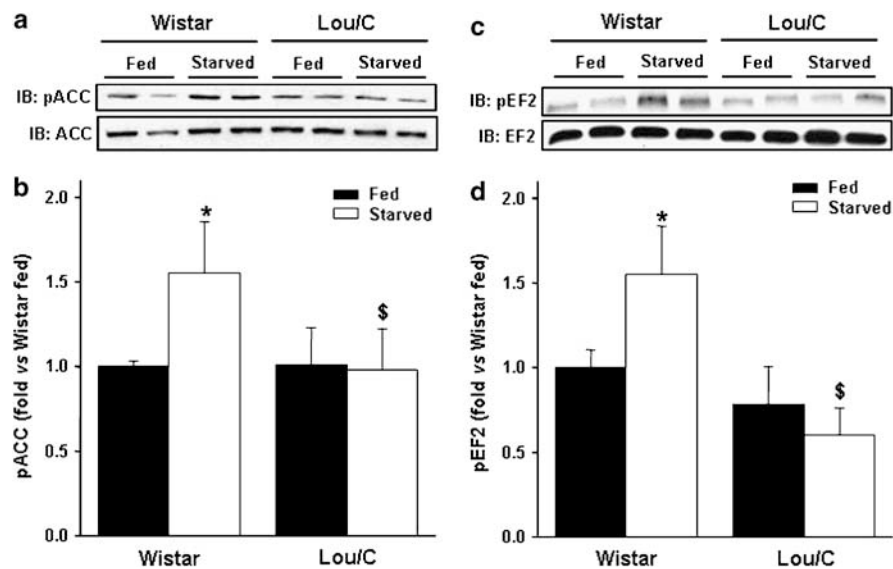
We measured mRNA levels of the major known orexigenic and anorexigenic neuropeptides by quantitative RT-PCR in hypothalamus extracts from fed and 24 h-starved Wistar and Lou/C rats (Table 1). As expected, starvation increased hypothalamic mRNA levels of NPY, AgRP, melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin and concomitantly decreased mRNA levels of POMC and CART in Wistar rats. Interestingly, starvation did not significantly change the mRNA levels of both orexigenic and anorexigenic neuropeptides in Lou/C rats, although a trend towards an increase in NPY and AgRP was observed. It should also be noted that in the fed state, the mRNA level of MCH was higher, whereas that of POMC was lower in the hypothalamus of Lou/C than in Wistar rats.

#### Different hormonal and metabolic responses to starvation in Wistar and Lou/C rats

We measured the circulating concentrations of several metabolites and hormones known to be involved in the control of hypothalamic AMPK. In Wistar rats, all the previously described positive and negative regulators of hypothalamic AMPK changed during starvation (Table 2) as expected,<sup>5,6,8,14</sup> and these changes were in agreement with the activation of hypothalamic AMPK. Indeed, starvation decreased glucose and insulin concentrations, and concomitantly increased ghrelin and adiponectin. Interestingly,



**Figure 1** AMPK activity and content in the hypothalamus of fed and starved Wistar and Lou/C rats.  $\alpha 1$  (a) and  $\alpha 2$  (b) AMPK activities were measured in whole hypothalamus extracts from fed or 24 h-starved Wistar and Lou/C rats and from 24 h-starved pair-fed Wistar after immunoprecipitation with specific antibodies for both isoforms. Total hypothalamic AMPK content was assessed by immunoblots using  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  antibodies (c, inset) and is expressed in arbitrary units as the ratio over the fed Wistar group (c). The results are means  $\pm$  s.e.m.,  $n = 9$ .  $^{*}P < 0.05$  compared with fed state and Wistar group respectively. The distribution of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  AMPK content in the hypothalamus was compared with that in the liver (d). Cumulative food intake of Wistar and Lou/C rats starved for 24 h was measured 4 h after refeeding (e). The results are means  $\pm$  s.e.m.,  $n = 6$ .  $^{*}P < 0.05$  compared with Wistar. AMPK, AMP-activated protein kinase.



**Figure 2** Phosphorylation state and content of ACC and EF2 in the hypothalamus of Wistar and Lou/C rats. Extracts from whole hypothalamus were immunoblotted with anti-phospho-Ser 79 ACC antibody (a and c) and anti-phospho-Thr 56 EF2 antibody (b and d). Total ACC and EF2 were used as loading controls. The results are expressed in arbitrary units as the ratio over the fed Wistar group and are means  $\pm$  s.e.m.,  $n = 8$ .  $^{*}P < 0.05$  compared with fed state and Wistar group respectively. ACC, acetyl-CoA carboxylase; EF2, elongation factor 2.

