



HAL
open science

Rôle des Sérine/Thréonine Kinases dans la cellule bêta pancréatique

Mathie Tenenbaum

► **To cite this version:**

Mathie Tenenbaum. Rôle des Sérine/Thréonine Kinases dans la cellule bêta pancréatique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS011 . tel-02004521

HAL Id: tel-02004521

<https://theses.hal.science/tel-02004521v1>

Submitted on 1 Feb 2019

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

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

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

En science de la vie et de la santé

Spécialité : Biochimie, physiologie et biologie cellulaire

Rôle des Sérine-Thréonine Kinases dans la cellule bêta pancréatique

MATHIE TENENBAUM

Thèse dirigée par le Pr. Amar Abderrahmani

Soutenue le 14 septembre 2018

Composition du jury :

Dr. Blondeau Bertrand (Rapporteur)

Pr. Dalle Stéphane (Rapporteur)

Pr. Lestavel Sophie (Examinatrice)

Pr. Jonas Jean-Christophe (Examinateur)

Dr. Eberlé Delphine (Examinatrice)

Pr. Abderrahmani Amar (Directeur de thèse)

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
REMERCIEMENTS	5
RESUME	7
ABSTRACT	8
ABBRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
I. L'HOMEOSTASIE GLUCIDIQUE	11
A. GENERALITES	11
B. LA CELLULE BETA PANCREATIQUE	13
1. Les îlots de Langerhans	13
2. Production et sécrétion de l'insuline.....	16
C. DEVELOPPEMENT DE LA MASSE FONCTIONNELLE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES	19
1. Embryogenèse et développement du pancréas endocrine	19
2. Développement postnatal de la masse de cellules bêta pancréatiques.....	22
3. Rôle des acteurs du cycle cellulaire dans l'expansion de la masse des cellules bêta pancréatiques	26
4. Acquisition d'une masse de cellule bêta fonctionnelle : la gluco-compétence	27
D. EXPANSION DE LA MASSE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES DANS LA GROSSESSE ET L'OBESITE	28
II. PLASTICITE DE LA MASSE FONCTIONNELLE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES DANS LE DIABETE	30
A. DIABETE : DEFINITION	30
1. Le diabète de type 1	30
2. Les autres formes de diabètes	31
3. Le diabète gestationnel	32
B. LE DIABETE DE TYPE 2	33
1. Augmentation de la masse et de la fonction des cellules bêta en réponse à l'insulino- résistance due à l'obésité	34
2. Perte de la sécrétion de l'insuline et de la masse des cellules bêta : environnement diabétogène	36
a. Le stress oxydatif	38
b. L'inflammation	38
c. Le stress du réticulum endoplasmique dans la cellule bêta pancréatique.	39
d. Rôle des LDL-oxydées dans le dysfonctionnement de la cellule bêta pancréatique	42
C. THERAPIE ACTUELLE DU DIABETE DE TYPE 2	44
III. ROLE DES SERINE-THREONINE KINASES (STKS) DANS LE CONTROLE DE LA FONCTION ET DE LA MASSE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES	45
A. GENERALITES	45

B. LES MAPKS.....	46
1. La famille des MAPKS.....	46
2. Rôles dans la cellule bêta	47
a. ERK1/2	47
b. P38.....	48
C. JNKs	48
1. Caractéristiques des différentes JNKs	48
2. Mécanisme d'activation et cibles des JNKs dans un contexte d'insulino-résistance.....	51
3. Les JNKs et la cellule bêta pancréatique	51
4. Focus sur l'isoforme JNK3.....	52
D. MAP3K12 (DLK)	53

OBJECTIFS..... 56

I. ROLE DES STKS DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MASSE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES	56
II. ROLE DES SERINE-THREONINE KINASES DANS L'EFFET DELETERE DE FACTEURS DIABETOGENES SUR LA CELLULE BETA PANCREATIQUE.....	57

MATERIELS ET METHODES..... 58

I. MODELES UTILISES.....	58
A. ILOTS DE LANGERHANS	58
B. LIGNEES CELLULAIRES	59
C. TRANSFECTION DES CELLULES.....	59
D. TRAITEMENT.....	60
E. TEST DE SECRETION D'INSULINE	61
II. ANALYSE DU NIVEAU D'EXPRESSION GENIQUE.....	61
A. EXTRACTION ET DOSAGE DES ARN	61
B. RETROTRANSCRIPTION	62
C. PCR QUANTITATIVE.....	62
D. QUANTIFICATION.....	64
III. ANALYSE DES PROTEINES	64
A. TECHNOLOGIE DU PAMGENE.....	64
B. TECHNIQUE IMMUNOLOGIQUE.....	65
1. Immunohistochimie	65
2. Test de prolifération : Ki67	66
3. Technique du TUNEL	67
4. Technique du western blot	67
a. Extraction des protéines totales.....	67
b. Dosage protéique.....	68
c. Immunoprécipitation.....	68
d. Western Blot	68

RESULTATS..... 71

I. ETUDE DU ROLE DES SERINE-THREONINE KINASES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LE MAINTIEN DE LA MASSE DE CELLULES BETA PANCREATIQUES.....	71
A. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE.....	71
B. ROLE DE LA DUAL LEUCINE ZIPPER KINASE, DLK, DANS LE DEVELOPPEMENT POSTNATAL.....	72

1. Expression de DLK dans les îlots pancréatiques en période postnatale	72
2. Rôle de DLK dans la prolifération et l'apoptose des cellules bêta pancréatiques en période postnatale.....	75
3. Etude de l'effet de DLK sur un modèle de souris invalidées pour le gène <i>Dlk</i>	79
4. Etude du rôle de DLK dans la sécrétion d'insuline par les cellules bêta immatures	81
C. ETUDE DE LA SIGNALISATION DE DLK EN PERIODE POSTNATALE : ROLE DE JNK3.....	83
1. Identification des sérine-thréonine kinases activées dans des îlots de rats nouveaux nés.....	83
2. Etude de l'implication de JNK3.....	85
D. ETUDE DE L'EXPRESSION DE DLK DANS DES MODELES DE COMPENSATION DE LA CELLULE BETA PANCREATIQUE...	88
E. REGULATION DE L'EXPRESSION DE DLK DANS DES ILOTS PANCREATIQUES	92
F. CONCLUSION.....	94
II. ETUDE DE L'EFFET DES LIPOPROTEINES MODIFIEES SUR LE DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES BETA PANCREATIQUES	95
A. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE.....	95
B. ETUDE DU ROLE DU STRESS DU RE DANS LES EFFETS DES LDL-OXYDEES SUR LA CELLULE BETA.....	96
C. ETUDE DE L'IMPLICATION D'ICER	99
D. ETUDE DE L'IMPLICATION DU STRESS OXYDATIF	101
E. CONCLUSION	103
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>104</u>
I. LA SIGNALISATION DLK/JNK3 CONTROLE LA MASSE DE CELLULES BETA AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL, DE L'OBESITE ET DE LA GROSSESSE	104
II. REGULATION DE LA SIGNALISATION DLK/JNK3 PAR LE GLP-1	106
III. IMPLICATION DE LA SIGNALISATION DLK/JNK3 DANS LA COMPENSATION ET LE DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES BETA : ROLE DU STRESS OXYDATIF ET DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE (RE).....	107
A. ROLE DU STRESS DU RE DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MASSE DES CELLULES BETA	107
B. ROLE DU STRESS OXYDATIF ET DU RE DANS LA PERTE DE LA MASSE DES CELLULES BETA DANS LE DIABETE.....	108
IV. CONCLUSION.....	110
<u>LISTE DES PUBLICATIONS</u>	<u>111</u>
ABSTRACT	112
RÉSUMÉ	113
ABSTRACT	113
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>114</u>

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je souhaite remercier les membres de mon jury, Mr Bertrand Blondeau et Mr Stéphane Dalle d'avoir accepté d'être rapporteurs pour cette thèse et Mme Sophie Lestavel, Mme Delphine Eberlé et M Jean-Christophe Jonas pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je voudrais également remercier l'ensemble de l'unité de recherche U8199 « Génomique intégrative et modélisation des maladies métaboliques » et son directeur le Professeur Philippe Froguel qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a permis de mener mes travaux de recherche et de participer à de nombreux congrès et événements scientifiques très enrichissants notamment au sein d'EGID.

Je remercie également mon directeur de thèse le Professeur Amar Abderrahmani, pour m'avoir pris en thèse et m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et d'appréhender différentes facettes du monde du diabète et particulièrement de la cellule bêta.

Je souhaiterais particulièrement remercier trois personnes autant sur le plan professionnel que personnel, Raphy, Laure et Gurvan.

Raphy un immense merci pour ta disponibilité de tous les jours, ta rigueur acquise du privé et pour avoir été un bon compagnon de route durant ces trois années.

Laure, tout d'abord merci pour toute l'organisation du labo. Merci pour l'accompagnement techniques et surtout d'avoir répondu présente jusqu'à la toute dernière manip.

Gurvan merci beaucoup de m'avoir suivie dans ces derniers mois de thèse, qui ne sont pas les plus simples, merci pour toutes ces discussions scientifiques sur mon sujet et d'autres, pour avoir fait partager ton expérience d'ancien thésard et merci pour l'aide rédaction de la thèse.

Merci à Valérie Pawlowski qui a débuté l'aventure ratons avec moi ! Merci de m'avoir beaucoup aidée durant ces derniers mois de manips.

Aussi, merci à Hélène, notamment pour l'obtention de ma bourse de thèse, à Valérie Abderrahmani et le reste de l'équipe pour la participation aux différents projets qui m'ont permis de finir ma thèse à temps.

Je remercie également l'équipe de Lausanne du Professeur Romano Regazzi pour leur grande aide technique et scientifique.

Je tiens aussi à remercier Julie et toute l'équipe du 2^{ème}, Charlène, Cyril, Xavier et Jean-Sébastien ainsi que les post-doc et stagiaires qui sont passés dans l'équipe pour leur aide et la très bonne ambiance du laboratoire.

Un immense merci à ma famille, belle-famille et amis. Mes parents toujours présents et motivants durant ces trois années ! Merci pour tout.

Clara, Souad, Rachid et tous les autres qui ont su plus d'une fois me changer les idées et me soutenir.

Pour finir, un merci n'est pas suffisant pour ma sœur Judith et mon compagnon Anthony. Judith, je ne pouvais pas avoir meilleur soutien durant ma thèse, à n'importe quelle heure de la journée, merci de m'avoir soutenue, réconfortée, fait rire, encouragée et surtout déstressée. Anthony merci d'avoir été un soutien au quotidien et d'avoir su être patient et compréhensif durant ces trois années, sans toi, ta bonne humeur et ta positivité, cette thèse n'aurait pas été la même.

RESUME

En modulant en permanence une production d'insuline adaptée au besoin de l'organisme, la cellule bêta pancréatique joue un rôle crucial dans l'homéostasie glucidique. L'adaptation de cette production d'insuline est l'opération d'une machinerie cellulaire responsable de la production de l'insuline hautement adaptative et d'une augmentation de la masse des cellules bêta-pancréatiques. Cette plasticité des cellules bêta est particulièrement critique dans des périodes de modifications de la physiologie de l'organisme, telles que la prise de poids, la grossesse ou le développement du nouveau-né jusqu'au sevrage. Une perte de la fonctionnalité et de la masse des cellules bêta sont à l'origine du diabète, une des causes principales de mortalité dans le monde.

Chez les vertébrés, les sérine-thréonine kinases (STKs) dirigent des voies de signalisation importantes permettant aux cellules de répondre à l'environnement. L'objectif de ma thèse a été d'identifier les voies de signalisation responsables du développement de la masse de cellules bêta à la naissance, au cours de la grossesse et de l'obésité, afin de mieux comprendre le dysfonctionnement et la perte de la masse des cellules bêta induite par l'environnement diabétogène (ex : LDL-oxydées, hyperglycémie, hyperlipidémie,..) du patient diabétique. En étudiant la plasticité des cellules bêta des rats nouveau-nés, nous avons découvert une élévation importante de l'expression de la protéine Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) dans les îlots des rats nouveau-nés de 10 jours lorsqu'ils sont comparés aux îlots des rats adultes. Dans les îlots des rats, l'augmentation de l'expression de DLK coïncide avec une très forte prolifération des cellules bêta et l'activation de la signalisation «cJun-amino terminal Kinase 3» (JNK3), une STK de la famille des «mitogen activated protein kinase» (MAPKs). Comme observé pour DLK, dans les îlots des rats, l'inactivation de JNK3, réduit considérablement le nombre de cellules sécrétrices de l'insuline. Nous avons aussi observé que les MAPKs sont directement impliquées dans la mort des cellules bêta induite par des LDL-oxydées via un mécanisme cellulaire impliquant le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydant. Nos résultats montrent l'importance de la signalisation des MAPKs dans le contrôle de la survie et de la prolifération des cellules bêta et de son implication dans le diabète.

ABSTRACT

Pancreatic beta cell constantly tunes insulin production to meet the body needs. The insulin production adaptation is achieved thanks to highly adaptive beta cell metabolism, signaling, secretory machinery and mass. The beta-cell function and mass plasticity are particularly critical during nutritional, body growth and physiological changes such as obesity, pregnancy and postnatal development of newborn. Functional beta cell demise account for diabetes is one of the leading causes of death worldwide.

In vertebrates, serine-threonine kinases (STKs) drive key signaling pathways for adaptive cells response to the environment. The overall goal of the thesis was to identify the signaling pathways responsible for the development of beta cell mass during postnatal development, pregnancy and obesity. Identification of these signaling pathways may help in understanding the functional beta cell mass demise induced by the diabetogenic environment (e.g oxidized LDL, hyperglycemia, hyperlipidemia, etc.) in diabetic patients. By investigating beta cell mass plasticity in 10 day old neonate rats, we found a significant increase in the expression of Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) protein when compared to islets from adult rats. In islets of pups, the increase of DLK expression coincides with a very high proliferative rate of beta cells and activation of "cJun-amino terminal Kinase 3" (JNK3) signaling, an STK belonging to "mitogen activated protein kinase" (MAPKs) family. As observed for DLK, in islets of rat pups, the genetic disruption of JNK3 drastically reduces the number of beta cells leading to glucose intolerance. Finally, we also observed that MAPKs link oxidized LDL to beta cell death via mechanisms involving endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. Our results show the critical importance of MAPK signaling in controlling beta cell survival and proliferation in response to physiological condition and diabetes.

ABBREVIATIONS

AP-1:	Activator protein-1
ATF4/6:	Activating transcription factor
ATP:	Adénosine Triphosphate
ARX:	Aristaless-related homeobox gene
Ccnd1:	Gène de la cycline D1
Ccnd2:	Gène de la cycline D2
CHOP:	CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
DLK:	Dual Leucine Zipper Kinase
eIF2 α :	Eukariotic translation initiation factor 2A
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
GH:	Growth Hormone
GIP:	Glucose dependant insulintropic peptide
GLP-1:	Glucagon-like peptide-1
Glut2:	Transporteur du glucose
ICER:	Inducible cAMP Early Repressor
Igf:	Insulin Growth Factor
IRE1 α :	Inositol-requiring enzyme 1
IRS:	Insuline receptor stubstrate
JNK:	c-Jun N-terminal kinases

LDL:	Low density lipoprotein
miRNA:	MicroRNA
MAPK:	Mitogen- activated protein kinase
Pax4:	Paired box gene 4
Pdx1:	Pancreatic and duodenal homeobox 1
Ptf1a:	Pancreatic transcription factor 1
PP:	Polypeptide P
ROS:	Reactive Oxygen Species
siRNA:	Small Interfering RNA
STK:	Serine-threonine kinase
PERK:	R(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
RE:	Reticulum endoplasmic
XBP1:	X-box binding protein 1

INTRODUCTION

I. L'HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE

A. Généralités

Le glucose est la principale source d'énergie pour le corps humain. Assimilé par les cellules de l'ensemble des organes, il assure leur bon fonctionnement. Il permet de maintenir le corps actif en participant, entre autres, à la production d'ATP qui est la principale forme d'énergie directement utilisée par les cellules.

Au cours d'une journée, la consommation corporelle en glucose varie selon les besoins énergétiques de base du corps et le niveau d'activité physique. Il existe donc une balance entre apports en glucides lors des repas et consommation du glucose par notre organisme. La concentration en glucose dans le sang, appelée glycémie, est toujours maintenue stable : entre 4 et 6 mmol/L environ, c'est ce que l'on nomme l'homéostasie glucidique.

Notre organisme doit constamment détecter la glycémie et déclencher des mécanismes aboutissant à son réajustement. Il existe en effet, une régulation fine et constante de la glycémie, opérée par différents organes. Une dérégulation de la glycémie peut entraîner le développement de pathologies métaboliques telles que le diabète.

La régulation de la glycémie se fait grâce à des cellules captant le glucose, appelées « glucostats » et *via* une communication faisant intervenir des messages métaboliques, nerveux et endocriniens (Figure 1) [1].

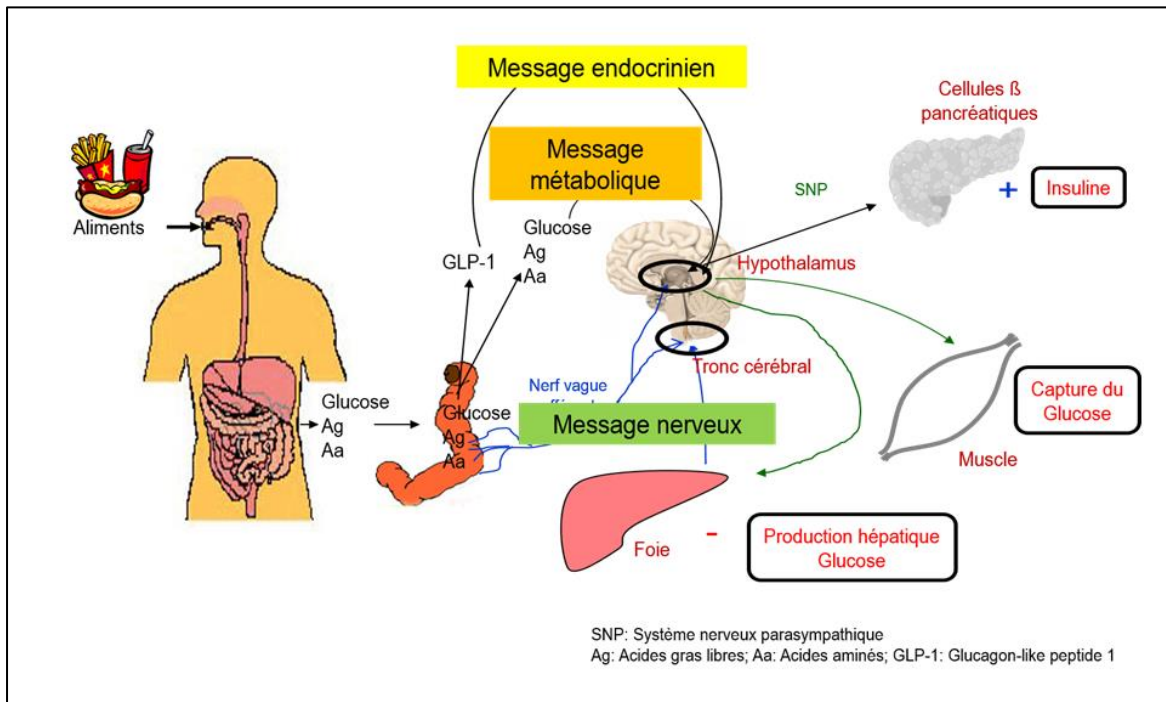


Figure 1 : Les principaux acteurs de la régulation de la glycémie

En période postprandiale, le glucose est assimilé puis stocké par des organes tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux. Inversement, en période de jeûne, l'organisme se tourne vers les réserves de glucose, principalement présentes dans le foie sous forme de glycogène. Lorsque ces réserves de glycogène sont épuisées, le glucose est alors produit par néoglucogénèse à partir de composés non glucidiques. Les différents mécanismes de mise en réserve de glucose sont principalement orchestrés par l'action de l'insuline, seule hormone hypoglycémiante de l'organisme qui est sécrétée par les cellules bêta du pancréas endocrine au niveau de groupes de cellules formant les « îlots de Langerhans ».

Les cellules bêta produisant l'insuline constituent entre 50 et 80 % des cellules totales des îlots de Langerhans. Outre une variation liée à l'espèce, cette masse varie en fonction de changements physiologiques survenant au cours du développement prénatal et postnatal. Durant la vie embryonnaire et jusqu'au sevrage, l'acquisition d'une masse adéquate de cellules bêta et d'une bonne sécrétion d'insuline est indispensable à l'équilibre glucidique à l'âge adulte. Cette masse de cellules bêta peut par la suite être soumise à différents remodelages notamment lors de changements physiologiques, par exemple dans le cas de la grossesse, ou au cours de cas pro-pathologiques, tels que l'obésité et aussi

pathologiques, comme le diabète. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes mis en jeu lors du développement et du maintien de cette masse dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques suscite actuellement de nombreuses recherches. [1], [2]. (Figure 2).

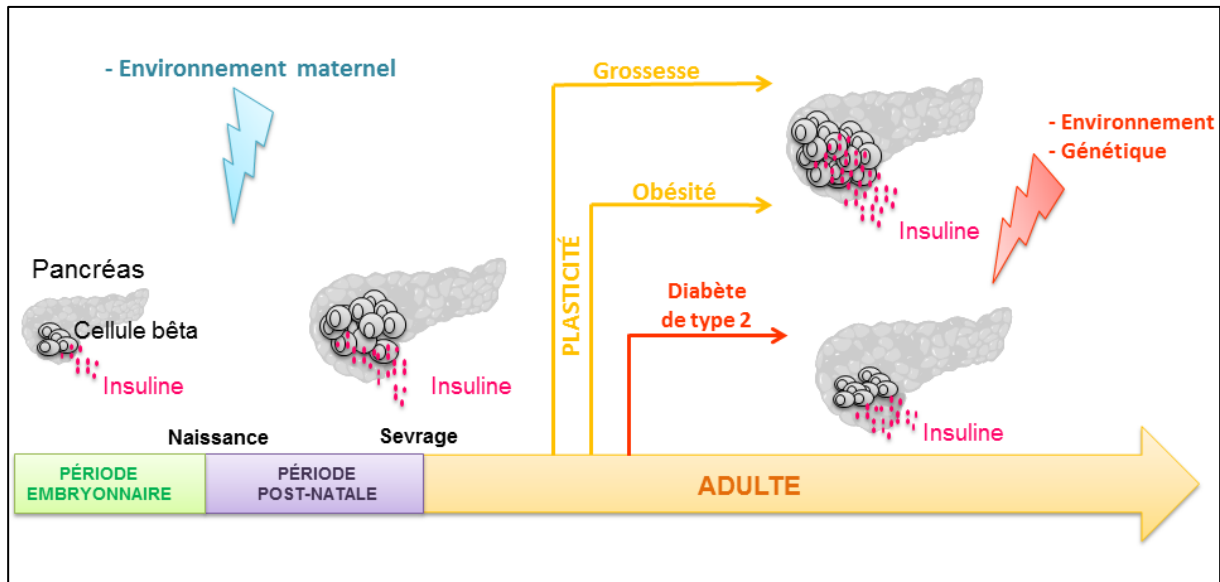


Figure 2 : Développement et plasticité de la masse de cellules bêta pancréatiques

B. La cellule bêta pancréatique

1. Les îlots de Langerhans

Le pancréas est une glande annexe du tube digestif située derrière l'estomac. Il se divise en 4 parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue allant du duodénum à la rate. Le pancréas est composé de deux principaux tissus, le tissu dit exocrine et le tissu dit endocrine, ce qui en fait une glande amphicrine.

Le pancréas exocrine représente plus de 98% de la masse totale du pancréas et est constitué de cellules sécrétant des enzymes déversées dans le duodénum et participant à la digestion comme l'amylase, la lipase et le trypsinogène.

Le pancréas endocrine représente 1 à 2 % de la masse totale du pancréas. Il se présente sous forme d'amas de cellules regroupées, constituant une unité fonctionnelle appelée « îlot de Langerhans ». Ces amas de cellules sécrètent des hormones dites pancréatiques essentielles pour le maintien de l'homéostasie

glucidique. Ces îlots de Langerhans sont constitués de différents types cellulaires. Parmi ces cellules, on retrouve principalement les cellules bêta qui sécrètent de l'insuline, seule hormone hypoglycémisante du corps et les cellules alpha qui sécrètent du glucagon, hormone hyperglycémisante. Les îlots de Langerhans contiennent également des cellules PP, delta et epsilon sécrétant respectivement le polypeptide pancréatique (PP), la somatostatine et la ghréline. Des nerfs sympathiques ainsi que parasympathiques et une forte vascularisation permettent le contrôle neuro-hormonal des différents groupes cellulaires constituant les îlots de Langerhans.

La structuration de l'îlot de Langerhans en termes de pourcentages des différents types cellulaires qui le compose et d'organisation de ses types cellulaires à l'intérieur de l'îlot est très variable selon l'espèce étudiée. Chez l'humain, il a été montré que la masse de cellules bêta représente environ 50 % de la masse totale de l'îlot quand la masse de cellules alpha représente elle environ 30%. Chez l'humain, la répartition des différents types cellulaires au sein de l'îlot de Langerhans est assez variable. Chez les rongeurs, les cellules bêta, représentant environ 80% de l'îlot, sont principalement situées au centre de l'îlot et les cellules alpha, représentant environ 7% de l'îlot, sont quant à elles situées principalement en périphérie. (Figure 3). [3], [4].

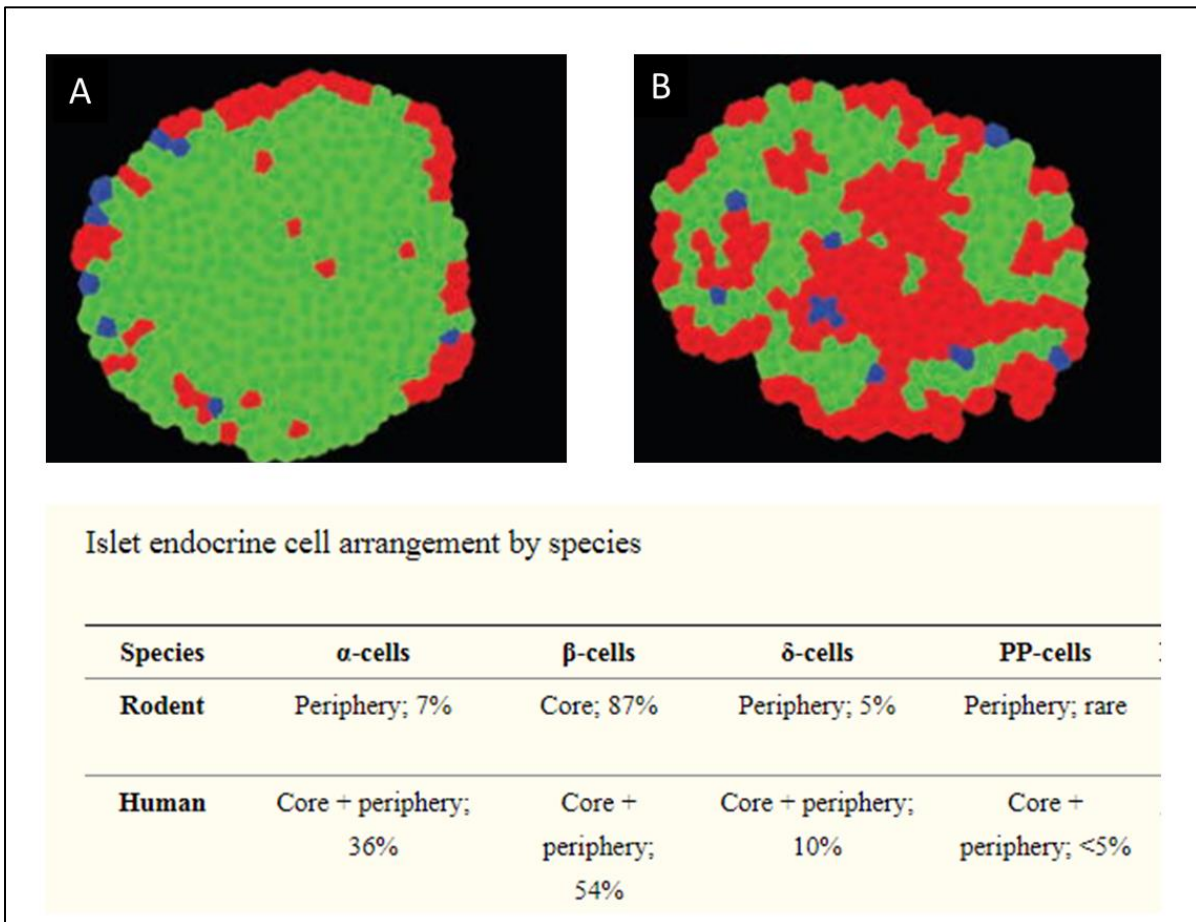


Figure 3 : Architecture des îlots de Langerhans chez le rongeur (A) et l'homme (B). Cellules bêta (vert) / alpha (rouge) / delta (bleu). [3]

Chaque hormone sécrétée par le pancréas endocrine a un rôle précis à jouer dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Le glucagon augmente la glycémie tandis que l'insuline la diminue. La somatostatine a, elle, un rôle paracrine de régulation de la sécrétion du glucagon et de l'insuline.

Le PP est sécrété en période post-prandiale [5]. Il n'a pas de rôle actuellement bien défini dans la régulation de la glycémie, il a été montré comme étant impliqué dans la régulation de la sécrétion pancréatique endocrine et exocrine [5]. Le rôle de la somatostatine n'est pas clair, il a été montré qu'elle avait un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline, de glucagon, du PP et d'elle-même [6]. Chez des souris déficientes pour la somatostatine, la sécrétion d'insuline et de glucagon en réponse à différents stimuli est augmentée [7]. La sécrétion de la ghréline et du glucagon est stimulée par une hypoglycémie [8], [9]. En revanche, leur sécrétion est inhibée par une hyperglycémie et par l'insuline. La sécrétion du glucagon est inhibée par une

forte concentration en glucose mais aussi par l'insuline, le GABA et la somatostatine ainsi que par d'autres nutriments [9]. Inversement une faible concentration de glucose augmente la sécrétion du glucagon [9].

2. Production et sécrétion de l'insuline

La cellule bêta pancréatique détecte le taux de glucose dans le sang et a pour fonction principale la sécrétion de l'insuline.

C'est au XX^{ème} siècle qu'a été mise en évidence l'existence d'une substance sécrétée par le pancréas et impliquée dans la régulation de la glycémie. Puis, c'est en 1921 que les canadiens Banting et Best ont réussi à isoler l'insuline qui sera par la suite utilisée chez l'homme en tant que traitement dans la pathologie du diabète de type 1 [10].

La régulation de la production d'insuline et de sa sécrétion est ajustée à toute heure de la journée *via* des interactions métaboliques et des signalisations très précises. L'insuline est sécrétée en réponse à différents stimuli dont le principal est le glucose. Mais des hormones telles que le GLP-1, la prolactine, la GH, la leptine ou encore des acides aminés, des acides gras, ainsi que le système nerveux parasympathique peuvent aussi moduler et induire son expression et sa sécrétion [11].

Chez l'humain, le gène codant l'insuline se situe au niveau du chromosome 11. Chez les rongeurs, deux gènes codent l'insuline, les gènes *Ins1* et *Ins2*, se situant respectivement sur les chromosomes 19 et 7 chez la souris et sur le chromosome 1 chez le rat. La transcription du gène de l'insuline donne naissance à la pré-pro-insuline, qui, suite à l'action d'enzymes, se transforme en pro-insuline. Au cours de sa maturation dans les granules cytoplasmiques et sous l'action d'endopéptidases la pro-insuline produit l'insuline et le peptide C (Figure 4). Ces derniers seront ensuite libérés de la cellule bêta par exocytose (Figure 4).

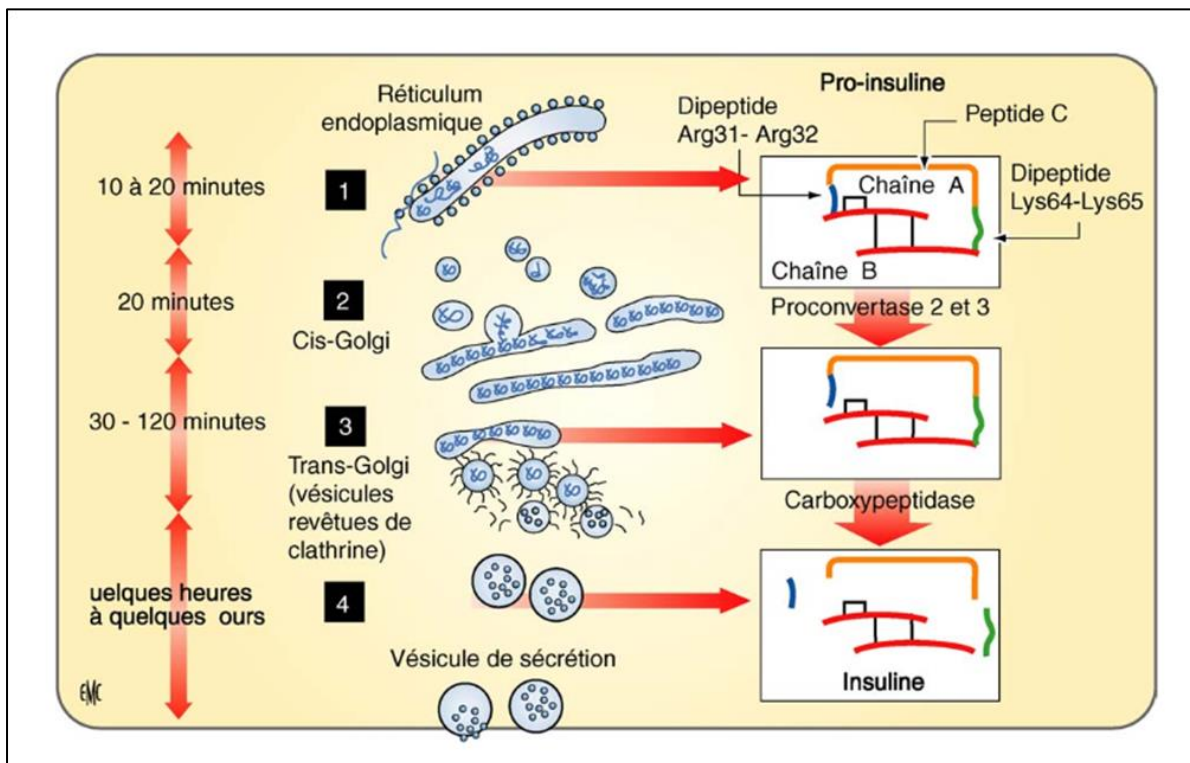


Figure 4 : Schéma résumant les étapes clés de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline. [12]

Le mécanisme déclencheur de l'expression et de la sécrétion d'insuline est l'entrée du glucose dans la cellule bêta via les transporteurs GLUT-1 pour l'homme et GLUT-2 pour les rongeurs. Le glucose est phosphorylé dans la cellule en glucose-6-phosphate, premier métabolite formé permettant l'entrée dans la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire oxydative, permettant la production d'énergie sous forme d'ATP. Suite à cela, l'ATP induit la fermeture des canaux potassiques menant à une dépolarisation de la membrane plasmique ainsi qu'à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. Cela entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire qui déclenche finalement l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline [11] (Figure 5). La sécrétion de l'insuline en réponse au glucose est aussi provoquée par un mécanisme indépendant des canaux potassium dépendants de l'ATP, possiblement impliquant le NADP(H), le GTP, des radicaux libres, le malonylcoA, le long-chain acyl-COA et le glutamate [13], [14].

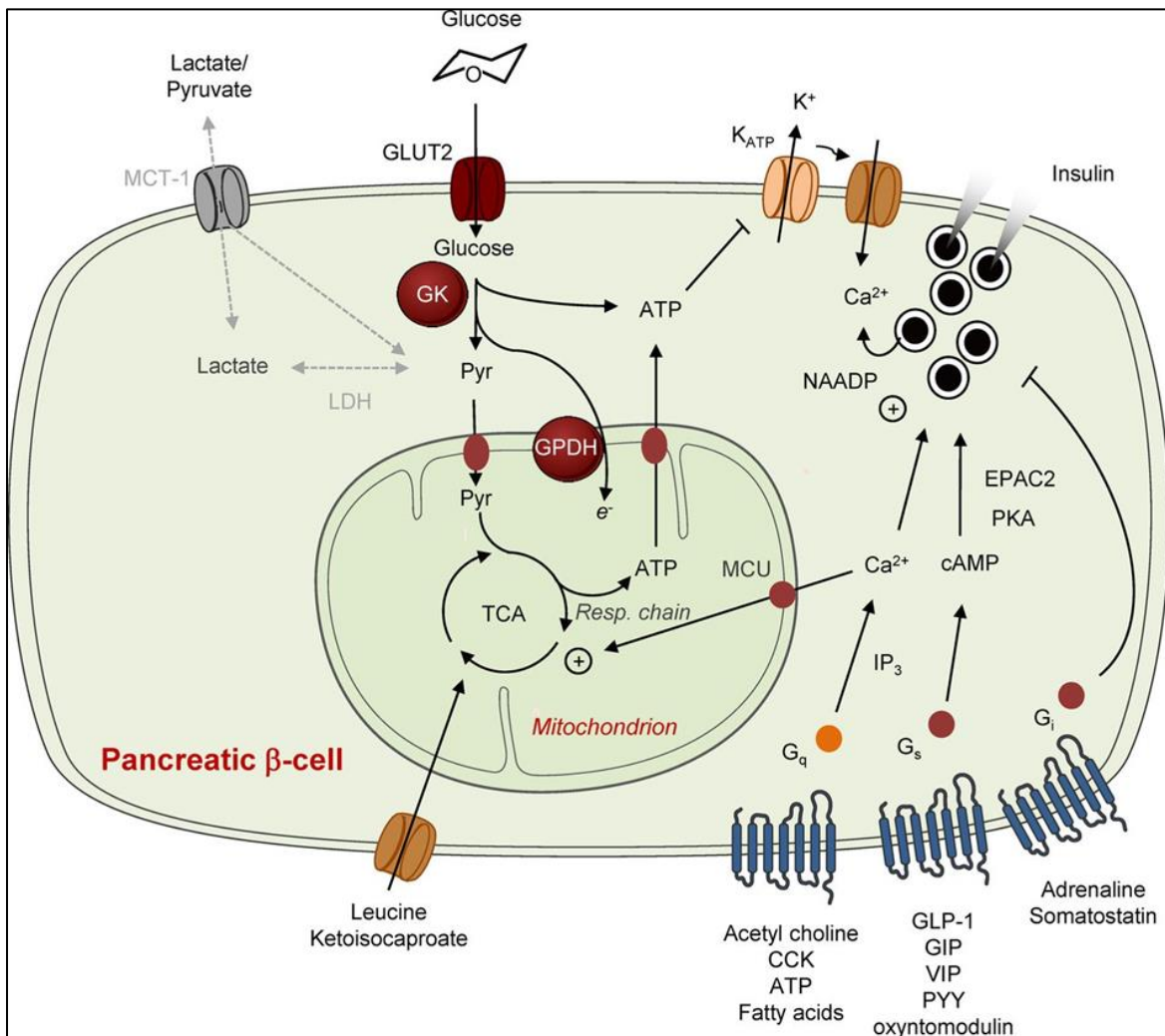


Figure 5 : Mécanismes impliqués dans la détection de la glycémie par les cellules bêta pancréatiques et la réponse à différents sécrétagogues. [11]

Une fois sécrétée, l'insuline agit principalement sur le foie, les muscles et le tissu adipeux via son récepteur où de façon générale elle favorise la captation et le stockage du glucose sous forme de glycogène et de lipides. Dans les cellules hépatiques et musculaires, l'insuline stimule la glycogénèse et le stockage du glucose sous forme de glycogène. Dans ces mêmes cellules, elle inhibe aussi la glycogénolyse, c'est-à-dire la formation de glucose à partir du glycogène. D'autre part, elle limite la gluconéogenèse dans le foie et le rein qui est à l'origine de la formation du glucose à partir de lipides et des acides aminés. Au niveau du tissu adipeux, elle inhibe la lipolyse limitant ainsi la libération d'acides gras et de glycérol. De même, concernant les protéines, l'insuline augmente l'assimilation des acides aminés par les hépatocytes et les cellules musculaires, elle stimule la synthèse protéique et inhibe la protéolyse. [15].

C. Développement de la masse fonctionnelle des cellules bêta pancréatiques

1. Embryogenèse et développement du pancréas endocrine

Les étapes de l'embryogénèse du pancréas ont principalement été mises en évidence par des études effectuées chez les rongeurs du fait de la difficulté d'étudier ces mécanismes chez l'homme. Les différentes étapes décrites ci-dessous sont principalement celles retrouvées chez les rongeurs.

L'initiation du développement du pancréas se fait sous l'influence de la notochorde. Chez les rongeurs, à 8.5 jours embryonnaires (E8.5) se forme l'ébauche du pancréas, mise en évidence par l'expression du facteur de transcription Ptf1a, très rapidement suivi par l'expression du facteur Pdx1 [16]. Chez l'humain, l'expression de Pdx1 est détectée à E.30 [17].

Ce mécanisme s'effectue *via* deux ébauches embryonnaires bourgeonnant de l'endoderme situé au niveau de la boucle duodénale. Un bourgeon prolifère depuis le versant dorsal du duodénum. Il est nommé bourgeon pancréatique dorsal et se développe à proximité de la rate. Un autre bourgeon prolifère depuis le conduit cholédoque sous l'ébauche hépatique, il est appelé bourgeon pancréatique ventral. Chez les rongeurs à E14.5 l'estomac exerce une rotation de 90 degrés, le pancréas ventral migre alors autour du duodénum se reliant ainsi au pancréas dorsal. Le conduit d'évacuation du pancréas dorsal fusionne avec celui du ventral pour former le conduit pancréatique principal, aussi appelé canal de Wirsung. Ce dernier s'unit au conduit cholédoque et s'abouche dans la papille duodénale majeure. Il arrive que le canal du pancréas dorsal persiste, on l'appelle alors canal de Santorini. Ainsi la queue et le corps correspondent au pancréas dorsal, l'uncinatus et la tête au pancréas ventral. [16], [17].

Les facteurs orchestrant ce développement embryonnaire sont des facteurs tels que: Activin, Notch, FGF, BMP, RA, Wnt et β -cathénine. Les signalisations du développement embryonnaire induisent l'expression de marqueurs pancréatiques.

Le pancréas endocrine commence son développement à partir de cellules progénitrices multipotentes dès E8.5 chez les rongeurs et à 7 semaines de gestation chez l'homme. Ces dernières sont à l'origine des cellules acinaires et endocrines. Le nombre de progéniteurs pancréatiques est important, permettant d'acquérir une masse de cellules bêta suffisante pour répondre aux besoins en insuline de l'organisme au cours de la vie [18].

Les études sur des lignées murines transgéniques surexprimant les facteurs Notch et neurogenine 3 (*ngn3*) montrent que ces derniers sont indispensables à l'induction de la différenciation en cellule acinaire ou endocrine [19]. La signalisation induite par Notch est responsable de la lignée de cellules acinaires tandis que les cellules n'induisant pas cette voie de signalisation se différencieront en cellules endocrines [19] (Figure 6). Par la suite, les précurseurs endocriniens se différencient en cellules spécialisées, ces différentes cellules sécrétant une hormone qui leur est spécifique. C'est au stade E14.5 chez le rat que chaque type cellulaire constituant le pancréas endocrine est finalement défini via l'expression de gènes cibles de la neurogenine 3, les principaux étant : *Pax4* pour les cellules bêta et delta et *Arx* pour les cellules alpha et PP, *Pax4* et *Arx* ayant des rôles antagonistes [20]–[22]. La différenciation des cellules epsilon se fait aussi à partir des cellules exprimant la neurogenine 3 mais elle est indépendante des facteurs *Arx* et *Pax4*. Puis l'expression d'autres facteurs tels que, *mafA*, *Sox9*, *Hnf1 β* , *Gata4/6*, *Hnf6*, *Nkx2.2*, *nkx6.1* et *isl1* permettent la différenciation complète en cellules endocrines spécialisées. De nombreux modèles « knock-out » pour ces différents gènes ont permis de mettre en évidence leurs rôles précis dans le bon lignage cellulaire du pancréas endocrine. [23]. (Figure 6).