**Table 1** mRNA content of major (an)orexigenic neuropeptides in whole hypothalamus of fed and starved Wistar and Lou/C rats

	Wistar		Lou/C	
	Fed	Starved	Fed	Starved
NPY	1.00 ± 0.13	2.46 ± 0.22*	0.96 ± 0.08	1.29 ± 0.16 <sup>§</sup>
AgRP	1.00 ± 0.27	3.64 ± 0.69*	0.82 ± 0.53	2.40 ± 0.85
MCH	1.00 ± 0.16	1.79 ± 0.19*	1.72 ± 0.12 <sup>§</sup>	1.68 ± 0.18
Orexin	1.00 ± 0.13	1.37 ± 0.14	1.31 ± 0.11	1.19 ± 0.16
POMC	1.00 ± 0.15	0.71 ± 0.04*	0.61 ± 0.08 <sup>§</sup>	0.70 ± 0.05
CART	1.00 ± 0.11	0.79 ± 0.06*	0.99 ± 0.15	0.96 ± 0.12

Abbreviations: AgRP, agouti-related protein; CART, cocaine-amphetamine-related transcript; MCH, melanin-concentrating hormone; NPY, neuropeptide Y; POMC, pro-opiomelanocortin. RNA was extracted from hypothalamus for quantitative real-time PCR on cDNA for NPY, AgRP, MCH, Orexin, POMC and CART. mRNA contents were normalized for actin mRNA and expressed relative to that in fed Wistar rat using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. The results are means ± s.e.m.,  $n=4$ . \*<sup>§</sup> $P<0.05$  compared with fed state and Wistar group respectively.

while glucose and insulin levels were lower in fed Lou/C compared with Wistar rats, the starvation-induced relative decrease in both parameters was not significantly different between the two strains. By contrast, the increase in circulating level of ghrelin induced by starvation in Wistar was not evidenced in Lou/C rats, whereas its concentration was similar in the fed state. Moreover, adiponectin concentration was significantly higher in fed Lou/C compared with fed Wistar rats and was also slightly increased by starvation, but only in Wistar rats.

Leptin is one of the best known negative effectors of hypothalamic AMPK.<sup>5,6</sup> Thus, we confirmed here that starvation induced a threefold decrease in circulating leptin (Table 2), which correlated with an activation of AMPK in the hypothalamus of Wistar rats. However, while the leptin level was significantly reduced in fed Lou/C rats, as previously reported,<sup>19,20,26</sup> the starvation-induced decrease in leptin concentration evidenced in Wistar was not present in Lou/C rats. The Janus kinase (JAK)–STAT pathway is believed to mediate leptin signaling in the hypothalamus mainly via an increase in STAT3 phosphorylation.<sup>27</sup> Interestingly, starvation induced a significant decrease in STAT3 phosphorylation in the hypothalamus of Wistar but not in Lou/C rats (Figures 3a–c). To note, STAT3 phosphorylation was the same in the fed state for the two strains, whereas leptin level was lower in the Lou/C rats. In line with these results, mRNA level of leptin receptor B (OBRb) was significantly higher in the hypothalamus of fed Lou/C compared with fed Wistar rats and was increased by starvation, but only in Wistar rats (Table 3). Furthermore, we analyzed the effect of starvation on the expression of the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a known downstream target gene that is upregulated following STAT3 phosphorylation. While the starvation-induced decrease in the mRNA levels of SOCS-3 was evidenced in both strains, the hypothalamic content of this transcript was greater in starved Lou/C than in starved Wistar rats. In addition,

**Table 2** Serum concentrations of metabolites and hormones in starved and fed Wistar and Lou/C rats

	Wistar		Lou/C	
	Fed	Starved	Fed	Starved
Glucose (mg per 100 ml)	120 ± 5	88 ± 6*	102 ± 2 <sup>§</sup>	77 ± 4*
NEFA (mg per 100 ml)	6.2 ± 1.4	17.8 ± 0.8*	3.9 ± 0.7 <sup>§</sup>	10.9 ± 0.8* <sup>§</sup>
3-Hydroxybutyrate (mM)	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.01*	0.17 ± 0.01 <sup>§</sup>	0.22 ± 0.01* <sup>§</sup>
Insulin (ng ml <sup>-1</sup> )	2.3 ± 0.5	0.5 ± 0.2*	0.7 ± 0.2 <sup>§</sup>	0.3 ± 0.1*
Ghrelin (ng ml <sup>-1</sup> )	11.2 ± 3.4	28.2 ± 6.4*	9.6 ± 1.2	13.1 ± 3.1 <sup>§</sup>
Adiponectin (ng ml <sup>-1</sup> )	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.1*	2.4 ± 0.4 <sup>§</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>§</sup>
Leptin (ng ml <sup>-1</sup> )	9.2 ± 0.3	3.3 ± 0.6*	2.6 ± 0.2 <sup>§</sup>	2.8 ± 1.3

Abbreviation: NEFA, non-esterified fatty acids. The results are means ± s.e.m.,  $n=4-8$ . \*<sup>§</sup> $P<0.05$  compared with fed state and Wistar group respectively.

stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (SCD-1), another target gene known to be specifically repressed by leptin,<sup>28</sup> was clearly downregulated in Lou/C rats (Table 3). The mRNA content of STAT3, JAK2, the protein tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) and SCD-2 was not modified in both strains whatever the nutritional state (Table 3). Finally, none of the two other pathways mediating leptin action, that is PI3K/PKB and MAPK/ERK, were apparently modified by starvation in either strain (data not shown). Taken together, these data indicate the persistence of an active leptin–STAT3 pathway in the hypothalamus of starved Lou/C rats.