Il est important de noter que les étapes de différenciation sont régulées par l'expression temporelle de certains facteurs de transcription. Pour exemple, la voie Notch est réactivée transitoirement dans la lignée endocrine et l'expression précoce du facteur *ngn3* donne des cellules alpha alors que son expression tardive donne naissance à des cellules bêta [24].

Une fois formé, le pool de cellules bêta va s'étendre et acquérir ses fonctions. Chez les rongeurs cette expansion commence vers le 14^{ème} jour embryonnaire. [25]

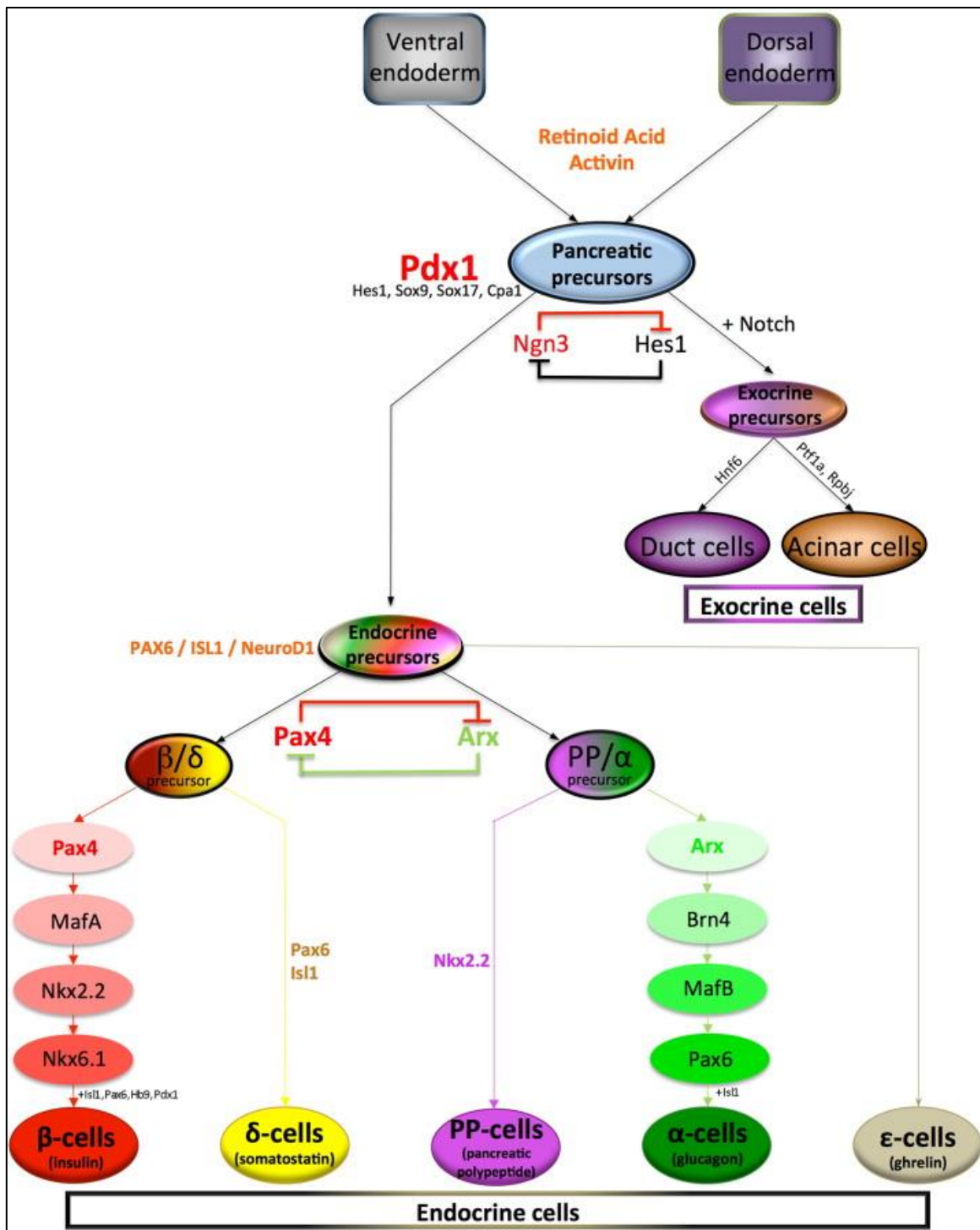


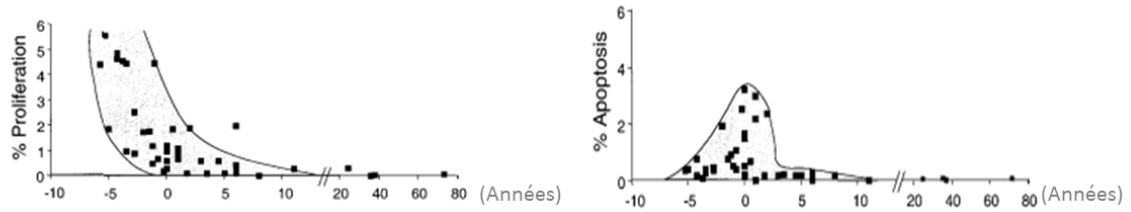
Figure 6 : Facteurs de transcription régulant le bon lignage des lignées encodriques. [26]

2. Développement postnatal de la masse de cellules bêta pancréatiques

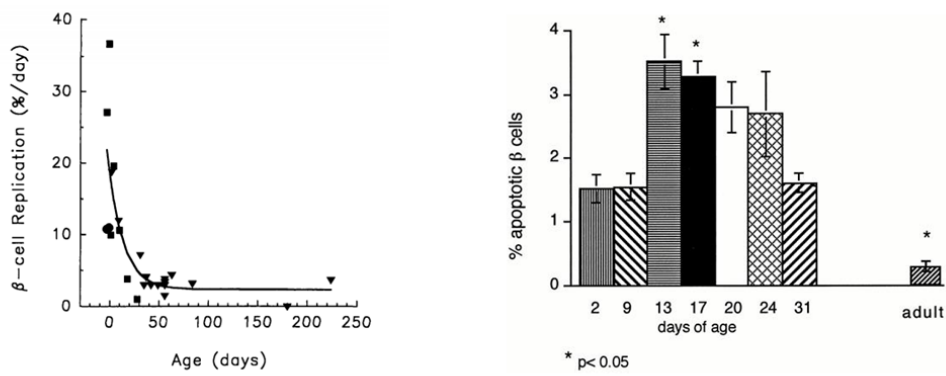
Le développement de la masse de cellules bêta a principalement été mis en évidence chez des modèles murins. Néanmoins, bien que difficile à étudier chez l'homme, deux grandes équipes, Meier et Gregg, ont pu mettre en évidence l'existence de certains mécanismes à l'aide de nécropsie [27], [28].

La plus grande partie du développement et du remodelage de la masse de cellules bêta s'effectue au cours de la gestation et plus particulièrement dans les derniers jours prénataux à la fois chez le rongeur et chez l'homme. Chez le rongeur la masse de cellules bêta continue à se développer jusqu'à un mois après la naissance [29], [30]. Ce phénomène est également retrouvé chez l'homme avec un pic de prolifération observé dans les premiers mois qui suivent la naissance et un développement jusqu'à l'âge de 5 ans environ [27]. (Figure 6).

Prolifération et apoptose des cellules bêta pancréatiques chez l'humain



Prolifération et apoptose des cellules bêta pancréatiques chez le rat



Figures 7 : Processus de prolifération et d'apoptose de la cellule bêta pancréatique au cours de la vie chez l'humain et le rat. [25], [31], [32]

Ce développement permet d'acquérir une masse de cellules bêta appropriée à l'âge adulte. Il a été montré que des rats avec une masse bêta pancréatique supérieure à la moyenne sont plus résistants au stress induit par la streptozotocine, drogue naturelle toxique pour les cellules bêta [33]. Inversement une malformation de cette masse, entraînant une insuffisance de cellules bêta, augmente la probabilité de développement d'un diabète à l'âge adulte [34], [35].

La masse de cellules bêta pancréatiques se forme et se développe *via* différents processus : la néogenèse, la prolifération et l'apoptose. Ces mécanismes sont plus ou moins importants et interviennent à différents moments du développement.

Avant la naissance, lors du développement embryonnaire, le pool de cellules bêta se forme principalement par néogenèse. Comme il a été précédemment expliqué, l'apparition de cet amas de cellules bêta provient essentiellement de la différenciation de cellules progénitrices pancréatiques exprimant la neurogenine 3 et provenant du canal pancréatique [36].

Après la naissance, le pool de cellules bêta s'étend pour former une véritable masse fonctionnelle. Chez les rongeurs, le mécanisme de prolifération a largement été montré comme étant responsable de cette expansion [37], [38]. Plusieurs études ont quantifié la prolifération des cellules bêta tout au long de la vie et ont montré une augmentation avec un pic de la prolifération durant le développement embryonnaire. Ce phénomène persiste après la naissance avec un niveau de prolifération plus faible et une diminution progressive avec l'âge [37]. Les taux de prolifération postnataux des cellules bêta observés chez les modèles murins, rats et souris, sont aux alentours de 7% [37]. Chez le rat, un pic de prolifération est observé à 10 jours après la naissance [38]. Des études ont été effectuées chez l'humain sur des biopsies de sujets entre 2 mois et deux ans, période où le taux de prolifération est le plus élevé, elles ont montré un pourcentage plus faible de prolifération chez l'humain en comparaison avec les modèles murins, environ 2.5% [28]. (Figure 7).

Outre la néogenèse et la prolifération, l'apoptose intervient également dans la formation d'une masse bêta pancréatique fonctionnelle en période postnatale. Après la naissance une étude a montré chez le rat une augmentation du phénomène

d'apoptose des cellules bêta dans les îlots à 13 et 17 jours en comparaison avec le taux d'apoptose à 2, 9 et 20 jours [25]. Une étude chez l'humain montre le même pic d'apoptose aux alentours de la naissance [31]. Ces résultats suggèrent que l'apoptose participe à la mise en place de la masse de cellules bêta fonctionnelles. (Figure 7).

Concernant la régulation de la prolifération de la cellule bêta pancréatique, l'alimentation de la mère est cruciale pour un bon développement du pancréas endocrine [39]. En effet, de nombreuses études corrélient le régime alimentaire de la mère à la masse et à la fonctionnalité des cellules bêta pancréatiques du nouveau-né. Par exemple, des enfants nés d'une mère en sous-nutrition ont été montrés comme étant moins tolérants au glucose [40].

Un régime faible en protéine de la mère durant la gestation diminue de 50% le taux de prolifération de la cellule bêta chez le nouveau-né, ce régime induit en effet des changements dans le protéome des cellules bêta du nouveau-né notamment l'expression de protéines du cycle cellulaire [41]. De même, une étude de la masse de cellules bêta de rats nés d'une mère mal nourrie montre une réduction de 66% en comparaison avec des rats nés d'une mère normalement nourrie [42]. Il a été montré que chez la mère, un régime pauvre en protéines, en calories ou à l'inverse riche en lipides et en calories ainsi qu'un problème de flux sanguin utérin peuvent être responsables d'un défaut de prolifération des cellules bêta mais aussi d'une augmentation du taux d'apoptose dans ces mêmes cellules [43]–[46]. Cependant, le lien entre une mère en surnutrition ou obèse et le développement et la fonctionnalité de la masse de cellule bêta chez le nouveau-né n'a pas été établi.

Le facteur de croissance IGF-1 est un des facteurs impliqués dans le développement de la masse de cellules bêta durant la période postnatale [47]. Une étude montre que le récepteur d'IGF-1 se lie à IRS-2 et induit l'activation de signalisations impliquées notamment dans la prolifération des cellules [48]. D'autres facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation de la prolifération, comme le facteur PDGF [49].

Par ailleurs les hormones incrétines, le GLP-1 et le GIP, produites respectivement par les cellules L et K de l'intestin, sont impliquées dans la

néogenèse et la prolifération de la cellule bêta. Le GLP-1 peut-aussi être sécrété par les cellules alpha du pancréas endocrine. Une étude montre que l'administration de l'exendine 4, un agoniste du récepteur au GLP-1, à des rats nouveau-nés rendus diabétiques avec la streptozotocine permet d'augmenter la néogenèse, à partir des cellules du canal pancréatique et la prolifération des cellules bêta pancréatiques et améliore la tolérance au glucose de ces souris. [50], [51]

De plus, des études récentes évoquent le rôle des miRNA dans la maturation postnatale de la masse de cellules bêta. C'est le cas de l'équipe du Pr Romano Regazzi qui démontre l'implication de plusieurs miRNA dans des mécanismes de prolifération des cellules bêta immatures. [38], [52]

3. Rôle des acteurs du cycle cellulaire dans l'expansion de la masse des cellules bêta pancréatiques

Les acteurs du cycle cellulaire sont indispensables à la prolifération des cellules bêta pancréatiques en période postnatale, comme la cycline D1 (Ccnd1) et la cycline D2 (Ccnd2) qui sont connues pour induire des stimuli mitogéniques dans la cellule bêta [53]. De nombreux modèles de souris « knock-out » pour des acteurs du cycles cellulaires ont permis d'attribuer aux protéines CDK4, p18 et p16 entres autres un rôle essentiel dans la prolifération et le développement des cellules bêta pancréatiques [54], [55].

Les facteurs régulant la prolifération avant et après la naissance sont différents [56]. En effet, des modèles d'animaux « knock-out » pour les acteurs du cycle cellulaire peuvent ne présenter aucun défaut de développement embryonnaire mais avoir une masse de cellules bêta mal développée et présenter des problèmes d'obésité et de diabète à l'âge adulte. C'est le cas par exemple de la protéine FOXM1 et de la famille des CDK (Cyclin-Dependent Kinase). [57], [58]

Ces protéines du cycle cellulaire peuvent être activées par différents facteurs comme les analogues du récepteur au GLP-1 tels que l'exendine 4. Il a été montré que cette dernière régule la prolifération des cellules bêta via la modulation de la cycline D2 dans des modèles murins [59]. La régulation des acteurs du cycle

cellulaire par l'exendine 4 a aussi été montrée dans des îlots humains [60]. Par ailleurs, une étude montre que le facteur de transcription Nkx6.1 est impliqué dans la prolifération de la cellule bêta durant le développement postnatal [61]. Ce facteur ne se lie pas aux promoteurs des cyclines mais les souris invalidées pour ce facteur ont une expression réduite du GLP1-R ainsi que de Glut-2. Ces derniers sont des facteurs importants durant le développement. Les souris invalidées pour le gène *Glut-2* montrent en effet une diminution de la prolifération des cellules bêta durant la période postnatale [62].

De même, il a été montré que l'expression périnatale de la survivin, une protéine anti-apoptotique qui régule des acteurs du cycle cellulaire, est nécessaire à l'acquisition d'une masse de cellules bêta adéquate [63].

4. Acquisition d'une masse de cellule bêta fonctionnelle : la gluco-compétence

Au cours du développement postnatal la capacité à sécréter de l'insuline en réponse au glucose des cellules bêta immatures humaines ou murines est très faible, alors que ces cellules sécrètent de l'insuline en réponse aux acides aminés et aux acides gras [64]–[66]. L'une des caractéristiques de cette cellule bêta immature est d'ailleurs la faible expression des enzymes de la glycolyse alors qu'elles expriment des enzymes impliquées dans la glycolyse anaérobie [67].

La gluco-compétence, c'est-à-dire la capacité des cellules à répondre au glucose et à déclencher la sécrétion d'insuline, ne se développe complètement qu'en période postnatale. Chez la souris, ce processus se met en place pendant la période de sevrage aux alentours de 21 jours [38]. A ce moment précis, les cellules bêta subissent tout un processus de maturation, le profil d'expression des gènes varie fortement entre des cellules bêta en période postnatale et des cellules bêta adultes post-sevrage [38], [67]. De plus, différentes études montrent que la transition d'une alimentation en lait riche en matière grasse à une alimentation en nourriture riche en glucides est essentielle pour l'induction de la sécrétion d'insuline par le glucose. En effet, il a été montré que le sevrage est nécessaire à différentes étapes de la maturation de la masse de cellules bêta fonctionnelles, il permet entre autre l'acquisition de la gluco-compétence des cellules bêta [38], [68].

D. Expansion de la masse des cellules bêta pancréatiques dans la grossesse et l'obésité

Au cours de la vie adulte, la masse de cellules bêta est maintenue relativement stable. Il arrive cependant que cette masse varie à la suite de modifications physiologiques et physiopathologiques telles que la grossesse et l'obésité. Ces processus mettent en évidence la plasticité de la cellule bêta et sa capacité à s'adapter à son environnement.

Au cours de la grossesse, il est observé une augmentation de la masse de cellules bêta pancréatiques chez la mère en réponse à une insulino-résistance physiologique qui se met en place durant la grossesse ainsi qu'en réponse à différentes hormones telles que la prolactine, le lactogène, la progestérone, l'oestradiol ou encore des hormones de croissance [69]. Chez l'humain cette masse est multipliée par environ 1,4 [70]. Cette augmentation est plus élevée chez les rongeurs avec un facteur de 4 à 5 [71]. Ce modèle d'adaptation de l'îlot de Langerhans a d'ailleurs principalement été étudié chez le rongeur. Chez le rat, la masse du pancréas et la masse de cellules bêta ont été définies à différents jours de gestation. Il a été observé un pic de ces deux masses à 14 jours de gestation puis un retour à une masse normale. Cette augmentation est corrélée avec une augmentation de la vascularisation des îlots. Des hormones telles que la prolactine et la sérotonine participent à cette adaptation de l'îlot de Langerhans et au maintien de l'homéostasie glucidique durant la grossesse en influençant le développement de la masse de cellules bêta de la mère. [71]–[74]

Plusieurs mécanismes responsables de l'augmentation de la masse de cellules bêta pancréatiques durant la compensation ont été identifiés chez le rongeur. Au cours de la gestation et de la prise de poids suite à un régime riche en graisse, la masse augmente principalement par stimulation de la prolifération des cellules bêta et de la néogenèse à partir de cellules progénitrices [75], [76]. Chez l'homme, la prolifération des cellules bêta pancréatiques a été observée [77], [78], cependant, ce mécanisme reste marginal, notamment au cours de la grossesse [79]. En effet, des études rapportent plutôt une stimulation de la néogenèse à partir de cellules progénitrices du canal pancréatique, comme relevée par la présence d'îlots de

petites tailles ainsi que la présence de cellules positives à l'insuline dans le canal, dans l'étude de Butler et al publiée dans Diabetologia [79].

La plasticité de la cellule bêta dans le cadre de l'obésité et de la résistance à l'insuline est discutée dans le paragraphe I-C-2.

Il est intéressant de noter que lors de ces processus de remodelage de la masse de cellules bêta, outre une augmentation du nombre de cellules bêta, on observe aussi une augmentation de la taille de ces cellules. En effet, diverses études montrent une hypertrophie des cellules bêta pancréatiques [45], [80], [81].

II. PLASTICITE DE LA MASSE FONCTIONNELLE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES DANS LE DIABETE

A. Diabète : Définition

Le diabète est défini par un taux de glucose mesuré à jeun, égal ou supérieur à 126 mg/dl. Ce dérèglement de la glycémie est à l'origine de nombreuses complications telles que des complications microvasculaires, macrovasculaires, rétinopathies, néphropathies ou encore des cardiopathies et des neuropathies.

Dans le monde, en trente ans, le nombre de personnes atteintes d'un diabète a été multiplié par quatre, soit 422 millions de personnes en 2014, dernier chiffre recensé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En 2015, le nombre de décès dû au diabète est de 1.6 millions et le diabète deviendrait, selon l'OMS, la septième cause de décès en 2030.

Le diabète présente une composante génétique et une environnementale. L'étiologie de la maladie est aussi variable, ce qui fait que plusieurs types de diabète se distinguent : le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète gestationnel et les autres formes de diabètes tels que les diabètes monogéniques comme le MODY (maturity onset diabetes of the young) [82]. La majorité des diabètes correspond au diabète de type 2, dont la présentation fait l'objet du paragraphe B.

1. Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 représente environ 10 % des diabètes totaux. Il provient d'une insulino-pénie absolue émanant d'une massive perte de cellules bêta pancréatiques due à une réaction auto-immune. Des auto-anticorps reconnaissent des antigènes de la cellule bêta et provoquent à terme leur destruction. Les origines de ce diabète peuvent-être environnementales, infectieuses, causées par un virus, ou génétique [83], [84]. Parmi les causes génétiques, les polymorphismes nucléotidiques (SNP) les plus connus comme étant associés au diabète de type 1, on

retrouve ceux localisés dans les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, mais de nombreuses études génétique montrent l'implication d'autres gènes [85], [86].

2. Les autres formes de diabète

Outre les diabètes se développant en parallèle de pathologies ou à la suite de la prise de certains médicaments, cette catégorie regroupe principalement le diabète MODY et le diabète LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults).

Le diabète MODY est un diabète monogénique représentant 1 à 5 % des diabètes. L'étude génétique de familles a permis d'identifier de nombreux gènes associés à ce diabète. Parmi ces gènes, des mutations dans les gènes de la glucokinase, du facteur HNF4 α ou encore PDX-1 ont été identifiés comme étant impliqués dans la survenue de différents types de diabète MODY [87]. La plupart sont des gènes clés impliqués dans le maintien et la fonction de la cellule bêta (Tableau 1).

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) gene functions and pathophysiology and possible treatment.			
MODY gene	Gene function	Pathophysiology	Treatment
HNF4 α	Transcription factor (nuclear factor)	β -Cell dysfunction, neonatal hyperinsulinemia	Sulfonylureas
GCK	Hexokinase (catalyze the initial step in the glycolytic pathway)	β -Cell dysfunction, fasting hyperglycemia from newborn	Diet
HNF1 α	Transcription factor (homeodomain), regulating insulin gene transcription	β -Cell dysfunction, glycosuria	Sensitive to sulfonylureas
PDX1/IPF	Transcription factor (homeodomain)	β -Cell dysfunction and pancreatic agenesis	Diet or AD insulin
HNF-1 β	Transcription factor (homeodomain)	β -Cell dysfunction and renal anomalies, genital anomalies. Pancreatic hypoplasia	Insulin
NEUROD1	Transcription factor (BHLH)	β -Cell dysfunction, adult onset diabetes	OAD or insulin
KLF11	TGF- β	β -Cell dysfunction, similar to type 2 diabetes mellitus	OAD or insulin
CEL	Controls exocrine and endocrine functions of pancreas, pathogenesis of pancreatic malabsorption and diabetes mellitus	Pancreas exocrine, endocrine dysfunction and pancreas	Insulin or OAD or diet
PAXA4	Transcription factor, play role during cancer growth and fetal development	β -Cell dysfunction, possible ketoacidosis	Insulin or OAD or diet
INS	Regulate beta cells of activity Langerhans cells	Insulin gene mutation, PNDM	Diet or OAD, insulin
BLK	B-cell specific, tyrosine kinase functions in signal transduction	Insulin secretion defect, overweight	Insulin or diet (OAD)
ABCC8	Regulate insulin secretion by linking cellular metabolism to electrical activity of plasma membrane	ATP-sensitive potassium channel dysfunction, PND TND	OAD (insulin)
KCNJ11	Regulate glucose-induced insulin secretion in pancreatic cells	Homozygote: neonatal diabetes	Insulin OAD or diet
APPL1	Involved in signal transduction	Dysmorphic phenotypes, development delay	Diet or OAD, insulin

Tableau 1 : Liste des gènes associés à un type de MODY. [87]

Le diabète LADA est un diabète auto-immun qui survient à l'âge adulte. Ce diabète présente de fortes similitudes avec le diabète de type 1. En effet, de nombreux gènes à l'origine d'un diabète de type 1 sont aussi responsables d'un diabète LADA [88].

3. Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est diagnostiqué lors d'une grossesse par une glycémie supérieure à la normale, les femmes développant ce type de diabète ont un risque beaucoup plus élevé de développer un diabète de type 2 par la suite [89]. Par ailleurs, un diabète gestationnel augmente la possibilité de complications au cours de la grossesse ainsi que de prématurité. De plus, l'enfant a plus de risque de développer un diabète de type 2 [90]. En général, le diabète gestationnel survient lorsque l'insulino-résistance développée durant la grossesse n'est pas accompagnée par une compensation de la cellule bêta (vu en I.D) dû à une défaillance dans les mécanismes de néogenèse et de prolifération de ces cellules [91]–[93]. Les causes du diabète gestationnel peuvent être environnementales, liées à une malnutrition, au surpoids et à des changements du microbiote intestinal et à des facteurs génétiques [94], [95]. Il est intéressant de noter que les SNP associés au diabète gestationnel sont souvent les mêmes que ceux associés au diabète de type 2 [96], [97].

B. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est prévalent (supérieur à 90 % de toutes les formes de diabète). Il provient de la conjonction de nombreux facteurs tels que la sédentarité, le vieillissement, le surpoids et l'obésité qui est le premier facteur de risque de son développement [98]. En effet, l'incidence du diabète de type 2 augmente avec l'indice de masse corporelle et la maladie se développe en parallèle de l'obésité (figure 8).

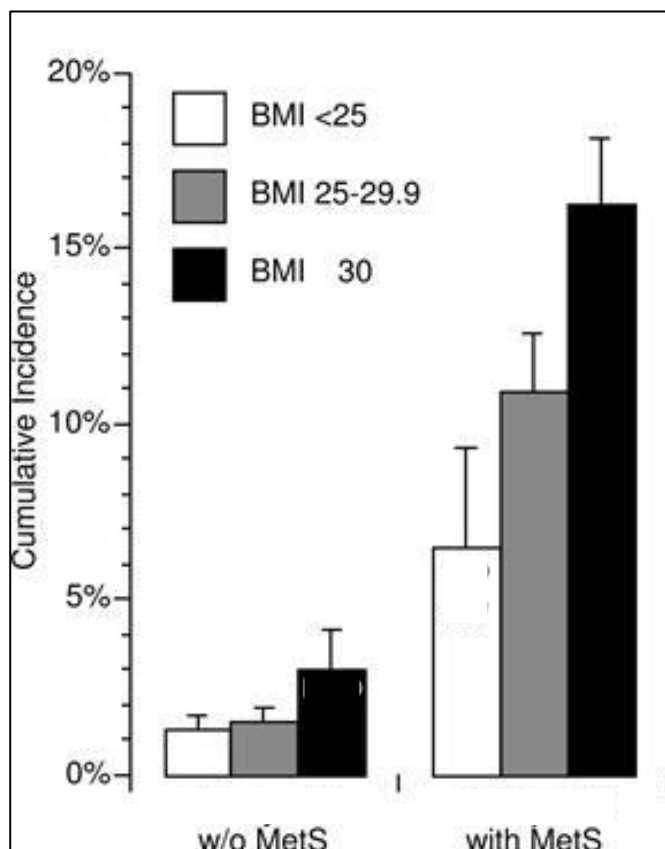


Figure 8 : Incidence du diabète de type 2 en fonction de l'indice de masse corporelle (BMI). w/o MetS : sans syndrome métabolique. With MetS : Avec syndrome métabolique. [99]

L'apparition d'un diabète de type 2 suit une certaine chronologie au regard de la masse de cellules bêta pancréatiques (Figure 9). Dans l'histoire naturelle de la maladie, la perte relative ou absolue de la sensibilité à l'insuline, précède la diminution de la production de l'insuline. Au stade précoce du développement de la maladie, cette résistance à l'insuline est compensée par une augmentation de la production d'insuline. Cette balance maintient ainsi la normoglycémie. En revanche, l'augmentation progressive de la résistance à l'insuline est rattrapée par une

diminution de la production d'insuline, à la suite de quoi, l'hyperglycémie survient et le diabète se développe (figure 9).

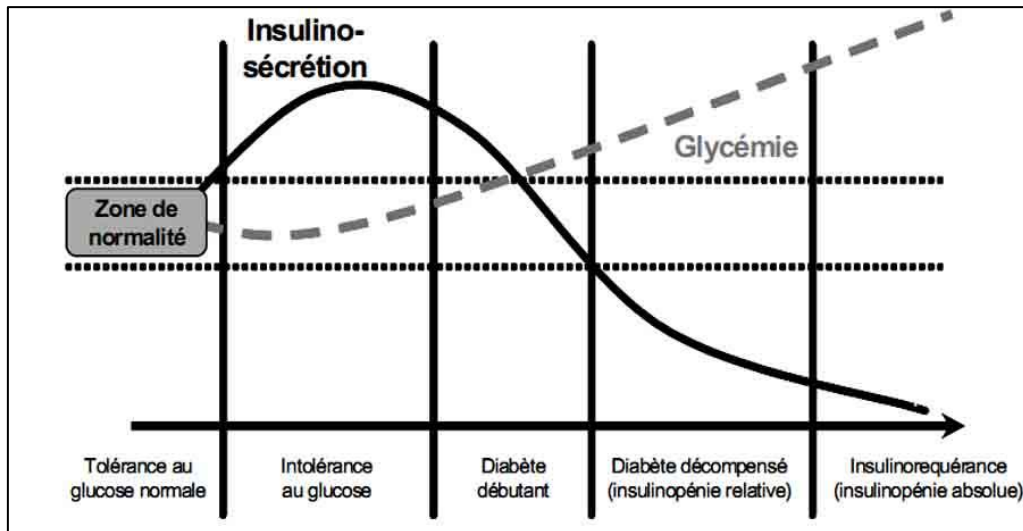


Figure 9 : Histoire naturelle du diabète de type 2 : Evolution de la glycémie et de la sécrétion d'insuline en fonction des différentes étapes de la maladie. [100]

1. Augmentation de la masse et de la fonction des cellules bêta en réponse à l'insulino-résistance due à l'obésité

L'échec de l'adaptation de la masse des cellules bêta pancréatiques et sa perte de fonction sont des étapes clés du développement du diabète de type 2. A l'origine, la résistance à l'insuline des tissus périphériques (le foie, les muscles et le tissu adipeux) qui apparaît durant l'obésité est d'abord compensée par une augmentation de la sécrétion de l'insuline des cellules et par une augmentation de la masse de cellules bêta pancréatiques. Cette compensation de la cellule bêta est une réponse à l'obésité et à l'insulino-résistance (Figure 9). Cette augmentation est induite par de nombreux signaux : facteurs de croissance, insuline, nutriments, glucose, acides aminés ou encore la leptine et le GLP-1 [101]. Des études effectuées sur des autopsies de pancréas humain révèlent que la masse de cellules bêta peut augmenter de 50 à 90 % chez des individus obèses [102], [103]. Seulement un certain pourcentage d'individus obèses développe un diabète de type 2, ce pourcentage est d'environ 3% chez des individus obèses sans syndrome métabolique et de 15% chez des individus obèses avec un syndrome métabolique.

[104], [105]. Par ailleurs cette corrélation positive peut varier selon l'âge, des études montrent que l'apparition d'un diabète en parallèle de l'obésité diminue avec l'âge [104], [106].

Le mécanisme de compensation des cellules bêta en réponse à l'obésité est très discuté. Certains groupes comme celui de P.Butler et *al* qui a effectué de grandes études sur des banques de tissus issus d'autopsies de patients obèses, montrent que chez l'humain cette compensation est principalement due à une augmentation de la néogenèse des cellules bêta sans observation de mécanismes de prolifération [102], [107], [108]. Une étude différente, effectuée sur des pancréas issus de patients opérés d'une duodéno-pancréatectomie, ne révèle pas de présence de marqueurs de prolifération au sein des cellules bêta. Les auteurs de cette étude mettent cependant en évidence la présence de marqueurs de néogenèse, tel que le marqueurs de cellules ductales, le CK19, dans les cellules bêta pancréatiques ainsi qu'un co-marquage du glucagon et de l'insuline, laissant envisager la possibilité d'une transdifférenciation des cellules alpha en cellules bêta chez les individus insulino-résistants non obèses et non diabétiques [109].

Cependant, les mécanismes d'augmentation de la masse de cellules bêta en réponse à l'obésité et à l'insulino résistance sont difficiles à mettre en évidence et à étudier chez l'humain. Les grandes avancées sur ce sujet ont été réalisées par des études effectuées chez les rongeurs.

Des publications récentes montrent que la cellule bêta prolifère en réponse à l'obésité. En effet, chez le rat, le glucose et les acides gras libres, induisent une augmentation de la masse de cellules bêta, ce phénomène étant lié à une augmentation de la prolifération [110]. De plus, il est montré que chez les rongeurs, un régime riche en lipides, connu pour induire une intolérance au glucose provoquent une prolifération des cellules bêta [111], [112]. Le glucose agit souvent en synergie avec l'insuline sur la prolifération. Des études montrent en effet, que l'insuline sécrétée en cas d'hyperglycémie peut agir sur la croissance de la masse de cellules bêta pancréatiques [57], [113]–[115].

Cependant, lors de l'obésité, le phénomène de prolifération des cellules bêta est observé avant de détecter une hyperglycémie. D'autres signaux que le glucose

sont donc impliqués dans ce processus de compensation. En effet, il existe des signaux neuronaux via le nerf vagal qui régulent la prolifération des cellules bêta et qui sont induits par l'obésité. [116]

En parallèle d'une augmentation de la masse des cellules bêta, différentes études montrent une élévation de la capacité des cellules bêta à sécréter de l'insuline en réponse à des stimuli dans des îlots d'individus obèses en comparaison à des îlots d'individus sains [117], [118]. En effet, des études montrent que le glucose ou les incrétines sont responsables d'une hypersécrétion de l'insuline par les cellules bêta en réponse à l'obésité et l'insulino-résistance [119]–[121].

2. Perte de la sécrétion de l'insuline et de la masse des cellules bêta : environnement diabétogène

A un certain stade du développement du diabète de type 2, la cellule bêta n'est plus en capacité de parer l'hyperglycémie provoquée par la résistance à l'insuline des tissus cibles et par les différents stress apporté par une obésité viscérale (Figure 9 et 10). A ce stade, on observe une diminution de la masse et de la fonction des cellules bêta pancréatiques. Des études ont montré que cette diminution peut aller de 25 % à 65 % [102], [122].

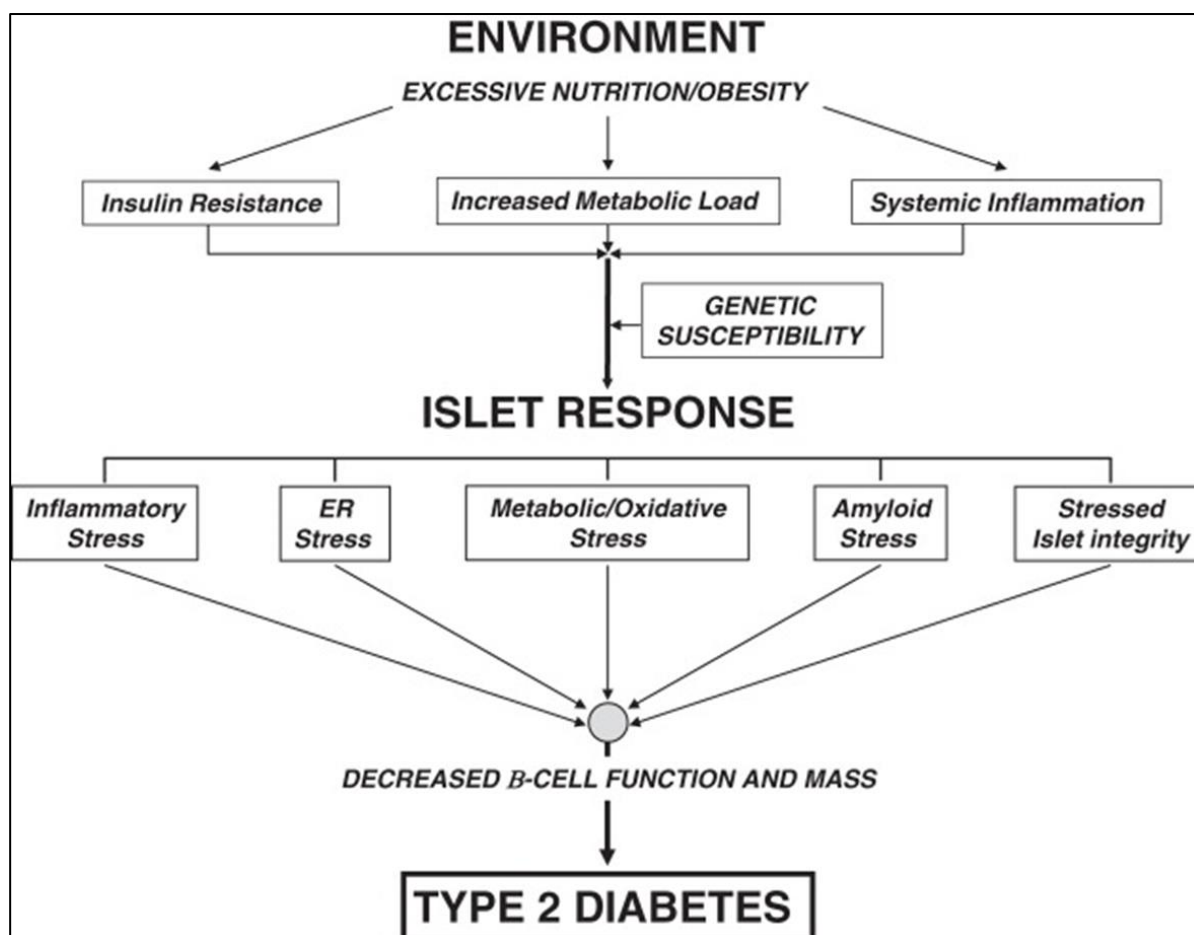


Figure 10 : Effet de l'environnement sur l'induction de facteurs diabétogènes et l'activation de différents stress dans la cellule bêta pancréatique au cours du développement d'un diabète de type 2. [123]

La principale cause de cette perte est l'augmentation du phénomène d'apoptose des cellules bêta [102]. D'autre part et durant ces dernières années, le concept de dédifférenciation des cellules bêta dans le diabète de type 2 a beaucoup été étudié. En particulier, des études regroupées dans la revue d'Accili *et al* en 2016 montrent que ce mécanisme est aussi à l'origine d'une perte de la masse fonctionnelle des cellules bêta [124].

Cette diminution de la masse de cellules bêta observée lors d'un diabète de type 2, provient d'un environnement diabétogène apporté principalement par une malnutrition et une susceptibilité génétique. En effet, il a été montré que cet environnement, caractérisé notamment par l'insulino-résistance, une inflammation, une hyperglycémie et une hyperlipidémie chronique (acides gras libres et les LDL-cholestérol oxydés) est responsable de la perte de la masse de cellules bêta pancréatiques [102]. (Figure 10).

Ces différents facteurs diabétogènes induisent dans la cellule bêta différents mécanismes contribuant au déclin du nombre et de la fonction de ces cellules. Parmi ces mécanismes, se trouvent entre autres le stress oxydatif, le stress inflammatoire et le stress du réticulum endoplasmique.

a. Le stress oxydatif

Un stress oxydatif est caractérisé par la présence excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans la cellule, les ROS sont principalement produits par la mitochondrie en réponse au glucose. Différents travaux montrent que ces ROS sont nécessaires à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [125]. De plus, un traitement par des antioxydants diminue la sécrétion d'insuline [126], [127]. Seulement, de récentes études indiquent que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ne dépend pas du niveau de concentration de l'H₂O₂. Ces études montrent que le glucose ainsi que d'autres sécrétagogues diminuent la concentration en H₂O₂ dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale des cellules bêta pancréatiques ainsi que l'oxydation du glutathion mitochondriale [128], [129]. De plus, une autre étude montre qu'un traitement antioxydant permettant d'inactiver l'H₂O₂ des cellules sécrétrices d'insuline n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose [130].

Dans le cas du développement d'un diabète de type 2, il a été montré que l'hyperglycémie chronique provoque un dysfonctionnement de la mitochondrie et une production de ROS en concentration anormalement élevée [131]. De plus, chez des patients diabétiques, l'augmentation de la concentration des marqueurs du stress oxydatif est corrélée avec une diminution de la sécrétion d'insuline. Il a aussi été montré que des agents antioxydants préviennent les dommages causés par l'hyperglycémie chronique sur les îlots et la masse de cellules bêta [132], [133].

b. L'inflammation

Des fortes concentrations en glucose et en acides gras libres, induisent le recrutement de macrophages ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires telle que l'interleukine-1 β . Dans les premières étapes du développement de la maladie, l'interleukine-1 β ou encore l'interleukine-6 ont un rôle protecteur, mais au

fur et à mesure, une longue et forte exposition à ces cytokines provoquent une diminution de la sécrétion d'insuline et l'apoptose des cellules bêta pancréatiques [134].

c. Le stress du réticulum endoplasmique dans la cellule bêta pancréatique.

L'environnement diabétogène est aussi connu pour induire un stress du réticulum endoplasmique (RE). Le stress du réticulum endoplasmique se déclenche lorsque la quantité de protéines à conformer dépasse la capacité du réticulum endoplasmique. Cette réponse cellulaire a pour but de restaurer l'homéostasie du RE en augmentant la synthèse de protéines impliquées dans le contrôle de la maturation des protéines. Le stress du RE passe principalement par l'activation de 3 protéines présentes dans la membrane du RE (Figure 11). Il s'agit de PERK, IRE1 α et ATF6. Ces protéines sont maintenues inactives par leur liaison avec la protéine chaperonne BIP. Lors de l'activation d'un stress du RE, ces trois protéines sont activées par dissociation de la protéine chaperonne.

PERK est une sérine-thréonine kinase, une fois activée, elle phosphoryle le facteur eIF2 α ce qui entraîne un blocage de la traduction inhibant ainsi la synthèse de protéine. Une fois phosphorylé, eIF2 α induit la traduction d'ATF4 ce qui déclenche la transcription de la protéine CHOP qui est impliquée dans l'apoptose.

Lors d'un stress court, la voie Ire1 α conduit à l'épissage de l'ARNm d'XBP1, ainsi XBP1s régule positivement l'expression de protéines chaperonnes et la voie de dégradation ERAD et inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique CHOP. Lors d'un stress prolongé, cette voie conduit à l'activation de la kinase pro-apoptotique JNK1 via la protéine ASK1.

La voie ATF6 conduit à l'expression entre autres d'XBP1, CHOP et de protéines impliquées dans le système de dégradation ERAD [135].

Ce stress du RE peut être causé par des conditions environnementales pathologiques telles qu'un changement de concentration de Ca²⁺, du statut redox des cellules ou encore de la présence anormale de cholestérol. L'accumulation de cholestérol libre et d'acides gras libres retrouvés dans des conditions diabétogènes

peut par exemple provoquer ce type de stress [136].

Durant le processus de compensation, la cellule bêta augmente sa fonction en augmentant la production et la sécrétion d'insuline. Le RE est alors soumis à une demande accrue de travail tant au niveau de la conformation spatiale de la protéine, son repliement, que de sa maturation et de son transport. Lorsque la demande est trop forte, il en résulte une accumulation de protéines mal structurées dans le RE aboutissant à un stress du RE. Ce stress du RE est un événement majeur causant la mort des cellules bêta pancréatiques lors d'une hyperglycémie et d'une hyperlipidémie chronique [137]–[139]. D'ailleurs, le stress du RE est lié au stress oxydatif ainsi qu'à l'inflammation [140], [141].

Les principaux acteurs de l'apoptose des cellules bêta suite à l'activation du stress du RE par un environnement diabétogène sont l'induction de l'expression du facteur CHOP et l'activation de la MAPK JNK1. L'expression de CHOP est régulée par les voies PERK et ATF6 du stress du RE. Des souris invalidées pour ce gène sont protégées de l'apoptose des cellules bêta induite par différents stress y compris un stress oxydatif [142]. La kinase JNK1 est activée par la voie IRE1- α , une fois phosphorylé, IRE-1 α forme un dimère puis recrute les protéines TRAF2 et ASK1. Ce complexe est alors responsable de l'activation de JNK1, qui à son tour est responsable de l'apoptose [135], [143].

Cependant, il est intéressant de noter que le stress du RE principalement connu pour activer l'apoptose des cellules bêta est aussi important pour la compensation de la masse de cellules bêta. L'invalidation de différents acteurs du stress du RE dans des modèles murins ont permis de mettre en évidence les effets paradoxaux des trois voies du RE à la fois impliquées dans la mort de la cellule bêta et ainsi dans le développement d'un diabète de type 2 mais aussi dans le développement et la compensation des cellules bêta pancréatiques. Par exemple, un modèle de souris invalidées spécifiquement dans la cellule bêta pour le gène *Perk* a une masse de cellules bêta réduites, ce qui est dû à un mauvais développement de celles-ci [144]. De même, le groupe de Kaufman et al montre en 2009 que la phosphorylation d'eIF2 α par la sérine-thréonine kinase PERK protège les cellules bêta d'un stress oxydatif et permet de maintenir une production d'insuline adéquate à la demande de

l'organisme [145]. Contrairement à un stress prolongé, une exposition rapide au glucose de la cellule bêta provoque une réponse de la voie IRE-1 α permettant de maintenir une bonne sécrétion d'insuline [146]. La délétion du gène *Atf6 α* chez la souris aboutit à une augmentation de la mort des cellules bêta, induite par un régime riche en lipides, suggérant alors un rôle de ce facteur dans la compensation de la cellule bêta lors de l'obésité [147].

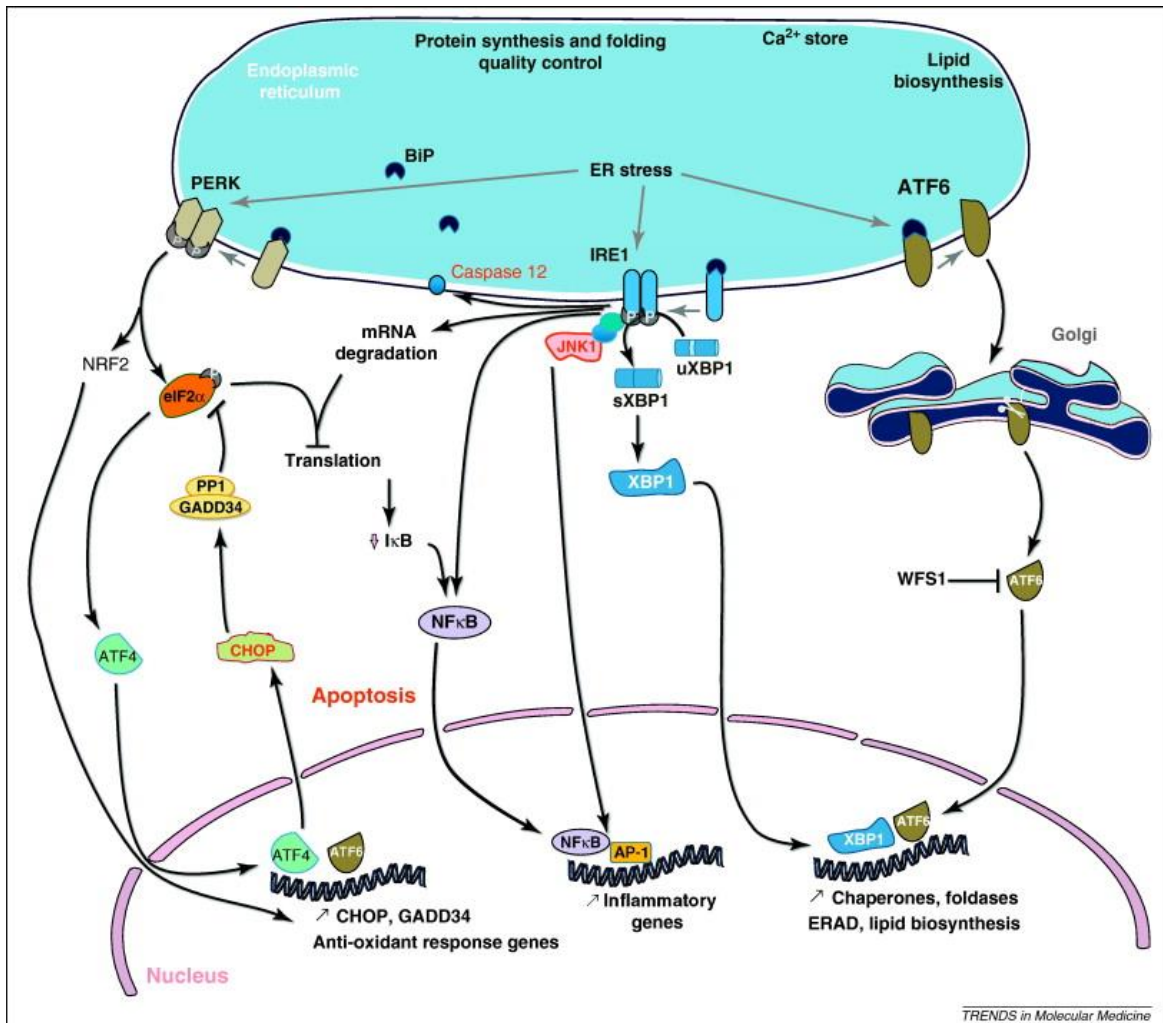


Figure 11 : Activation du stress du reticulum endoplasmique au sein de la cellule bêta [148]

d. Rôle des LDL-oxydées dans le dysfonctionnement de la cellule bêta pancréatique

Il existe deux types de lipoprotéines transportant le cholestérol dans l'organisme, les HDL (High Density Lipoproteins) et les LDL (Low Density Lipoproteins). Les HDL et les LDL sont des lipoprotéines qui ont pour rôle le transport du cholestérol.

Un environnement diabétogène est caractérisé par une augmentation de l'oxydation des LDL ainsi qu'une diminution du taux de HDL. Différentes études montrent que ces LDL-oxydées sont responsables de l'expression de cytokines ou de ROS dans différents types cellulaires. De plus, Il a été montré que chez des individus obèses le taux de LDL- oxydés augmente et cette augmentation est encore plus forte chez des patients obèses diabétiques. En effet, une augmentation des LDL-oxydées est associée au syndrome métabolique, c'est-à-dire à un ensemble de symptômes liés à la mise en place d'un diabète de type 2, ainsi qu'aux maladies cardiovasculaires [149], [150]. Inversement, les HDL ont un rôle protecteur sur la cellule bêta pancréatique. Des études montrent en effet qu'ils protègent la cellule bêta en inhibant le stress du RE et en limitant l'activation de la voie des JNKs induite par les LDL-oxydées [151], [152].

Les facteurs responsables de l'oxydation des LDL-oxydées dans le cadre du développement d'un diabète de type 2 ne sont pas encore bien déterminés. Seulement, plusieurs publications rapportent que de fortes concentrations en glucose peuvent être responsables de la modification des LDL [153]–[155].

Les LDL-oxydées font partie intégrante des facteurs de stress pouvant participer au développement d'un diabète de type 2. Par ailleurs, une étude a montré que les cellules bêta pancréatiques expriment le récepteur au LDL-oxydées, le récepteur CD36 [156]. Cette même étude montre que les LDL-oxydées ont un rôle néfaste sur l'expression et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans une lignée cellulaire bêta pancréatique. Une étude supplémentaire montre le rôle pro-apoptotique des LDL-oxydées sur la cellule bêta [151].

Les LDL-oxydées agissent entre autres via l'activation des JNKs qui elles-mêmes activent le facteur de transcription AP-1, responsable d'une diminution de l'expression de l'insuline et impliquées dans la régulation des phénomènes d'apoptose [151]. D'autre part, les LDL-oxydées sont responsables de l'activation du répresseur ICER (Inducible cAMP early repressor) dans la cellule bêta, ICER étant impliqué dans l'apoptose de ces cellules et inhibant l'expression de certains gènes tel que celui de l'insuline [157], [158]. Par ailleurs, les LDL-oxydées ont été montrées comme étant responsables d'un stress oxydatif dans les cellules [158].

C. Thérapie actuelle du diabète de type 2

La prise en charge d'un diabète de type 2 intervient avant tout sur le style de vie du patient. Une bonne alimentation et une activité sportive régulière permettent de limiter le développement de ce diabète. Cependant, il arrive que ces différentes actions préventives se révèlent inefficaces et que des traitements médicamenteux soient prescrits. L'offre médicamenteuse développée jusqu'à aujourd'hui agit sur les tissus cibles de l'insuline en augmentant leur sensibilité à l'insuline ou surtout en limitant l'absorption au niveau de l'intestin de glucose ainsi que la production de glucose par le foie. Ces médicaments peuvent aussi agir sur les cellules bêta en stimulant la sécrétion d'insuline et en favorisant leur survie.

Le premier groupe de médicaments contient deux types de molécules : les biguanides et les inhibiteurs de l' α -glucosidase. Ils agissent principalement au niveau du foie et de l'intestin. Parmi les biguanides, le plus connu est la metformine qui agit sur le foie en inhibant entre autres la neoglucogenèse. Les inhibiteurs de l' α -glucosidase agissent sur la digestion des sucres [159].

Le deuxième groupe agit sur la cellule bêta pancréatique, il comporte entre autres les sulfonylurées, les glinides, les gliptines et les mimétiques du GLP-1. Les sulfonylurées et les glinides jouent sur la sécrétion d'insuline [159].

Les mimétiques du GLP-1 ont quant à eux une action plus variée et agissent sur plusieurs organes différents. Au niveau du pancréas endocrine, ils stimulent la sécrétion d'insuline et diminuent celle du glucagon mais ils peuvent retarder la vidange gastrique et augmenter la satiété. Parmi les agonistes du récepteur au GLP-1, on retrouve principalement l'exendine-4 et le liraglutide. La classe des gliptines représentent les inhibiteurs du DPP-4 (Dipeptidyl peptidase 4). Ces derniers dégradent le GLP-1 et le GIP, ainsi ces inhibiteurs augmentent la durée de vie de ces hormones [159].

III. ROLE DES SERINE-THREONINE KINASES (STKS) DANS LE CONTROLE DE LA FONCTION ET DE LA MASSE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES

A. Généralités

La régulation de tous les mécanismes mis en place par la cellule bêta pour parer aux différents évènements physiologiques ou pathologiques, croissance, grossesse et développement d'un diabète, passe par l'activation de voies de signalisation. Ces dernières impliquent dans un premier temps l'activation d'enzymes intracellulaires qui vont ensuite moduler l'expression de gènes dans le noyau, on parle alors de « cascades de signalisations ». En général, l'activation des enzymes survient rapidement en réponse à l'activation de récepteurs membranaires provoquée par des stimuli tels que des facteurs de croissance, des hormones ou certains nutriments.

Les Sérine-Thréonine Kinases (STKs) représentent une classe d'enzymes impliquées dans la réponse cellulaire au cours de la maturation postnatale et de la compensation des cellules bêta pancréatiques. Parmi les enzymes au centre des signalisations induites dans les mécanismes physiologiques liés au métabolisme, on retrouve notamment la sérine-thréonine kinase Akt, les protéines kinases C (PKC) ou encore les kinases de la famille des MAPK. L'activation de ces enzymes est induite par des nutriments (glucose, acides gras) et des hormones (GLP-1). [59], [160]–[162].

B. Les MAPKs

1. La famille des MAPKs

Les MAPKs représentent une famille de sérine-thréonine kinases, transférant un groupement phosphate à des résidus sérines ou thréonines flanqués d'un groupement proline en position carboxy-terminale. Elles constituent un groupe d'enzymes connues et conservées au cours de l'évolution.

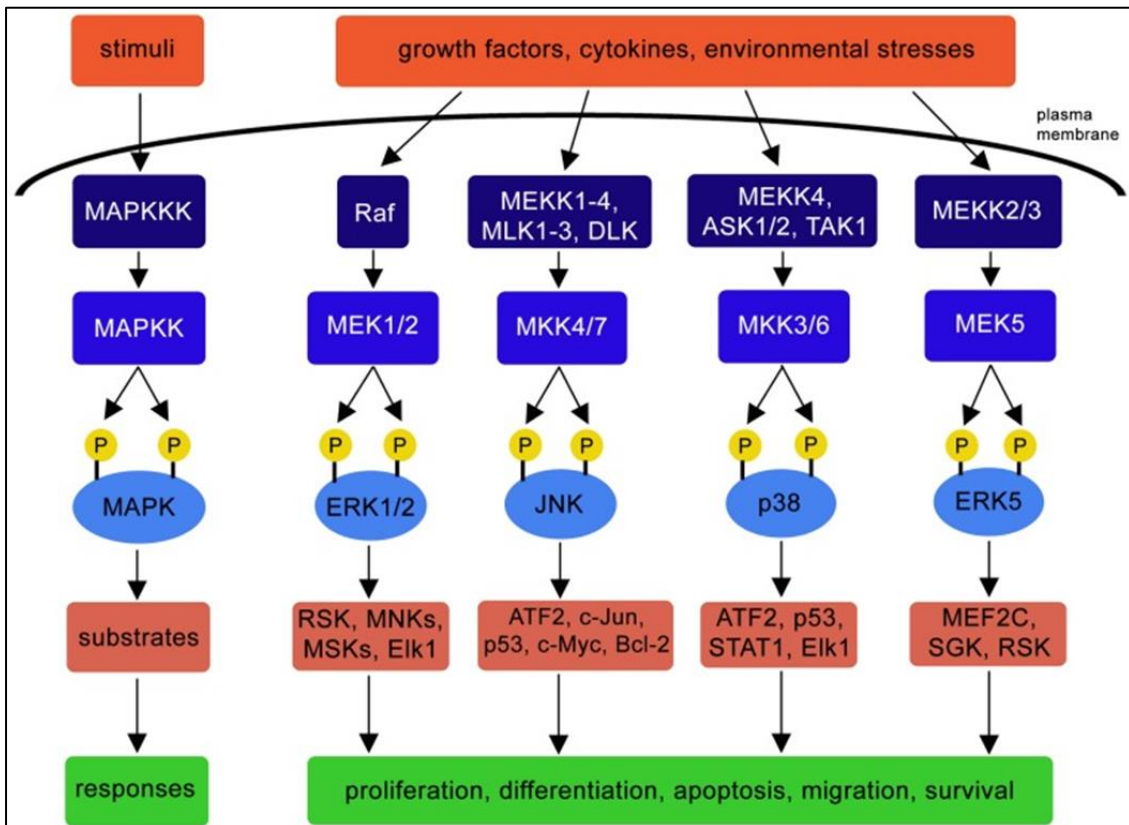


Figure 12 : La famille des MAPKs. [163]

Cette famille est composée des kinases ERK1/2, ERK5, JNK1/2/3 et p38 $\alpha/\beta/\gamma\delta$ qui sont activées en réponse à des stimuli extracellulaires (Figure 12). L'activation se fait au sein d'un complexe protéique : une MAPK kinase kinase (MAP3K) phosphoryle une MAPK kinase (MAP2K) qui phosphoryle à son tour une MAPK. Cette cascade d'activations se produit au sein d'une protéine d'échafaudage (Figure 13). La double phosphorylation du motif Thr-Pro-Tyr est nécessaire à l'activation de ces kinases. Une fois activées les MAPKs phosphorylent leurs substrats, parmi eux se trouvent des facteurs de transcription tels que Elk-1, c-jun, ATF-2, SAT [164]. (Figure 12 et 13)

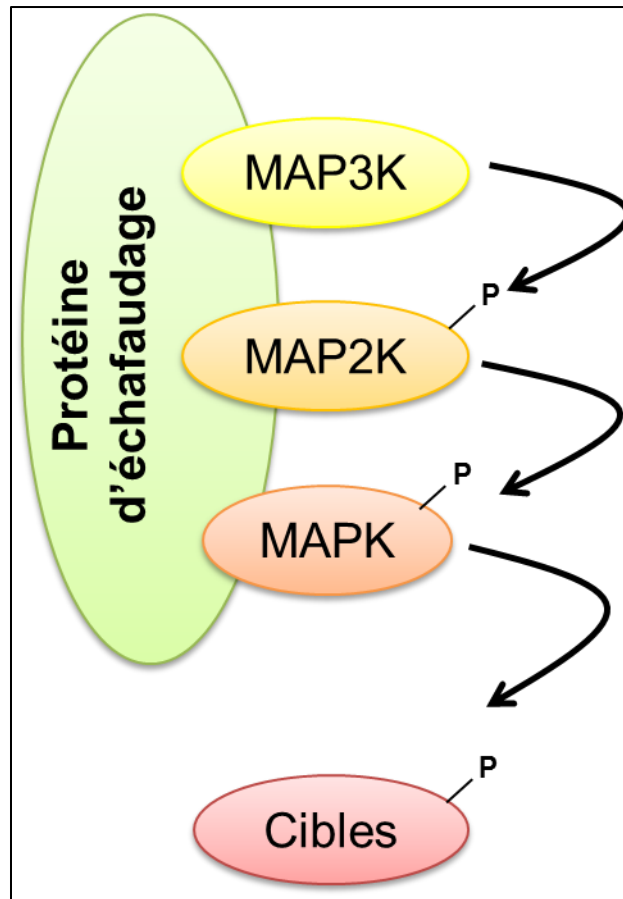


Figure 13 : Cascade d'activation des MAPKs

2. Rôles dans la cellule bêta

a. ERK1/2

Le rôle des MAPKs a beaucoup été étudié dans la cellule bêta. Les kinases ERK1 et ERK2 ont été montrées comme étant protectrices et importantes pour l'expression et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le modèle de souris « knock-out » pour ERK2 n'est pas viable et son inhibition dans un modèle de lignée de cellules bêta pancréatiques provoque la mort de ces cellules. Le modèle de souris « knock-out » pour ERK1 a permis de mettre en évidence le rôle central des MAPKs ERK1 et ERK2 dans la signalisation induite par le glucose impliquée dans la survie cellulaire et dans la sécrétion de l'insuline [165], [166].

b. P38

Au contraire des voies ERK1 et ERK2, la voie de la MAPK P38 est particulièrement étudiée pour son rôle dans l'apoptose des cellules bêta pancréatiques en réponse à différents stress tels que la lipotoxicité et le stress oxydatif. Il a été montré que les hormones GIP et GLP-1 exercent leurs effets bénéfiques sur la cellule bêta via une inhibition des voies p38 [167].

Cependant, d'autres publications accordent à p38 un rôle dans la sécrétion d'insuline par un impact sur la stabilisation du facteur de transcription PDX-1. En effet, p38 régule positivement l'expression de PDX-1. De plus, une interaction et une phosphorylation entre p38 et PDX-1 a été mise en évidence dans un modèle de lignées cellulaires beta pancréatiques. [168]

C. JNKs

1. Caractéristiques des différentes JNKs

Les JNKs constituent une famille très conservée de sérine-thréonine kinases. On distingue 3 JNKs, JNK1 (MAPK8), JNK2 (MAPK9) et JNK3 (MAPK10), codées par trois gènes distincts. Dix isoformes différentes ont été caractérisées, résultant de l'épissage alternatif de ces trois gènes, donnant des protéines de 46 à 55 kDA par une extension en C-terminal [169]. Ces différentes isoformes possèdent 85 % d'homologie dans leurs domaines catalytiques. Le gène codant l'isoforme JNK3 a un codon ATG supplémentaire en N-terminal qui lui confère une extrémité N-terminale plus longue [169]. Cette extrémité lui attribue une spécificité et lui permet par exemple d'interagir avec la protéine d'échafaudage β -arrestine 2 [170]. (Figure 14).

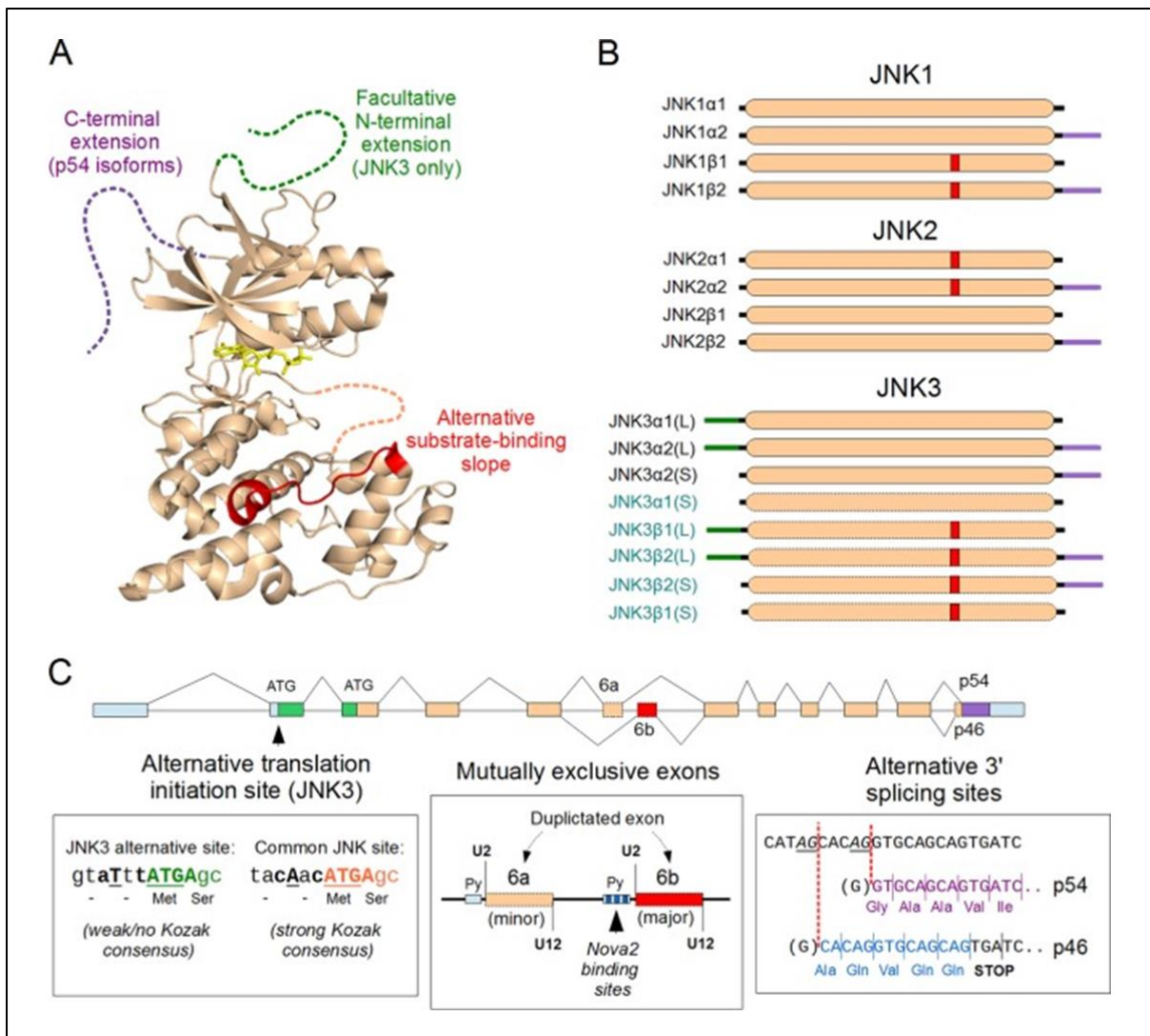


Figure 14 : Caractéristiques des différentes isoformes des JNKs. [169]

A. Structure protéique des JNKs. Beige : Structure générique, Violet/Vert/Rouge : Région variable.
B. Différentes isoformes des JNKs provenant de l'épissage alternatif des trois différents gènes distincts.
C. Mécanismes de l'épissage alternatif.