We could not detect any significant modification in intrahypothalamic ATP concentrations in whole hypothalamus of both strains whatever the nutritional state be ( $1.80 \pm 0.08$  vs  $1.80 \pm 0.14$  nmol ATP per mg wet weight in fed state and  $1.65 \pm 0.09$  vs  $1.79 \pm 0.11$  nmol ATP per mg wet weight in starved Wistar and Lou/C rats respectively;  $n=5$ ), indicating that the lack of AMPK activation by starvation in Lou/C rat could not be related to acute changes in hypothalamic adenine nucleotides.

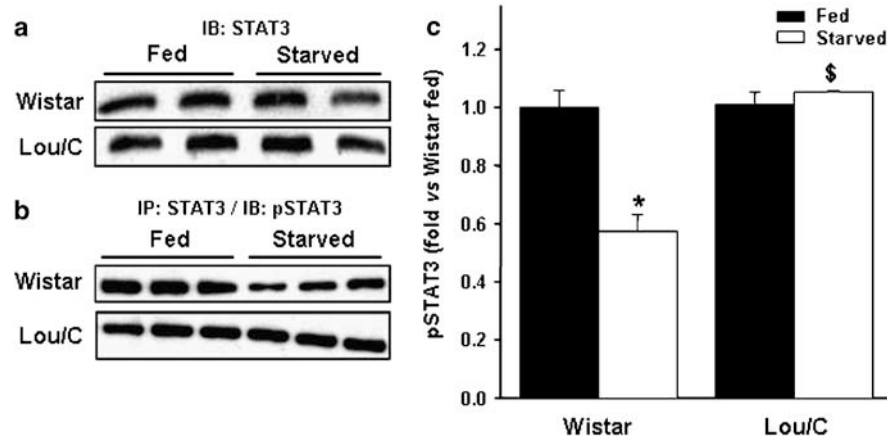
## Discussion

The main finding of our work is that the starvation-induced AMPK activation was lacking in the hypothalamus of the Lou/C rats. Normally, food deprivation modulates circulating levels of nutrients and hormones, which lead to AMPK activation in the hypothalamus and to a subsequent increase and decrease in the mRNA content of the orexigenic and anorexigenic neuropeptides respectively, which in turn stimulate food intake. These nutritionally induced changes are obviously lacking in the Lou/C rats. Therefore, our results confirm the pivotal role of hypothalamic AMPK in the control of food intake and demonstrate for the first time that a deficiency of this control is observed in Lou/C rats, a strain of hypophagic rats resistant to obesity.

### Role of hypothalamic AMPK in the control of food intake

Circulating nutrients and hormones reflect energy balance and body adiposity and act as signals that are integrated in





**Figure 3** Effect of 24 h starvation on phosphorylation state and content of STAT3 in the hypothalamus of Wistar and Lou/C rats. STAT3 contents were assessed by immunoblots in hypothalamic extracts using anti-STAT3 antibody (a). The phosphorylation state of hypothalamic STAT3 (b) was determined with anti-phospho-Tyr705 STAT3 antibody after immunoprecipitation of the protein and is expressed in arbitrary units as a ratio over the fed Wistar group (c). The results are means  $\pm$  s.e.m.,  $n=5$ . \* $^{\$}$  $P<0.05$  compared with fed state and Wistar group respectively. STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

**Table 3** mRNA content of various proteins involved in leptin signaling in the hypothalamus of fed and starved Wistar and Lou/C rats

	Wistar		Lou/C	
	Fed	Starved	Fed	Starved
ObRb	1.00 $\pm$ 0.12	1.60 $\pm$ 0.15*	1.69 $\pm$ 0.06 $^{\$}$	1.37 $\pm$ 0.17
STAT3	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.08	1.01 $\pm$ 0.09
JAK2	1.00 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.08
PTP1B	1.00 $\pm$ 0.12	1.13 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.07
SOCS-3	1.00 $\pm$ 0.11	0.70 $\pm$ 0.14*	1.43 $\pm$ 0.09 $^{\$}$	1.12 $\pm$ 0.03* $^{\$}$
SCD-1	1.00 $\pm$ 0.15	0.80 $\pm$ 0.15	0.65 $\pm$ 0.07 $^{\$}$	0.41 $\pm$ 0.02* $^{\$}$
SCD-2	1.00 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.12	1.11 $\pm$ 0.10	1.04 $\pm$ 0.15

RNA was extracted from hypothalamus for quantitative real-time PCR on cDNA for ObRb, STAT3, JAK2, PTP1B, SOCS-3, SCD-1 and SCD-2. mRNA contents were normalized for actin mRNA and expressed relative to that in fed Wistar rat using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. The results are means  $\pm$  s.e.m.,  $n=4$ . \* $^{\$}$  $P<0.05$  compared with fed state and Wistar group respectively.

the hypothalamus, which in turn control neuropeptides modulating food intake. An increasing number of reports demonstrate that hypothalamic AMPK could mediate this process. However, most findings come from short-term and direct intrahypothalamic injection of drugs<sup>6-8,13</sup> and hormones<sup>5</sup> or from genetic loss or gain-of-function experiments.<sup>5,16</sup> Recently, Namkoong *et al.*<sup>16</sup> showed that insulin and leptin deficiencies in streptozotocin-diabetic rats led to increased hypothalamic AMPK activity, orexigenic neuropeptide expression and hyperphagia, all being prevented by intracerebroventricular administration of compound C, a specific inhibitor of AMPK. We describe here an opposite model, that is rats exhibiting spontaneous food restriction. In this peculiar hypophagic strain, the lack of starvation-induced AMPK activation in the hypothalamus correlated with a lack of change in the mRNA content for the main neuropeptides controlling food intake, suggesting that the innate deficiency is upstream of AMPK.

**Regulation of AMPK activity in the hypothalamus of Lou/C rats**  
As AMPK is highly sensitive to the AMP:ATP ratio, the lack of starvation-induced AMPK activation in the hypothalamus of Lou/C rats could be due to a different response to changes in hypothalamic metabolism induced by nutrients and hormones. However, we were unable to detect any significant difference in ATP levels after starvation in both strains of rat, indicating that changes in adenine nucleotides cannot be invoked to explain the starvation-induced activation of hypothalamic AMPK in Wistar rats and the lack of this effect in Lou/C rats. Therefore, other factors should be considered.

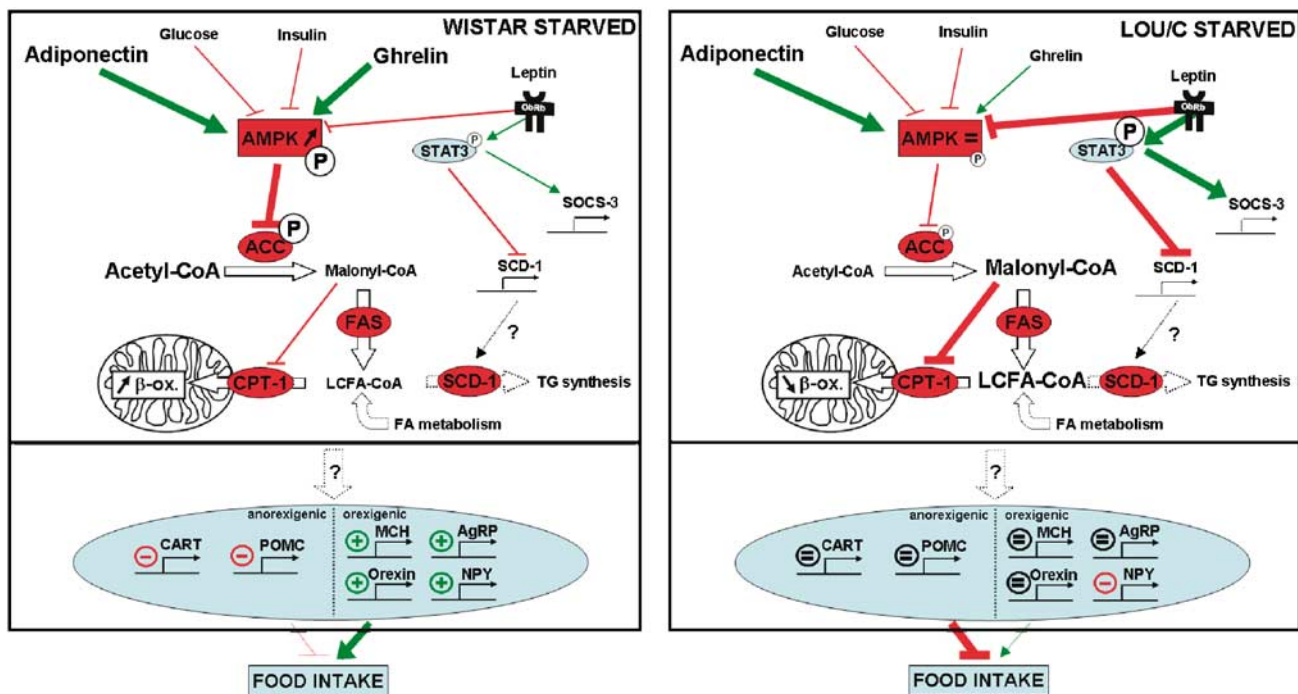
Starvation induced a similar relative decrease of glucose and insulin levels in both strains, suggesting that these two well-known negative effectors of hypothalamic AMPK were not involved in the lack of starvation-induced activation of AMPK in Lou/C rats. Although glucose and insulin levels were significantly lower in the fed Lou/C compared with Wistar rats, as previously reported,<sup>20,26</sup> the hypothalamic AMPK activity was not modified, suggesting an adaptation of glucose/insulin signaling to the lower circulating levels in Lou/C rats. As previously suggested,<sup>15</sup> this underlines the fact that dynamic changes rather than absolute levels of AMPK effectors are mainly involved in hypothalamic regulation of the kinase. According to a recent work from Kadowaki's group, we could also speculate that the higher adiponectin levels evidenced in the fed Lou/C rats would explain why AMPK activity is similar in fed Wistar and Lou/C rats despite reduced circulating levels of insulin and glucose in the latter strain. Indeed, adiponectin has been shown to cross the blood-brain barrier and increase hypothalamic AMPK activity in arcuate nucleus.<sup>14</sup> In addition, adiponectin could also reverse the leptin-induced suppression of hypothalamic AMPK activity and its subsequent inhibitory effect on food intake by a mechanism that requires the presence of its AdipoR1 receptor.<sup>14</sup>