Ces trois JNKs ont des profils d'expression et des rôles différents, voir opposés. Les isoformes JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires contrairement à JNK3 dont l'expression se limite à quelques tissus, en particulier au tissu neuronal, au tissu testiculaire et au pancréas endocrine. De plus au sein du tissu neuronal, le profil d'expression des 3 JNKs, JNK1/2/3 est variable. Les isoformes JNK1 et JNK2 sont les plus représentées chez l'adulte et marquent les mêmes régions, tandis que l'expression de JNK3 est plus sélective et se limite à quelques régions telles que le noyau endo-piriforme et l'habenula mediale [171]. Chez le nouveau-né, le profil d'expression de JNK2 est semblable à celui chez l'adulte, alors que celui de JNK3 varie, avec une forte expression chez le nouveau-né et une diminution de son

expression chez l'adulte. Par ailleurs, durant les différentes étapes du développement, on observe une régulation du niveau d'expression de JNK2 et JNK3 ainsi que de la région où ces kinases sont exprimées [171].

Les JNKs sont connues pour être des médiateurs de la réponse cellulaire aux stress tels que les UV, le stress oxydatif, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie chronique, les cytokines pro-inflammatoires ou encore des polluants comme le bisphénol [172]. La cible la plus connue des JNKs est le facteur de transcription c-jun impliqué dans le complexe AP-1 qui est formé de c-jun et c-fos. En plus de c-Jun, les JNKs ont aussi pour cibles les autres membres de la famille des Jun ainsi que le facteur de transcription ATF.

Par ailleurs, selon l'isoforme des JNKs, l'affinité pour leur substrat peut différer. Par exemple, il a été montré dans une étude que les isoformes JNK2 β 1 et JNK2 β 2 se lient plus facilement à ATF2 qu'à c-jun. Inversement, JNK2 α 1 et JNK2 α 2 se lient plus facilement à c-jun qu'à ATF2 [173]. Cette dernière étude indique aussi qu'aux concentrations physiologiques, une seule des isoformes est capable d'activer spécifiquement un substrat et donc d'induire une réponse cellulaire précise [173].

De plus, selon le modèle, le type cellulaire, la durée d'activation et surtout l'isoforme, le rôle des JNKs peut-être soit protecteur soit proapoptotique pour la cellule. En effet, une étude publiée dans *Molecular Cell*, indique qu'une heure d'activation des JNKs par le TNF- α induit des signaux de survie dans la cellule tandis qu'une activation plus longue induit des signaux pro-apoptotique [174]. Les temps courts d'activation des JNK sont corrélés avec des phénomènes de survie et de résistance à différents stress [175], alors qu'une activation plus longue de ces kinases induit l'apoptose des cellules. Ces réponses opposées temps-dépendantes, ont été observées dans différentes conditions de stress cellulaires telles que le TNF- α , le stress lié aux dommages à l'ADN ou encore le stress du réticulum endoplasmique [176]–[178].

2. Mécanisme d'activation et cibles des JNKs dans un contexte d'insulino-résistance

De nombreuses études montrent l'implication de ces MAPKs dans le développement du diabète de type 2 et ses complications. L'activation des JNKs est à ce jour particulièrement étudiée dans la résistance à l'insuline qui se développe en parallèle de l'obésité.

Les souris « knock-out » pour JNK1 et pour JNK2 sont protégées de l'insulino-résistance qui se développe à la suite d'un régime riche en lipides. La suppression de JNK1 prévient la prise de poids ainsi que la stéatose hépatique. La suppression de JNK2 dans un modèle de souris obèses non diabétiques (NOD) réduit l'hyperglycémie. [179]–[181].

Les mécanismes par lesquelles JNK1 et JNK2 interviennent dans l'insulino-résistance due à l'obésité sont variés. Des publications montrent que les JNKs peuvent phosphoryler les récepteurs à l'insuline IRS1 et IRS2 en ser-307, site inhibiteur, dans les hépatocytes et les adipocytes, inhibant ainsi l'action de l'insuline [182], [183]. Les JNKs régulent aussi négativement l'activité de PPAR α dans les hépatocytes [184].

3. Les JNKs et la cellule bêta pancréatique

Dans la cellule bêta pancréatique, JNK1 et JNK2 sont connues pour avoir des effets délétères. En particulier, ils régulent négativement l'expression de l'insuline et induisent l'apoptose des cellules bêta en réponse à différents stress.

L'activation des JNKs par un stress oxydatif provoque la translocation du facteur de transcription PDX-1 dans le cytoplasme. Cette translocation inhibe alors la fonction de PDX-1 dans le noyau, PDX-1 étant un facteur de transcription régulant l'expression de gène nécessaire au maintien de l'identité de la cellule bêta [185]–[187]. L'inhibiteur des JNKs, le SP600125 a été montré comme augmentant l'expression du gène *Pax6*, ce dernier étant essentiel à la synthèse et à la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose [188]. De même, la phosphorylation de JNKs augmente l'activité transcriptionnelle et le niveau de c-jun dans le noyau. Une augmentation de c-jun provoque la formation d'un complexe AP-1 qui agit en tant

que répresseur de l'expression du gène de la pré-proinsuline [189].

La majorité des études effectuées sur les JNKs et la cellule bêta évoquent le rôle pro-apoptotique des JNKs. En effet, les JNKs sont des médiateurs de l'apoptose induite par un grand nombre de facteurs, tels que le stress oxydatif, les cytokines (IL-1 β et TNF- α), les dépôts d'amyloïdes, l'hyperglycémie chronique, les LDL-oxydées ou encore le palmitate [151], [190]–[195]. Plus récemment, l'activation des JNKs a aussi été montrée comme liant le stress oxydatif au stress du réticulum endoplasmique et induisant l'apoptose des cellules bêta [135].

4. Focus sur l'isoforme JNK3

L'isoforme JNK3 est particulière, dans sa structure et par son expression limitée à quelques tissus : le tissu neuronal, le tissu testiculaire et le tissu pancréatique [162]. De plus, son rôle dans le tissu neuronal, où JNK3 a été montrée comme étant impliquée dans des maladies neurodégénératives est à l'opposé de son rôle dans la cellule bêta pancréatique dans laquelle son expression est bénéfique [162], [196].

Plusieurs études montrent l'effet bénéfique de l'absence de JNK3 dans le tissu neuronal. En effet, son absence protège les neurones de la mort induite par l'axotomie et ce d'une façon indépendante du facteur de transcription c-jun [197]. De même, JNK3 est impliqué dans l'apoptose des neurones dopaminergiques et l'inhibition de la signalisation β -arrestine2/JNK3 protège les neurones lors de reperfusion ischémiques [198]. Un modèle de souris invalidées pour le gène *Jnk3* montre une protection contre la mort neuronale [199]. Inhiber l'expression de JNK3 réduit la phosphorylation de c-jun, l'activation de la protéine apoptotique Bim (Bcl-2-like protein 11) et l'expression de Fas et protège donc contre les lésions cérébrales après une ischémie induite par hypoxie [200]. Ainsi, les cibles de JNK3, varient selon le stress induit.

Plusieurs facteurs régulent l'activation de JNK3. Par exemple la CDK5 réduit l'apoptose des neurones en inhibant l'activation de JNK3 [201]. Une autre étude indique que le GABA peut aussi inhiber la voie apoptotique impliquant JNK3 [202].

En somme, dans le tissu neuronal, JNK3 est un médiateur de stress induisant l'apoptose des neurones. Elle suscite donc de nombreuses recherches dans le

développement de plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la maladie d'Huntington [196]. Elle représente donc une cible thérapeutique importante dans la recherche contre ces pathologies.

De plus, on a attribué un rôle à JNK3 dans la différenciation neuronale via la phosphorylation négative d'APP (amyloid precursor protein) [203]. Une étude datant de 2003 met en parallèle le rôle de JNK3 dans la mort cellulaire mais aussi dans le développement. En effet, la transfection de JNK3 augmente l'apoptose induite par les UV. Mais dans un même temps, l'expression de JNK3 augmente la longueur des neurites lors de la différenciation cellulaire induite par le NGF (nerve growth factor) [204].

Dans la cellule bêta pancréatique, on lui attribue un tout autre rôle. En effet contrairement à JNK1 et JNK2, JNK3 protège les cellules bêta contre l'apoptose induite par les cytokines pro-inflammatoires [162], [205]. De plus, son expression est nécessaire aux effets bénéfiques de l'exendine 4, analogue du récepteur au GLP-1 sur la cellule bêta [205]. Cette hormone augmente l'expression de JNK3 dans la lignée bêta pancréatique INS-1E ainsi que dans des îlots de Langerhans humains [205]. Dans ces derniers, l'expression de cette isoforme pourrait constituer un marqueur de qualité lors de la transplantation d'îlots [206].

JNK3 est aussi importante pour la signalisation de l'insuline au sein de la cellule bêta. En effet, elle est nécessaire au maintien de l'expression du gène *Irs2*, et donc de la phosphorylation d'Akt, FOXO3A et GSK3 qui sont des signalisations indispensables à la fonction de la cellule bêta pancréatique [207].

D. MAP3K12 (DLK)

DLK (Dual Leucine Zipper Kinase) est aussi appelée MAP3K12. Elle est une MAP3K appartenant à la famille des MLK (Mixed Lineage Kinase). DLK est une protéine de 130 kDa composée d'un unique domaine catalytique, de deux motifs « leucine/isoleucine zipper » et de domaine NH-terminal et COOH-terminal riche en glycine et proline [208]. (Figure 15). DLK est principalement exprimée au niveau du système nerveux central où son rôle peut-être soit anti-apoptotique soit au contraire

pro-apoptotique [209], [210]. Cette MAP3K exerce ses effets via les cascades de signalisations des JNKs et de P38 et *via* l'activation des MAP2K, MKK7 et MKK4 au sein de protéines d'échafaudages [209], [211], [212].

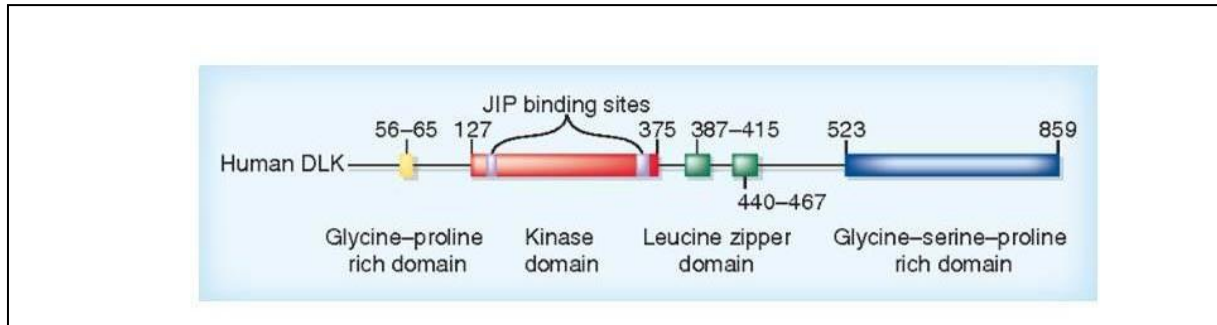


Figure 15 : Structure protéique de la Dual Leucine Zipper Kinase (DLK). [213]

Des études montrent que l'expression et l'activation de DLK sont nécessaires pour transmettre les signaux permettant la régénération axonale. Dans ce contexte, DLK exerce son effet via l'activation de la voie des JNKs [210], [214]. De plus, une autre étude montre que la cascade de signalisations formée de DLK, MKK4 (MAP2K) et P38 est aussi nécessaire au développement du système nerveux où elle est impliquée dans des processus de reformatons axonales suite à des lésions cérébrales [215]. Enfin, des études chez la souris montrent que DLK est aussi impliquée dans le développement cérébral au cours de la période embryonnaire. Ce rôle nécessite l'activation des JNKs [216].

DLK est aussi impliquée dans des processus pro-apoptotiques telle que la dégénérescence neuronale [209]. Il a été montré dans une étude que DLK active la voie des JNK et la protéine d'échafaudage JIP3, cette cascade est responsable de l'apoptose neuronale et de la dégénérescence axonale durant le développement [209]. Un autre travail a mis en évidence le rôle pro-apoptotique de la signalisation DLK/JNK. Dans cette étude, cette signalisation est montrée comme responsable de l'apoptose des neurones via l'activation du facteur de transcription c-jun [217]. Dans cette dernière étude, l'hypothèse d'un rétrocontrôle permettant d'amplifier le signal et la stabilité de DLK par JNK est évoquée [217].

Le rôle de DLK dans la cellule bêta pancréatique a été étudié par le groupe de E.Oetjen. Cette équipe a mis en évidence un rôle néfaste de DLK dans la cellule

bêta. Ces publications montrent qu'un traitement aux cytokines des cellules bêta induit une translocation de DLK vers le noyau. Dans le noyau, DLK inhibe l'activité du facteur de transcription CREB qui est impliqué dans le maintien de la masse de cellule bêta [218]. De plus, il a été montré que l'activation des JNKs par DLK induit une phosphorylation inhibitrice sur mafA, un facteur de transcription important pour l'expression de l'insuline, inhibant ainsi la production et la sécrétion de l'insuline [219]. L'effet inhibiteur de DLK sur mafA et ainsi son rôle néfaste sur la cellule bêta ont été corrélés avec la localisation nucléaire de DLK [220].

Plus récemment, une étude transcriptomique effectuée dans des îlots de rats âgés de 10 jours et dans des îlots de rats adultes, montre une augmentation de l'expression de DLK dans les îlots de rats âgés de 10 jours [38]. Ces résultats suggèrent un rôle de cette sérine-thréonine kinase dans le développement de ces îlots immatures.

OBJECTIFS

I. ROLE DES STKS DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA MASSE DES CELLULES BETA PANCREATIQUES

Ainsi que nous l'avons vu, les mécanismes mis en œuvre lors du développement postnatal pour mettre en place une masse de cellules bêta pancréatiques adultes fonctionnelles sont cruciaux. Ils permettent de prévenir l'apparition d'un diabète de type 2 à l'âge adulte.

D'autre part, les STK jouent un rôle central dans les signalisations permettant d'aboutir au maintien de la cellule bêta. Très récemment, l'étude transcriptomique effectuée dans des îlots de rats âgés de 10 jours et dans des îlots de rats adultes a mis la lumière sur la sérine-thréonine kinase DLK. En effet, cette dernière est surexprimée dans des îlots de rats au cours du développement postnatal. Nous posons alors l'hypothèse du rôle de cette MAP3K dans le développement de la masse de cellule bêta.

Actuellement peu d'études ont été effectuées quant au rôle de DLK dans la cellule bêta pancréatique. C'est pourquoi l'un des principaux objectifs de mes travaux de thèse était d'identifier le rôle de DLK dans la cellule bêta pancréatique au cours du développement.

II. ROLE DES SERINE-THREONINE KINASES DANS L'EFFET DELETERE DE FACTEURS DIABETOGENES SUR LA CELLULE BETA PANCREATIQUE

Parallèlement à mon premier axe de recherche, j'ai pu au cours de ma thèse participer activement à une autre étude effectuée au laboratoire.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans le déclin de la cellule bêta pancréatique lors du développement d'un diabète de type 2. Parmi les différents facteurs diabétogènes impliqués, nous nous sommes intéressés au LDL-oxydées. La modification des LDL est associée à l'intolérance au glucose et au diabète. De plus, le dysfonctionnement des cellules bêta par les LDL-oxydées survient par l'activité des JNKs [151]. La culture des cellules bêta avec un inhibiteur de JNK protège les cellules de la mort induite par les LDL-oxydées.

Quelques travaux indiquent le rôle du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les mécanismes activant les JNKs. Le stress du RE survient lorsque la maturation et le repliement des protéines ne se font plus correctement. Par ailleurs, de nombreux facteurs diabétogènes tels que les acides gras libres et l'hyperglycémie chronique activent les trois voies du stress du RE. Nous supposons ainsi que l'activation des JNKs et les effets délétères des LDL-oxydées résultent du stress du RE.

L'objectif de cette étude est alors de déterminer le rôle du stress du RE dans les effets dus aux LDL-oxydées dans les cellules bêta pancréatiques.

MATERIELS ET

METHODES

I. MODELES UTILISES

A. Ilots de Langerhans

L'ensemble des rats utilisés dans cette étude sont des Sprague Dawley issus des laboratoires Janvier. Voici les étapes de la technique d'isolement d'îlots de Langerhans : Les rats sont tués par décapitation puis les pancréas sont prélevés et digérés par de la collagénase de type P (Roche, 11213873001) à 1 mg/ml pendant 5 minutes sous forte agitation pour les rats nouveau-nés (1 jours - 15 jours) ou à 2 mg/ml durant 60 minutes à 37°C sous faible agitation pour les rats adultes (< 15 jours). La digestion des pancréas est stoppée par l'ajout d'une solution de lavage : Hanks Balanced Salt Solution HBSS (Life Technologies, 14065072) supplémentée par 5 % de SVF (Sérum de Veau Fœtal décomplémenté) et 1% d'acide 4-(2-Hydroxyéthyl)-1-Pipérazine Ethane Sulfonique (HEPES) (Sigma-Aldrich, H3375). Après centrifugation (150g, 1min), le culot est resuspendu à l'aide d'une aiguille (4 G) puis filtré à travers une passoire. Les îlots sont ensuite séparés à l'aide d'un gradient de densité d'Histopaque (Sigma-Aldrich, 11191-6). A la fin de la séparation, les îlots sont prélevés à la main sous microscope (handpicking). Une fois récupérés, les îlots sont mis en culture dans du milieu RPMI 1640 Glutamax (Life Technologies, 61870044) supplémenté par 10% de SVF, auquel est ajouté 100 UI de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Life Technologies, 15140122) et 1 mM de sodium pyruvate (Life Technologies, 11360039), milieu RMPI complet.

Le protocole d'isolement d'îlots de souris est semblable à celui utilisé pour le rat.

La dispersion des cellules d'îlots de rats est réalisée après un nouveau « handpicking » suivi d'un lavage par une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline, Life Technologies, 14200083). Les cellules sont dispersées par de la trypsine-ETDA 0.5X (Life Technologies, 15400-054) à 37°C pendant environ 8 minutes. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de milieu RPMI complet. La suspension cellulaire est centrifugée (300g, 5min), puis le culot cellulaire est mis en suspension dans du milieu de culture. Le nombre de cellule obtenues est déterminé à l'aide d'une cellule de numération Neubauer, puis les cellules sontensemencées en fonction des différentes expériences prévues.

Les manipulations effectuées sur les îlots humains ont été réalisées au sein du laboratoire du Pr.Pattou (UMR 1190, Lille, France).

B. Lignées cellulaires

Les études sont effectuées sur les lignées cellulaires bêta pancréatiques de rat : INS-1E et de souris : MIN6, à des passages compris entre 20 et 30. Les cellules INS-1E sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 Glutamax supplémenté par 10 % de SVF, auquel est ajouté 100 UI de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, 1 mM de sodium pyruvate et 50 µM de bêta mercapto-éthanol (Life Technologies, 31350010). Les cellules Min6 sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium. Life Technologies, 31966047) supplémenté par 10% de SVF auquel est ajouté 100 UI de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine et 50 µM de bêta mercapto-éthanol.

C. Transfection des cellules

L'extinction de l'expression de DLK et JNK3 se fait par transfection de siRNA. Cette méthode consiste à intégrer des séquences nucléotidiques complémentaires d'un ARN messenger dans des cellules. Celles-ci vont alors se lier à un complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui va dégrader l'ARNm cible.

La transfection des siRNA est effectuée par l'intermédiaire du transfectant Lipofectamine® RNAimax (Life Technologies, 13778075). Brièvement, 24 heures après ensemencement, une solution de mix de transfection est ajoutée aux cellules.

Ce mix de transfection est réalisé selon les recommandations du fournisseur. Un siRNA contrôle (siGFP) est réalisé en parallèle, afin de ne pas prendre en compte la diminution d'expression de protéines due à la mort des cellules transfectées, ni les effets éventuels sur l'expression d'autres protéines.

Les séquences nucléotidiques des siRNA utilisés sont les suivantes

- siGFP (Microsynth) : 5' GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUG TT 3'
- siJNK3 (Microsynth) : 5' AGC GGA UGU ACU AGC UTT 3'
- siDLK (Microsynth) : 5' AUA CGA CGA UGU GGU GAA GAU CUC dTdT 3'

D. Traitement

Le traitement à l'exendine 4 (Sigma, E7144) se fait à une concentration de 50 nM dans du milieu RPMI complet.

Le traitement des cellules par le mix de cytokines se fait pendant 1 heure aux concentrations suivantes : Il-1 β (Sigma-Aldrich, I9401) à 10 nM, TNF α (Sigma-Aldrich, T6674) à 15 nM, IFN γ (Sigma-Aldrich, I3265) à 15 nM.

Les LDL plasmatiques (densité 1.063) et les HLD ont été préparés comme décrit dans la revue [151]. L'oxydation des LDL est faite par incubation d'une solution de LDL dans du PBS à 1 mg/ml et 5 μ M de CuSO₄ à 37°C durant 6 à 8 heures. L'oxydation des LDL est vérifiée par la détermination du contenu en lipides peroxydés et le degré d'oxydation est évalué par le taux d'électromobilité sur gel d'agarose. Une fois ces paramètres vérifiés, les cellules sont traitées par 2 mM de LDL-oxydées.

Le traitement des cellules par le 4-phenylbutyric acid (PBA, St.Louis, MO) se fait à une concentration de 2.5 mM pendant 48 heures. Le traitement des cellules par le N-acetylcystein (NAC, St.Louis, MO) se fait à 1mM et par de la thapsigargine (St.Louis, MO) à 1 μ M.