Circulating ghrelin, which activates hypothalamic AMPK and stimulates food intake,<sup>6</sup> increased more than twofold in Wistar but not in Lou/C rats during starvation, suggesting that this could result in reduced AMPK activation in the Lou/C rats. However, although the ghrelin-induced food intake is thought to be mediated via the orexin pathway in the hypothalamus,<sup>29</sup> no clear-cut differences in mRNA levels of orexin (Table 1) or of the neuropeptide itself<sup>26</sup> were found between the two strains of rat. In addition, ghrelin-deficient mice exhibited normal basal levels of hypothalamic orexigenic and anorexigenic neuropeptides and their feeding behavior was not affected, indicating that ghrelin is probably not an essential regulator of food intake and has, at best, a redundant role in the regulation of appetite.<sup>30</sup> However, we cannot rule out that subtle cross talks between ghrelin and other hormones, notably adiponectin and leptin, could be involved in hypothalamic regulation of food intake, leading to a further degree of complexity.

*Modifications of leptin signaling in the hypothalamus of Lou/C rats*

Hypothalamic action of leptin is believed to play a critical role in maintaining normal food intake and body weight

since leptin resistance in the hypothalamus is often associated with hyperphagia and obesity.<sup>31–33</sup> In Wistar rats, serum leptin level was decreased by threefold during starvation and both the leptin-mediated activation of STAT3 and induction of SOCS-3 expression were also reduced in the hypothalamus. Since leptin is one of the most potent negative regulator of hypothalamic AMPK,<sup>5,6</sup> this could explain, at least in part, the activation of AMPK in this condition. As previously reported,<sup>18</sup> the Lou/C rats exhibited lower leptin levels compared with Wistar rats in fed state, this being probably related to their reduced fat depots. Interestingly, despite the difference in leptin levels between the two strains, STAT3 phosphorylation was similar during fed state, reflecting an adaptation of leptin signaling in the hypothalamus of Lou/C rats (see Table 2 and Figure 3c). This could be due to upregulation of ObRb gene expression in this condition (Table 3), confirming previous reports showing that the leptin-mediated phosphorylation of STAT3 is specifically dependent on this isoform of leptin receptor.<sup>34,35</sup> More importantly, while circulating leptin and STAT3 phosphorylation were clearly decreased by starvation in Wistar rats, they remained unaffected in starved Lou/C rats, so that STAT3 phosphorylation was almost 50% higher in Lou/C



**Figure 4** Proposed mechanism for the lack of starvation-induced hypothalamic AMPK activation and hypophagia in Lou/C rats. Starvation fails to activate AMPK in the hypothalamus of the Lou/C rats (right panel) in contrast with Wistar rats (left panel). Upstream of AMPK, this lack could be related to the persistence of an active leptin signaling and/or the lack of increase in circulating ghrelin in Lou/C rats. In agreement with the former interpretation, STAT3 phosphorylation was increased and expression of SOCS-3 and SCD-1, the target genes of leptin, was increased and decreased respectively. Downstream of AMPK, ACC was less phosphorylated in Lou/C rats. The expected consequences are elevated malonyl-CoA concentration, leading to subsequent inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation, and increased level of LCFA-CoA. Taken together, the hypothalamic integration of these signals results in the absence of starvation-induced changes in neuropeptide expression and inhibition of food intake in Lou/C rats. ACC, acetyl-CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase 1; FA, fatty acids; FAS, fatty acid synthase; LCFA-CoA, long-chain fatty acyl coenzyme A; SCD-1, stearoyl-coenzyme A desaturase 1; SOCS-3, suppressor of cytokine signaling-3; TG, triglycerides.

compared with Wistar rats. The leptin-induced STAT3 phosphorylation is known to negatively regulate the transcription of NPY and AgRP, and conversely stimulate expression of POMC and CART.<sup>36–38</sup> Thus, the increased STAT3 phosphorylation in starved Lou/C rats could explain some of the differences found in hypothalamic neuropeptide expression.

Finally, while changes in ghrelin and adiponectin signaling are not definitively ruled out, our results suggest that a modification of signaling pathway triggered by leptin in hypothalamus of the Lou/C rats could, at least in part, contribute to the lack of AMPK activation during starvation and the subsequent neuropeptide-mediated hypophagia. However, the mechanism(s) by which these circulating hormones regulate AMPK is still unknown, although this may involve changes in upstream AMPK kinases.<sup>6</sup> Furthermore, the link(s) between AMPK and neuropeptide expression in the hypothalamus remains to be identified. Moreover, since discrete regions of the hypothalamus constitute a complex network involved in the regulation of food intake,<sup>5</sup> it would be of interest to study changes in AMPK activity and/or neuropeptide mRNA levels in various hypothalamic nucleus in Lou/C compared with Wistar rats.

It has been recently reported that modulation of malonyl-CoA and/or long-chain fatty acyl coenzyme A (LCFA-CoA) concentrations in the hypothalamus acts as potent regulators of food intake.<sup>39–43</sup> ACC controls fatty acid partitioning between lipid synthesis and oxidation by its product malonyl-CoA, which inhibits the entry of long-chain fatty acids into the mitochondria via the carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1). Accordingly, inactivation of ACC by AMPK decreases malonyl-CoA concentration and eventually favors fatty acid oxidation.<sup>44</sup> Our results in Lou/C rats are consistent with the proposed 'hypothalamic fatty acid sensing hypothesis',<sup>45,46</sup> which involves hormone-mediated lack of AMPK activation during starvation, thus preventing subsequent ACC phosphorylation and inactivation, which in turn would maintain elevated intrahypothalamic malonyl-CoA and/or LCFA-CoA content and inhibits feeding (Figure 4). In addition, we propose that a decrease in SCD-1 expression, a rate-limiting enzyme catalyzing the synthesis of monounsaturated fatty acids from LCFA-CoA,<sup>47–49</sup> which is known to be specifically repressed by leptin,<sup>28</sup> could also participate in the higher intrahypothalamic level of malonyl-CoA and/or LCFA-CoA by decreasing triglycerides and phospholipid synthesis.

## Conclusions

We confirm in this study that hypothalamic AMPK activity is modulated by nutritional state in Wistar control rats, this being correlated with variation of both circulating glucose, insulin, ghrelin, adiponectin and leptin, and whole hypothalamic mRNA levels of orexigenic and anorexigenic neuropeptides. In addition, we show that this AMPK-mediated

hypothalamic pathway controlling food intake is not activated during starvation in Lou/C rat, a rodent model of resistance to age-related obesity exhibiting spontaneous hypophagia. This lack of activation could result from intricate modifications in the nutritionally induced secretion of ghrelin, adiponectin and leptin and/or a modulation of hypothalamic leptin signaling.

## Acknowledgements

We are grateful to Liliane Maisin and Martine de Cloedt and to Drs Caroline J Small and Caroline R Abbott for technical assistance. This work was supported by the Belgian Fund for Medical Research, the Belgian Federal Interuniversity Poles of Attraction, the 'Actions de Recherche Concertées', the European Union FP6 programme (Exgenesis) and by a French-Belgian INSERM/CFB/FNRS collaborative grant. B Guigas is recipient of the ICP-'Michel de Visscher' Fellowship and N Taleux is recipient of a French EURODOC grant of the Région Rhône-Alpes.

## References

- Schwartz MW, Porte Jr D. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 2005; **307**: 375–379.
- Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005; **85**: 1131–1158.
- Leibowitz SF, Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004; **25**: 473–504.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005; **184**: 291–318.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B *et al*. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; **428**: 569–574.
- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR *et al*. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004; **279**: 12005–12008.
- Kim EK, Miller I, Aja S, Landree LE, Pinn M, McFadden J *et al*. C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2004; **279**: 19970–19976.
- Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS *et al*. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2004; **10**: 727–733.
- Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L *et al*. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 2006; **574**: 41–53.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *J Physiol* 2006; **574**: 7–15.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; **1**: 15–25.
- Kim MS, Lee KU. Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. *J Mol Med* 2005; **83**: 514–520.
- Lee K, Li B, Xi X, Suh Y, Martin RJ. Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated

- protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* 2005; **146**: 3–10.
- 14 Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H *et al*. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007; **6**: 55–68.
  - 15 Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 2006; **281**: 18933–18941.
  - 16 Namkoong C, Kim MS, Jang PG, Han SM, Park HS, Koh EH *et al*. Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes* 2005; **54**: 63–68.
  - 17 Bazin H. The Louvain (Lou) rats. In: *Rat Hybridomas and Rat Monoclonal Antibodies*. CRC Press: Cleveland, OH, 1990, pp 43–51.
  - 18 Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Sornay-Mayet MH, Cottet-Emard JM *et al*. Metabolic characteristics and body composition in a model of anti-obese rats (Lou/C). *Obes Res* 2002; **10**: 188–195.
  - 19 Couturier K, Servais S, Koubi H, Sempore B, Cottet-Emard JM, Guigas B *et al*. Metabolic and hormonal responses to exercise in the anti-obese Lou/C rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; **28**: 972–978.
  - 20 Perrin D, Soulage C, Pequignot JM, Geloën A. Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations. *Diabetologia* 2003; **46**: 1489–1496.
  - 21 Davies SP, Carling D, Hardie DG. Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem* 1989; **186**: 123–128.
  - 22 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: New York, 1991.
  - 23 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.
  - 24 Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* 2000; **346** (Part 3): 659–669.
  - 25 Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L *et al*. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol* 2002; **12**: 1419–1423.
  - 26 Kappeler L, Zizzari P, Grouselle D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Plasma and hypothalamic peptide-hormone levels regulating somatotroph function and energy balance in fed and fasted states: a comparative study in four strains of rats. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**: 980–988.
  - 27 McCowen KC, Chow JC, Smith RJ. Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats *in vivo*. *Endocrinology* 1998; **139**: 4442–4447.
  - 28 Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA *et al*. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science* 2002; **297**: 240–243.
  - 29 Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T *et al*. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003; **144**: 1506–1512.
  - 30 Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R *et al*. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 8227–8232.
  - 31 Scarpace PJ, Matheny M, Shek EW. Impaired leptin signal transduction with age-related obesity. *Neuropharmacology* 2000; **39**: 1872–1879.
  - 32 Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilay N, Feng Z, Rossetti L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 2001; **50**: 2786–2791.
  - 33 Sahu A. Resistance to the satiety action of leptin following chronic central leptin infusion is associated with the development of leptin resistance in neuropeptide Y neurons. *J Neuroendocrinol* 2002; **14**: 796–804.
  - 34 Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6231–6235.
  - 35 Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell Jr JE, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 1996; **14**: 95–97.
  - 36 Baskin DG, Breininger JE, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 1999; **48**: 828–833.
  - 37 Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjorbaek C *et al*. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 2001; **107**: 111–120.
  - 38 Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 1999; **140**: 4923–4931.
  - 39 Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 12624–12629.
  - 40 Hu Z, Dai Y, Prentki M, Chohnan S, Lane MD. A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake. *J Biol Chem* 2005; **280**: 39681–39683.
  - 41 Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanas G, Rossetti L. Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 2002; **51**: 271–275.
  - 42 Morgan K, Obici S, Rossetti L. Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *J Biol Chem* 2004; **279**: 31139–31148.
  - 43 He W, Lam TK, Obici S, Rossetti L. Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 227–233.
  - 44 Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* 2003; **144**: 5179–5183.
  - 45 Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 579–584.
  - 46 Lane MD, Hu Z, Cha SH, Dai Y, Wolfgang M, Sidhaye A. Role of malonyl-CoA in the hypothalamic control of food intake and energy expenditure. *Biochem Soc Trans* 2005; **33**: 1063–1067.
  - 47 Asilmaz E, Cohen P, Miyazaki M, Dobrzyn P, Ueki K, Fayzikhodjaeva G *et al*. Site and mechanism of leptin action in a rodent form of congenital lipodystrophy. *J Clin Invest* 2004; **113**: 414–424.
  - 48 Cohen P, Ntambi JM, Friedman JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 and the metabolic syndrome. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003; **3**: 271–280.
  - 49 Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 2004; **43**: 91–104.