E. Test de sécrétion d'insuline

Les cellules dispersées d'îlots de rats sont ensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 80 000 cellules par puits soient 240 000 cellules/cm². Le test de sécrétion d'insuline est effectué 48 heures après les différentes transfections. Dans un premier temps une étape de bas glucose et de privation des cellules en SVF est effectuée. Cette étape s'effectue dans un tampon KREBS (127 mM NaCl (Dutscher, 91560), 4.7 mM KCl (Sigma-Aldrich, P9541), 1mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich, C5670), 1.2 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, P5655), 1.2 mM MgSO₄ (Sigma-Aldrich, M7506), 25mM HEPES, 5 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, S5761)) à 0.1 % de BSA (g/v) (Sigma-Aldrich, A4503). Les cellules sont ensuite exposées à différentes conditions dans le tampon KREBS à 0.1 % de BSA (g/v) durant 45 minutes, soit à du bas glucose (Sigma Aldrich, G7021) : 2 mM, soit à du haut glucose : 20 mM, soit à 10mM de leucine (Sigma Aldrich, L8000). Les surnageant sont prélevés et stockés à -80°C. Au final, le contenu intracellulaire est aussi récupéré par une lyse cellulaire effectuée à l'aide d'un tampon eau 23.5% - éthanol 75% (Sigma-Aldrich, 2860) -HCl 1.5%. (Sigma-Aldrich, 84415) à 4°C durant 16h. L'insuline est ensuite dosée par l'utilisation d'un kit ELISA Ultrasensitive Insulin Rat (Merckodia, 10-1250-01).

II. ANALYSE DU NIVEAU D'EXPRESSION GENIQUE

A. Extraction et dosage des ARN

Les ARN sont extraits par le kit RNeasy micro Kit (Qiagen, 74104). Tout d'abord, les cellules sont lysées dans le tampon QIAzol, puis du chloroforme (Sigma-Aldrich, C2432) est ajouté afin de permettre la séparation des phases. La phase aqueuse supérieure est récupérée et passée à travers la membrane « RNeasy minElute spin column » fixant les ARNs. Des lavages successifs de la membrane sont réalisés par les différents tampons du kit : RWT et RPE, puis par de l'éthanol 80% (v/v). L'élution des ARNs se fait par ajout d'eau Ultra Pure RNase DNase Free (Life Technologies, 10977049).

Afin d'estimer leur concentration et leur pureté, les ARNs sont dosés par spectrophotométrie UV à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Labtech, France).

B. Rétrotranscription

La rétrotranscription permet d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'ARN messenger. Une amorce poly dT (Roche, 11034731001) se fixe à la queue de poly A de l'ARNm et l'activité enzymatique d'une transcriptase inverse permet la synthèse de l'ADNc correspondant. Pour chaque échantillon, 1 µg d'ARN total a été rétrotranscrit selon les instructions du fournisseur (Invitrogen, 28025-013, 10216-018, 10217-016, 10218-014, 10219-012, 8080119). En parallèle un contrôle négatif de rétrotranscription est réalisé en remplaçant le volume d'ARN par de l'eau Ultra Pure RNase DNase Free. Le programme de rétrotranscription est le suivant : 5 minutes à 20°C, 60 minutes à 37°C, puis 10 minutes à 95°C.

C. PCR quantitative

La PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative est une technique qui permet de suivre en temps réel l'amplification d'une séquence d'ADN donnée. Un cycle de PCR est composé de trois étapes : la dénaturation du double brin d'ADN (5 seconde à 95°C), l'hybridation des simples brins d'ADN avec les amorces sens et anti-sens spécifiques (Tableau 2) (20 secondes à 60°C) et l'élongation du brin d'ADN (5 secondes à 72°C). Après activation de la Taq polymérase (30 seconde à 95°C), 40 cycles de PCR sont réalisés. La multiplication du nombre d'amplicons produits est suivie par la mesure directe de la fluorescence émise par le SYBR Green à chaque fin de cycle, à l'aide du thermocycleur CFX96 (BioRad, France). L

Le mix de PCR, réalisé selon les instructions du fournisseur (Bio-Rad, 1725275), contient : 25 ng d'ADNc et 250 nM de chaque amorce. En parallèle un contrôle négatif de la PCR quantitative est réalisé en remplaçant le volume d'ADNc par de l'eau Ultra Pure RNase DNase Free.

D. Quantification

La méthode utilisée pour la quantification des résultats est la méthode dite des $\Delta\Delta Ct$, qui est une méthode de quantification relative normalisée par un gène de contrôle.

La quantification repose sur les Ct (Cycle Threshold) qui correspondent aux nombres de cycles nécessaires pour atteindre un signal de fluorescence seuil. Plus le gène est exprimé, plus le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le signal seuil est faible.

Tout d'abord, une condition est définie comme étant la condition témoin puis le ΔCt est calculé par l'opération suivante : Ct d'un échantillon – Moyenne des Ct des échantillons de la condition témoin. Le $\Delta\Delta Ct$ est alors calculé de la manière suivante : ΔCt gène d'intérêt – ΔCt gène de contrôle.

Le $\Delta\Delta Ct$ permet le calcul des quantités relatives par l'opération suivante : 2 puissance ($-\Delta\Delta Ct$). Par cette méthode, la moyenne des quantités relatives de l'ensemble des échantillons de la condition témoin est supposée valoir 1 cependant la variation inter-échantillon au sein du groupe peut amener des variations. La condition témoin est fixée à une valeur de 1 et la valeur de chaque échantillon est ainsi normalisée par rapport à cette condition. Ensuite la moyenne des quantités relatives des différents échantillons d'une même condition est calculée ainsi que les SEM.

III. ANALYSE DES PROTEINES

A. Technologie du PAMGENE

L'analyse du kinome d'îlots de rats a été effectuée grâce au kit Serine Threonine Kinase (STK) de la technologie PamGene International BV. 144 séquences peptidiques différentes, chacune contenant un motif sérine/thréonine et corrélée à une ou plusieurs kinases, sont fixées à l'intérieur des pores tapissant une membrane placée au fond de chaque puits d'une puce STK. Ces peptides sont regroupés en « cluster » selon leurs séquences. La Pamstation 12 (Pamgene

International BV), grâce à un système de pompe, fait traverser l'échantillon à travers les pores de la membrane de manière cyclique, permettant ainsi aux kinases actives de phosphoryler leurs peptides cibles. Cette réaction nécessite de l'ATP présent dans le mix. Les peptides phosphorylés sont ensuite détectés par un anticorps anti-rabbit-FITC reconnaissant un pool d'anticorps anti-phospho sérine-thréonine. L'appareil contient une caméra 12-bit CDD permettant la lecture de la fluorescence. Les images obtenues des puces phosphorylées sont quantifiées par le logiciel BioNavigator (Pamgene International BV) et la liste des peptides dont la phosphorylation est significativement différente entre les conditions analysées sont téléchargée sur GeneGo pour l'analyse des signalisations.

Les protéines d'îlots isolés de rats ont été extraites à l'aide du tampon d'extraction « M-PER mammalian » (Thermo Scientific, 78503) complété en antiprotéases (Thermo Scientific, 87785) et antiphosphatases (Thermo Scientific, 78720) durant 20 minutes sur glace. Les lysats ont ensuite été centrifugés et les surnageants sont récupérés, aliquotés et stockés à -80°C. 2 µg de protéines de chaque échantillon ont été déposés avec une concentration finale d'ATP de 400nM.

B. Technique immunologique

1. Immunohistochimie

Les pancréas de rats âgés de 10 jours sont récupérés et fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (Sigma-Aldrich, 47608). Les pancréas sont ensuite envoyés au service histologique de la faculté de médecine - pôle recherche, la plate-forme Bi-Cel, pour inclusion en paraffine et conditionnement sur lame.

Les coupes vont d'abord être déparaffinées par 2 bains de xylène de 10 minutes suivis d'un enchainement de bains d'éthanol de 100 % à 50 % (v/v). Après le déparaffinage, les lames sont mises en contact avec une solution de citrate de sodium chauffée pour l'étape dite de « récupération d'épitopes induites par la chaleur ». Les coupes de pancréas sont perméabilisées par du triton X-100 (Dutscher, 91584) 0.1% durant 15 minutes et les sites aspécifiques sont bloqués par du « protein block » (Diagomics, E17-100) durant 15 minutes. Les anticorps primaires sont

incubés à 4°C pendant 16h, puis après plusieurs lavages au PBS, les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome sont à leur tour incubés 1 heure à 4°C. Le montage des lamelles est réalisé à l'aide d'un kit de montage contenant du DAPI (Vectashiled. Eurobio-Ingen, H-1200). Un microscope confocal est utilisé pour l'observation et la prise de photographie. Le détail d'utilisation des anticorps est précisé dans le tableau 3.

2. Test de prolifération : Ki67

Le cycle cellulaire s'effectue via l'enchaînement de quatre phases : G1, S, G2 et M. Les techniques mesurant la prolifération cellulaire consistent principalement à mesurer la présence des protéines impliquées dans ces différentes phases du cycle. Ici, la prolifération est détectée via la mesure du Ki67 [222]. Cette protéine est présente dans les noyaux des cellules prolifératives mais n'est pas exprimée dans les cellules quiescentes.

Les cellules dispersées d'îlots de rats sontensemencées sur des lamelles pré-traitées à la poly-lysine dans des plaques 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits soit 52 000cellules/cm². Une fois les traitements effectués, les lamelles sont rincées au PBS puis les cellules sont fixés par ajout de méthanol froid 10 minutes à -20°C. Après perméabilisation des cellules par une solution de PBS-Saponine 5mg/mL (Sigma-Aldrich, 84510) pendant 15 minutes à température ambiante, une solution de PBS-Saponine 1% Bovine Serum Albumine (BSA) (Sigma-Aldrich, A4503) est ajoutée durant 30 minutes afin de bloquer les sites aspécifiques. Les anticorps primaires sont ensuite ajoutés durant 1 heure dilués aux concentrations requises dans du PBS-Saponin-1%BSA. Après trois lavages au PBS, les anticorps secondaires dilués dans une solution d'eau-1%BSA sont déposés sur les cellules. Le montage des lamelles se fait à l'aide d'un kit de montage contenant du DAPI (Vectashiled. Eurobio-Ingen, H-1200). Les lamelles sont ensuite lues par l'Axioscan (ZEISS), un scanner de lames motorisé, puis analysées en collaboration avec la plateforme BiCel. Le détail d'utilisation des anticorps est précisé dans le tableau 3.

3. Technique du TUNEL

La technique du TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) permet de détecter les cellules apoptotiques en repérant la fragmentation de l'ADN. La fragmentation de l'ADN fait partie des premières étapes de l'apoptose et est caractérisée par la présence d'extrémité 3'OH libres de l'ADN. Ainsi, cette méthode consiste à marquer ces extrémités. Brièvement, les cellules fixées et perméabilisées sont incubées avec le mélange de réaction du kit contenant les terminal-deoxynucleotidyl-transferases (TdT) et le TMR-d-UDT (Terminal Red) conjugué à de la fluorescéine. Durant la réaction, les TdT catalysent l'addition de groupe TMR-dUTP aux extrémités 3'-OH libres sur les doubles et simples brins d'ADN. La technique du TUNEL est réalisée à l'aide du kit In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche, 12156792910).

Les cellules dispersées d'îlots de rats sontensemencées sur des lamelles pré-traitées à la poly-lysine dans des plaques 24 puits à raison de 100 000 cellules par puits soit 52 000cellules/cm². Une fois les traitements effectués, les lamelles sont rincées au PBS puis les cellules sont fixées pendant 1 heure dans une solution de PFA 4% à température ambiante puis perméabilisées à l'aide d'une solution de triton X-100 (0.5% v/v, Dutscher, 91584). Le marquage TUNEL est réalisé selon les recommandations du fournisseur. Les lamelles sont montées grâce au kit Vectashield contenant du DAPI puis scannées par l'Axioscan (ZEISS). L'analyse est réalisée en collaboration avec la plate-forme BiCel.

4. Technique du western blot

a. Extraction des protéines totales

Après grattage des cellules dans du PBS et centrifugation de la suspension cellulaire (300g, 5min, 4°C). Le culot cellulaire est repris dans un tampon de lyse (20mM Tris Aceta Sigma-Aldrich, - 0.27M Sucrose Sigma-Aldrich, S9378 – 1% Triton X-100 Dutscher, 91584 – 1mM EDTA Sigma-Aldrich, E6758 – 1mM EGTA Sigma-Aldrich, 03777 – 50mM Sodium Fluoride Sigma-Aldrich, S7920 – 10mM BetaGlycérophosphate Sigma-Aldrich, G5422) complété extemporanément par 1mM DTT (Invitrogen, 707265ML), des antiprotéases (Roche, 11836170001) et

antiphosphatases (Roche, 4906837001) . Après une incubation de 30 minutes sur glace, la suspension est centrifugée (16000g, 15min, 4°C). Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

b. Dosage protéique

Le dosage des protéines se fait selon la méthode de Bradford, une technique colorimétrique. Le réactif de Bradford contient du bleu de Coomassie dont l'absorbance maximale passe de 470nm à 595nm lorsqu'il est lié aux acides aminés basiques des protéines. Cette coloration est proportionnelle à la quantité de colorant lié donc à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. La concentration protéique est déterminée après lecture de l'absorbance à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (BioRad-lmark, France), par comparaison à une gamme étalon de BSA réalisée en parallèle.

c. Immunoprécipitation

Pour l'immunoprécipitation la lyse cellulaire s'effectue dans un tampon de lyse (Tris-Hcl 20 mM, NaCl 137 mM, Glycérol 10 %, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM). Après dosage des protéines, 2 mg de protéines sont mis au contact de billes magnétiques sous rotation à 4°C durant 30 minutes, étape dite de « preclearing ».

L'échantillon protéique est ensuite récupéré et mis au contact d'1 µg de solution d'anticorps durant une nuit. Puis des billes magnétiques (25 µl par conditions) sont ajoutées pendant 90 minutes à 4°C sous rotation. Après plusieurs lavages successifs les billes sont récupérées est du tampon Laemmli est ajouté, les billes sont ensuite chauffées 5 minutes à 95°C (Paragraphe III.C.d).

d. Western Blot

Le Western Blot est une technique permettant l'identification spécifique d'une protéine au sein d'un échantillon, en fonction de son poids moléculaire et via un marquage immunochimique. Cette technique comporte deux étapes. La première étape consiste à séparer les protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide par la technique de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La deuxième étape consiste à transférer les protéines du gel de

séparation vers une membrane de nitrocellulose qui permettra le marquage immunochimique.

La séparation des protéines s'effectue grâce à un gel de concentration (Acrylamide 4% (Dutscher, 091511), Tris 125mM (Dutscher, 091572), SDS 0.04% (Sigma, L3771), Amonium Persulfate 0.08% (Sigma, A9164), Temed 0.004% (Dutscher, 91574)) et d'un gel de séparation (Acrylamide 10%, Tris 375mM, SDS 0.2%, APS 0.1% et Temed 0.05%). Par échantillon, 30 µg de protéines mélangées à du tampon Laemmli (Alfa Aesar, J60015) et préalablement dénaturée 5 minutes à 95°, sont déposées. La migration est réalisée dans un tampon Tris-Glycine-SDS (Eurobio-Ingen, 51-11-02).

Le transfert est réalisé en milieu humide vers une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, 1620112) en tampon Tris-Glycine (Eurobio-Ingen, 51-10-02). Les incubations suivantes s'effectuent en tampon TBST : Tris-Buffered-Saline Tween 20 (Tris 50mM, 0.9% NaCl (Dutscher, 91560), 0.1% Tween 20 (Dutscher, 91585)). Les sites aspécifiques de la membrane sont bloqués par une incubation d'une heure sous agitation à température ambiante en tampon TBST complété par 5% de lait écrémé (Dutscher, 711160) Puis, la membrane est incubée une nuit à 4°C sous agitation dans une solution contenant l'anticorps primaire. Ensuite, la membrane subit 3 lavages de 10 minutes et est incubée avec l'anticorps secondaire. Après cette incubation, la membrane est à nouveau lavée 3 fois avant la lecture. Les conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires sont précisées dans le tableau 3. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un fluorophore 700 ou 800nm. La lecture est réalisée par un lecteur infra-rouge Odyssey de Li-Cor. Le détail d'utilisation des anticorps primaires et secondaires est précisé dans le tableau 3.

ANTICORPS	FOURNISSEUR	REFERENCE	CONDITIONS
DLK	Genetex	GTX124127	1/1000 ^e – TBST 5% BSA
Insulin	DAKO	A0564	1/100 ^e – PBS
Glucagon	Sigma-Aldrich	G2654	1/100 ^e - PBS
Ki67	Abcam	Ab15580	1/700 ^e – PBS-Saponin-1%BSA
Alexa Fluor 488nm Goat anti mouse IgG (H+L)	Life-Technologies	R37120	1/500 ^e – Eau-1%BSA
Alexa Fluor 594nm Goat anti mouse IgG (H+L)	Life-Technologies	R37121	1/500 ^e – Eau-1%BSA
Alexa Fluor 488nm Goat anti guinea-pig IgG (H+L)	Life-Technologies	A11073	1/500 ^e – Eau-1%BSA
Alexa Fluor 594nm Goat anti guinea-pig IgG (H+L)	Life-Technologies	A11076	1/500 ^e – Eau-1%BSA
α -Tubulin	Sigma-Aldrich	T5168	1/5000 ^e – TBST 5% lait
P-JNKs	Cell-Signaling	#4671	1/1000 ^e – TBST 5% BSA
JNKs	Cell-Signaling	#9252	1/1000 ^e – TBST 5% BSA
JNK3	Cell-Signaling	#2305	1/1000 ^e – TBST 5% BSA
Anti rabbit IRDye 800	Rockland Immunochemicals	611-745-127	1/5000 ^e – TBST 5% lait
Anti mouse IRDye 700	Rockland Immunochemicals	18-4417-32	1/5000 ^e – TBST 5% lait

Tableau 3 : Liste des anticorps

Les anticorps des protéines du réticulum endoplasmique sont décrits dans la revue : [221].

RESULTATS

I. ETUDE DU ROLE DES SERINE-THREONINE KINASES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LE MAINTIEN DE LA MASSE DE CELLULES BETA PANCREATIQUES

A. Contexte général de l'étude

L'équipe du Pr Regazzi à Lausanne s'est intéressée à la modulation des mécanismes régulant le développement de la masse de cellules bêta pancréatiques durant la période postnatale [38]. C'est dans ce cadre qu'ils ont comparé le transcriptome d'îlots de rats adultes et d'îlots de rats nouveau-nés, plus précisément de rats âgés de 10 jours, ces derniers ayant, à ce stade, le taux de prolifération de cellules bêta le plus élevé [38]. Cette étude transcriptomique a permis de mettre en évidence une régulation positive de nombreux gènes. Dans le top des gènes régulés positivement dans les îlots de rats âgés de 10 jours, on retrouve au premier plan une augmentation significative de l'expression d'une sérine-thréonine kinase qui est DLK. Ce résultat suggère un rôle important de DLK dans le développement et la fonction des îlots immatures.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris l'étude du rôle de l'expression de DLK dans le développement postnatal des îlots de Langerhans et plus précisément de la masse fonctionnelle bêta pancréatique.

Les résultats obtenus sont présentés dans un article soumis pour publication, dont je suis la première auteure. Cette article est intitulé « The mitogen-activated protein kinase Map3k12 (Dlk) is required for pancreatic beta-cell proliferation during postnatal development, pregnancy and obesity ».

B. Rôle de la Dual Leucine Zipper Kinase, DLK, dans le développement postnatal

1. Expression de DLK dans les îlots pancréatiques en période postnatale

Dans un premier temps nous avons cherché à savoir dans quels types cellulaires de l'îlot de Langerhans de rats nouveau-nés DLK est exprimé. Pour ce faire, nous avons réalisé des immunomarquages sur des coupes de tissus pancréatiques de rats âgés de 10 jours à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines DLK, insuline et glucagon. Le co-marquage de l'insuline et de DLK confirme ainsi la présence de DLK dans les cellules bêta pancréatiques de rats nouveau-nés (Figure 16 A). De plus, la protéine DLK n'est pas co-marquée avec le glucagon, DLK ne semble donc pas exprimée au sein des cellules alpha pancréatiques chez les rats nouveau-nés. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de marquage DLK dans d'autres types cellulaires que les cellules bêta, ce qui montre ainsi une spécificité de l'expression de cette sérine-thréonine kinase aux cellules bêta (Figure 16 A et B). Les mêmes profils de marquage ont été observés chez le rat adulte (Figure 16 C et D).

D'autres part, sachant que la localisation de DLK est liée à sa fonction cellulaire, nous avons cherché à mettre en évidence sa localisation dans des cellules d'îlots de rats nouveau-nés (Figure 16 A). Nous avons observé que dans les îlots de rats, l'expression de DLK est exclusivement cytosolique (Figure 16). Une étude montre qu'une expression cytosolique de DLK est bénéfique pour la cellule contrairement à une expression nucléaire qui est néfaste pour les cellules bêta [220].

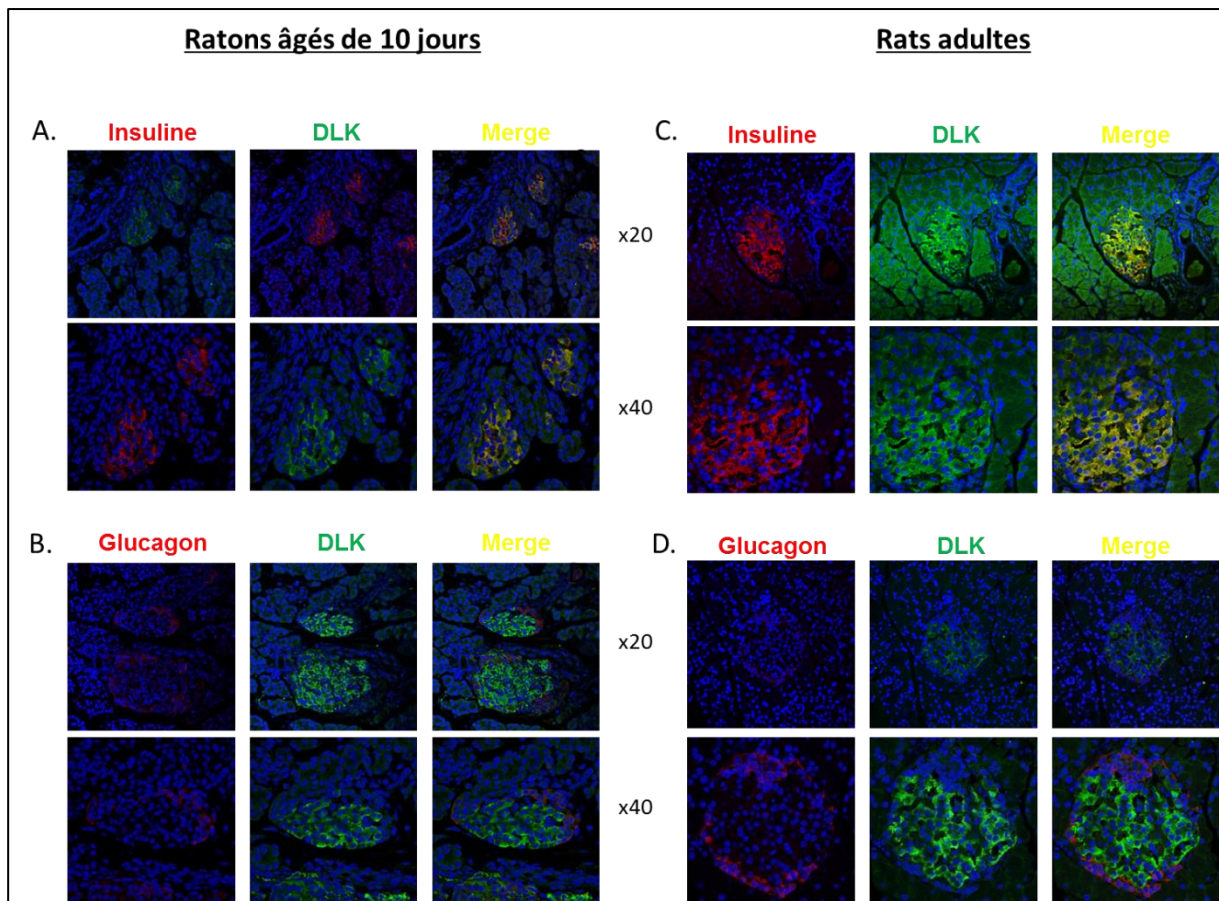


Figure16 : Expression de la protéine DLK dans des îlots de ratons âgés de 10 jours.