Supplementary Information accompanies the paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

## RÉSUMÉ

### **Relation entre Stress Oxydant et Homéostasie Glucidique au cours du Diabète de Type 2 : Adaptation de la Cellule $\beta$ Pancréatique.**

Le but de ce travail a été d'étudier l'adaptation  $\beta$ -cellulaire au stress oxydant (SO) dans un modèle animal de diabète de type 2, le rat GK/Par. Dans le premier volet de cette thèse, nous avons évalué le stress oxydant insulaire et l'impact des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sur la sécrétion de l'insuline. Les îlots de rats diabétiques GK/Par apparaissent protégés contre le SO, car (i) les marqueurs de SO ciblent essentiellement la périphérie insulaire (aires vasculaires et inflammatoires) ; (ii) l'accumulation d'ERO est plus faible comparativement aux îlots témoins (Wistar) ; (iii) leur sécrétion de l'insuline n'est pas altérée après exposition aux ERO ; et (iv) ces adaptations sont associées à une augmentation des défenses antioxydantes insulaires. Dans un deuxième volet, nous avons vérifié si ces mécanismes adaptatifs pouvaient expliquer la protection des cellules  $\beta$  contre l'apoptose chez le rat GK/Par diabétique. Nous avons montré que le phénotype particulier de l'îlot GK/Par diabétique consiste, *ex vivo*, en une augmentation des gènes anti-apoptotiques, associée *in vitro* à une résistance contre l'apoptose induite par les ERO. Nous avons démontré que l'AMPc joue un rôle dans cette résistance à l'apoptose. Compte tenu de l'existence de sources d'ERO proches des cellules endocrines insulaires chez le rat GK/Par, nous avons, dans un dernier volet, étudié le rôle d'une dysfonction endothéliale et du processus inflammatoire associé (phénomène au potentiel pro-oxydant) dans l'adaptation antioxydante des îlots. Le blocage de la voie IL-1 *via* un traitement *in vivo* par IL-1Ra a permis, au niveau insulaire, de diminuer l'activation endothéliale, le stress inflammatoire et de normaliser l'expression des gènes antioxydants. Enfin, puisqu'il existe une production d'ERO insulaire précoce chez le rat GK/Par (avant l'installation du diabète), nous suggérons qu'elle soit à l'origine de l'augmentation des défenses antioxydantes/anti-apoptotiques. Cette adaptation est en place après installation du diabète et permet à l'îlot GK/Par de contrer l'environnement diabétogène pro-oxydant (glucolipotoxicité, inflammation). Enfin, nous proposons que la dysfonction  $\beta$ -cellulaire engendrée par un excès d'antioxydants endogènes soit le prix à payer pour protéger la cellule  $\beta$  du rat GK/Par de la mort cellulaire.

### **The Relationship between Oxidative Stress and Glucose Homeostasis during Type 2 Diabetes: Adaptation of Pancreatic $\beta$ -cell.**

The aim of this work was to study the  $\beta$ -cell adaptation to oxidative stress (OS) using a relevant model of type 2 diabetes, the GK/Par rat. In the first part, we have evaluated the islet OS status and the  $\beta$ -cell insulin secretory response to reactive oxygen species (ROS). Diabetic GK/Par rat islets were remarkably protected against OS, because (i) OS markers targeted mostly peri-islet vascular and inflammatory areas, and not islet endocrine cells; (ii) they maintained basal ROS accumulation lower than Wistar islets; (iii) GK/Par insulin secretion exhibited strong resistance to the toxic effect of ROS exposure; and (iv) such adaptation was associated with high antioxidant defenses. The second part of this work investigated whether such protection could be a mechanism by which diabetic GK/Par  $\beta$ -cells are spontaneously protected from death *in situ*. Our results show that the peculiar GK/Par  $\beta$ -cell phenotype was associated with an increased expression of many stress genes including anti-apoptotic genes. We demonstrated that such combination confers resistance to cytotoxic ROS exposure *in vitro*, raising the possibility that at least some of the activated stress/defense genes have protective effects against  $\beta$ -cell death. We also presented some evidence that the GK/Par  $\beta$ -cell resistance to ROS is at least partly cAMP-dependent. Given OS may originate from other sources than  $\beta$  cells, we got, in the third part, some evidence of the putative role of islet endothelial cell (EC) dysfunction and related inflammatory process in mediating the islet hardening to ROS. *In vivo* treatment with the antagonist of the IL-1 receptor (IL-1Ra) reduced islet EC activation, inflammatory stress and normalized antioxidant genes. Finally, we showed that early (before diabetes onset) islet ROS production may induce antioxidant/anti-apoptotic defense mechanisms, which are operative after diabetes onset in GK/Par rats. The GK/Par model illustrates the effectiveness of  $\beta$ -cells adaptive response to achieve tolerance to the diabetic environment (glucolipotoxicity and inflammation). It is also proposed that  $\beta$ -cell dysfunction could be the necessary price to pay to blunt ROS accumulation that may otherwise compromise  $\beta$ -cell survival.

**DISCIPLINE** : Physiologie et Physiopathologie

**MOTS-CLÉS** : Diabète de Type 2, Rat GK/Par, Stress Oxydant, Mitochondrie, Cellule  $\beta$ , Sécrétion de l'Insuline, Apoptose, Inflammation, Endothélium.

**Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine** – CNRS UMR 7059, F – 75205 PARIS  
**Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée** – INSERM U884, BP 53X, 38041 Grenoble