Des pancréas de ratons âgés de 10 jours (A, B) et de rats adultes (C, D) ont été prélevés, fixés et inclus dans de la paraffine puis des coupes ont été réalisées. Des immunohistochimies ont été effectuées à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre les protéines DLK, Insuline (A,C) et glucagon (B,D) et d'anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires et fluorescents dans le vert et dans le rouge. Les protéines insuline et glucagon sont marquées en rouge et la protéine DLK est marquée en vert. Gauche : Chez le raton, Droite : Chez l'adulte. Les images sont fusionnées (Merge en jaune) permettant de montrer une potentielle co-localisation. Les noyaux des cellules sont marqués par du DAPI (Bleu).

Par la suite, nous avons vérifié l'expression de DLK par PCR quantitative dans les îlots de ratons durant la période postnatale ainsi que dans des îlots de rats adultes. Nous avons alors quantifié l'expression de l'ARNm de *Dlk* dans des îlots de rats âgés de 1, 6, 10, 20 et 32 jours. Nous montrons que l'expression de DLK augmente significativement et d'un facteur de 3.5 à partir de 6 jours post-naissance, ce phénomène étant encore visible à 10 jours post-naissance (Figure 17). Nous observons également que son expression diminue fortement à 20 jours, ceci correspondant à la période de sevrage (Figure 17).

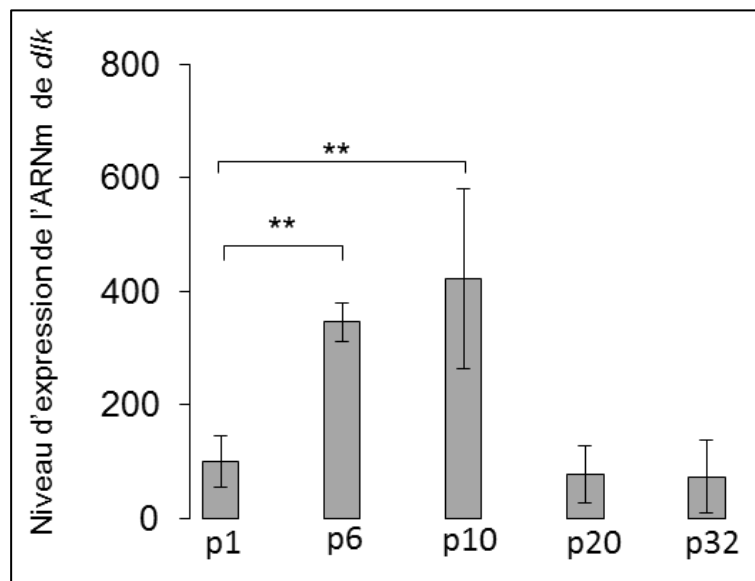


Figure 17 : Expression du gène *Dlk* durant le développement postnatal chez le rat.

Des îlots de rats à différents âges (1, 6, 10, 20 et 32 jours) ont été isolés. Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Dlk* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « p1 ». Les données sont la moyenne ± SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. **p<0,01. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

Ces données confirment les résultats de l'analyse transcriptomique. Ils semblent indiquer que l'expression de DLK est transitoirement régulée en période postnatale, confortant donc un rôle de cette MAP3K dans le développement de la masse des cellules bêta pancréatiques durant cette période.

2. Rôle de DLK dans la prolifération et l'apoptose des cellules bêta pancréatiques en période postnatale

Durant la période postnatale, la masse de cellules bêta pancréatiques subit un remodelage afin d'obtenir une masse de cellules fonctionnelles et adéquates chez l'adulte [25], [37]. Ce remodelage consiste essentiellement en l'augmentation de cette masse de cellule bêta qui peut se faire par différents mécanismes connus que sont la néogenèse et la prolifération cellulaire [37]. Des mécanismes d'apoptose interviennent également dans la construction de cette masse de cellules bêta [25]. Nous avons entrepris l'étude du rôle de DLK dans les principaux processus cellulaires mis en œuvre par la cellule bêta immature en période postnatale chez le raton : la prolifération, l'apoptose ainsi que la sécrétion d'insuline. Dans ce but, nous avons modulé l'expression de DLK par un knock-down (siRNA) dans des cellules d'îlots de rats nouveau-nés puis nous avons observé l'impact de l'extinction obtenue sur la fonctionnalité des cellules bêta.

Brièvement, des îlots de Langerhans de rats âgés de 10 jours ont été isolés puis les îlots ont été dissociés pour obtenir des cellules isolées, ceci dans le but d'optimiser la transfection. Ces cellules dispersées ont été transfectées par un siRNA dirigé contre l'ARNm du gène *Dlk* (siDLK) ou contre l'ARNm du gène de la GFP (siCtl) en tant que contrôle de transfection. L'efficacité d'extinction de l'expression de DLK a été vérifiée par PCR quantitative, où nous montrons que l'expression de l'ARNm de *Dlk* diminue significativement d'environ 50% (Figure 15 A). L'efficacité du siDLK a aussi été testée par western-blotting, nous observons ici une diminution de la quantité protéique de DLK (Figure 18 B).

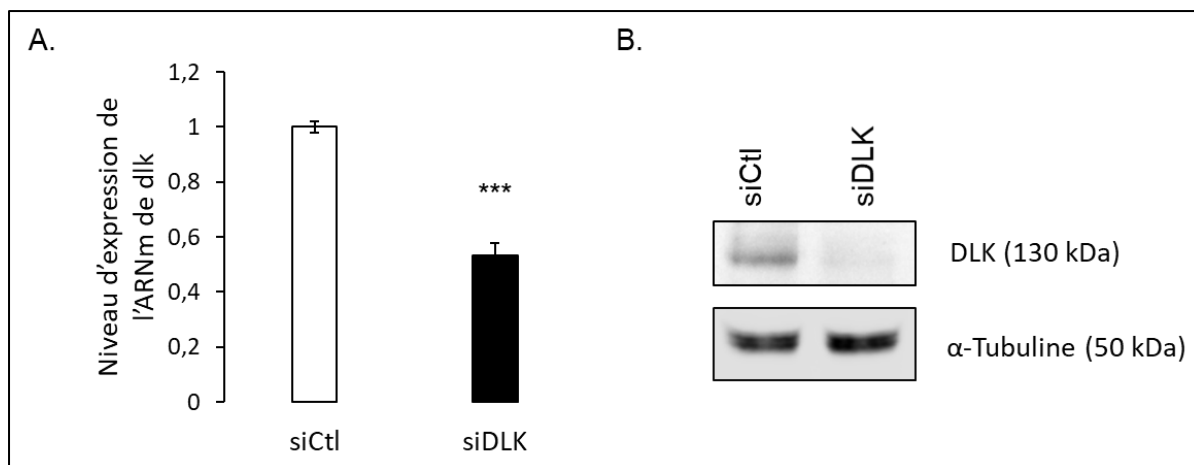


Figure 18 : Efficacité des siRNA dirigés contre les ARNm du gène *Dlk*.

Les cellules dispersées d'îlots de rats âgés de 10 jours ont été transfectées par des siRNA dirigés contre l'ARNm du gène *Dlk* (siDLK) ou contre l'ARN du gène *gfp* (siCtl). A. Après 48h de transfection, les ARN issus de ces cellules ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Dlk* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Tbp*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « siCtl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney $***p < 0,001$. B. Après 48h de transfection, les protéines des cellules dispersées sont extraites, séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines DLK et α -Tubuline.

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de l'extinction de DLK sur la prolifération des cellules bêta. Pour cela, nous avons réalisé des immunocytochimies à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine ki67, marqueur de la prolifération cellulaire et d'anticorps dirigés contre la protéine insuline, marqueur de la cellule bêta. Le nombre de cellules co-marquées par l'insuline et par le ki67 indique le nombre de cellules bêta qui prolifèrent [222]. Nous observons que le nombre de cellules positives à l'insuline et au ki67 est nettement et significativement réduit dans les cellules dispersées transfectées par le siDLK en comparaison avec celles transfectées par le siCtl, en effet nous observons une diminution de 80 % de la prolifération des cellules bêta dans la condition siDLK en comparaison avec la condition siCtl (Figure 19 A). Ce résultat confirme ainsi un rôle de DLK dans la prolifération des cellules bêta pancréatiques durant le développement postnatal.

Par la suite, nous avons déterminé le niveau d'apoptose dans ces cellules bêta dispersées puis transfectées par le siDLK. Pour ce faire, la technique du tunnel a été utilisée. Cette technique repère les cassures d'ADN présentes dans les cellules apoptotiques. Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative du taux basal d'apoptose entre les cellules bêta transfectées par le

siDLK et les cellules bêta transfectées avec le siRNA contrôle (Figure 19 B).

Pour valider ces résultats sur le rôle de DLK, nous avons mesuré l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes connus pour être impliqués dans la prolifération et l'apoptose des cellules dispersées d'îlots de rats âgés de 10 jours. L'expression de ces gènes a été mesurée par PCR quantitative. Les résultats de ces PCR montrent que les niveaux d'ARNm des gènes du cycle cellulaire *Ccnd2*, *Ccnd1*, *Cdk4*, *Cdkn2a* et *Cdkn2c* sont significativement plus faibles dans les cellules dispersées invalidées pour le gène de *Dlk* en comparaison avec les cellules transfectées avec le siRNA contrôle (Figure 19 C). De plus, aucune variation n'est observée dans les niveaux des ARNm des gènes impliqués dans les mécanismes d'apoptose tels que *Fos*, *Jun* et *Bcl2* (Figure 19 C). En somme, le « knock-down » de DLK semble diminuer l'expression de gènes modulant la prolifération des cellules bêta en période postnatale, tels que *Ccnd1* et *Ccnd2* mais ne semble pas modifier l'expression de gènes importants dans les mécanismes apoptotiques, ce qui appuie ainsi les résultats obtenus précédemment.

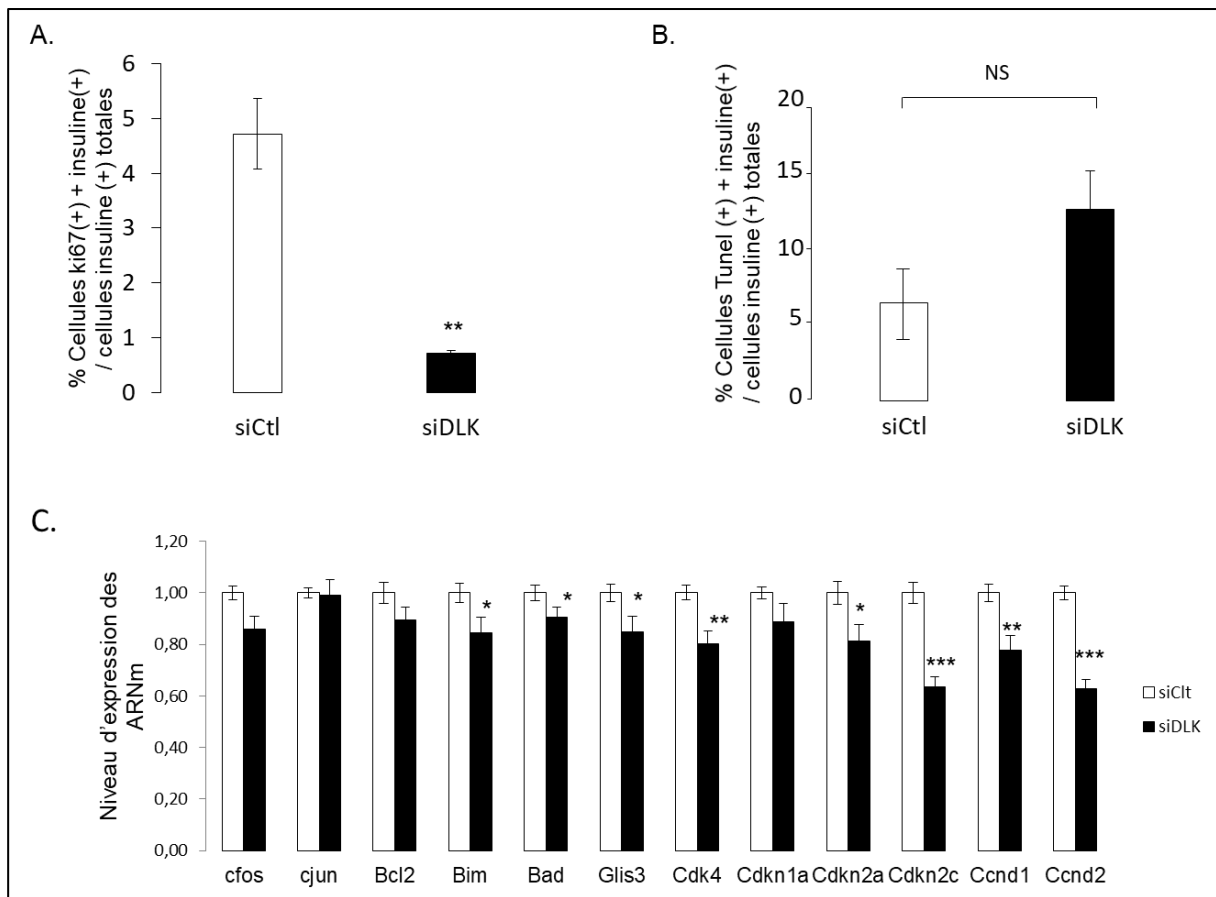


Figure 19 : Rôle de DLK dans la prolifération des cellules bêta d'îlots de ratons âgés de 10 jours.

Les cellules dispersées d'îlots de ratons âgés de 10 jours ont été transfectées par des siRNA dirigés contre l'ARNm du gène *Dlk* (siDLK) ou contre l'ARN du gène *gfp* (siCtl). Après 48 heures de transfection : A. la prolifération des cellules bêta a été étudiée par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines Insuline et Ki67. La prolifération des cellules bêta est quantifiée par la détermination du pourcentage de cellules positives à l'insuline et au Ki67. B. l'apoptose des cellules bêta a été étudiée par immunocytochimie par la technique du TUNEL. La mort des cellules bêta est quantifiée par détermination du pourcentage de cellules positives à l'insuline et au TUNEL. C. les ARN issus des cellules ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm des gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Tbp*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « siCtl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 4 (A et B) et 5 (C) expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3. Etude de l'effet de DLK sur un modèle de souris invalidées pour le gène *Dlk*

En 2002, un laboratoire japonais a développé un modèle de souris invalidées pour le gène *Dlk* (*Dlk*^{-/-}) dans le but d'étudier son impact sur le développement neuronal [216]. Ils ont observé que les souris *Dlk*^{-/-} n'étaient pas viables à la naissance cela étant dû à des troubles de développement du cerveau.

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr. Hirai, nous avons pu obtenir des coupes de pancréas d'embryons de souris de 19 jours invalidées pour le gène *Dlk* et de souris contrôles. Nous avons réalisé sur ces coupes de pancréas des immunofluorescences afin de quantifier le nombre de cellules bêta et alpha en utilisant respectivement des anticorps dirigés contre l'insuline et le glucagon. Nous avons observé que le nombre de cellules positives à l'insuline est significativement réduit dans les embryons de souris invalidées pour le gène *Dlk* (Figure 20). Ces résultats confortent encore le rôle de DLK dans le développement de la masse de cellules bêta *via* le phénomène de prolifération comme cela a été montré précédemment.

Par ailleurs nous n'avons pas observé de modification de la masse de cellules alpha dans les souris *Dlk*^{-/-} en comparaison avec les souris contrôles, ceci étant corrélé à un rôle spécifique de DLK dans les cellules bêta pancréatique car nous avons également montré que ce gène est spécifiquement et uniquement exprimé dans ce type cellulaire pancréatique (Figure 20 et 16).

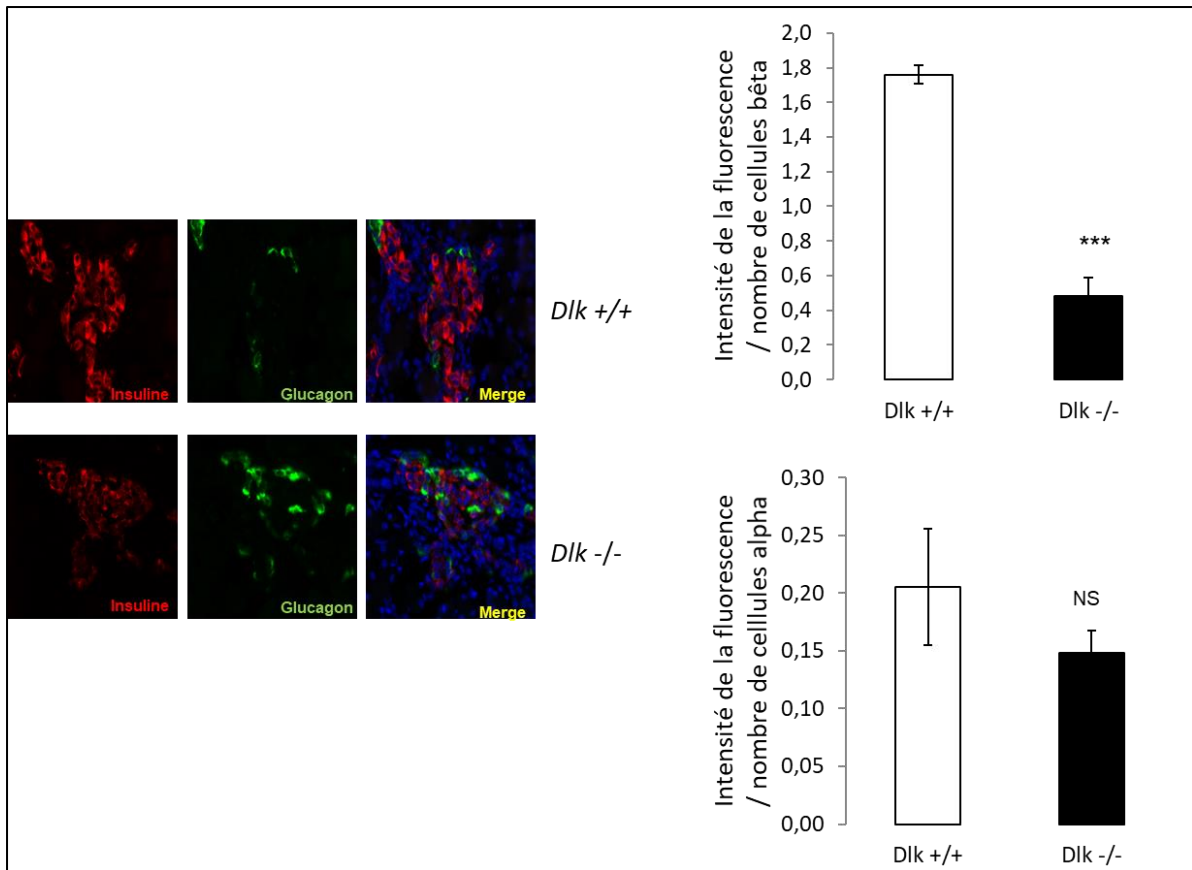


Figure 20 : Etude de la masse de cellules bêta dans des embryons de souris invalidées pour le gène *Dik*.

Des immunohistochimies ont été réalisées sur des coupes d'embryons de 19 jours issus de souris invalidées pour le gène *Dik* (*Dik -/-*) et de souris contrôle (*Dik +/+*). Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre les protéines insuline et glucagon et d'anticorps secondaires fluorescents dans le vert pour le glucagon et dans le rouge pour l'insuline. L'intensité de la fluorescence (quantifiée par surface des cellules) a été mesurée et rapportée au nombre de cellules alpha et bêta. Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney *** $p < 0,001$

4. Etude du rôle de DLK dans la sécrétion d'insuline par les cellules bêta immatures

La fonction principale de la cellule bêta pancréatique étant la sécrétion d'insuline, nous avons étudié le rôle de DLK dans cette sécrétion chez le rat nouveau-né. La capacité de ces cellules à sécréter de l'insuline en réponse au glucose est très faible [64]. En effet, les principaux gènes impliqués dans l'expression et la sécrétion d'insuline ne sont pas ou peu exprimés dans les cellules bêta immatures [67].

Pour déterminer le rôle de DLK dans ce mécanisme de sécrétion, nous avons dispersé des cellules d'îlots de rats âgés de 10 jours puis nous avons transfecté ces cellules par le siDLK ou et le siCtl et nous avons procédé à des tests de sécrétion d'insuline en réponse au glucose ainsi qu'à la leucine.

Premièrement nous n'avons pas observé de différence en termes de quantité d'insuline intracellulaire entre les cellules transfectées par le siCtl et les cellules transfectées par le siDLK (Figure 21 A). DLK ne semble donc pas être impliqué dans la régulation de l'expression de l'insuline. D'autre part, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'est pas impactée à la suite de l'invalidation de l'expression de DLK (Figure 21 B). Dans les deux cas la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est multipliée significativement par un facteur 2. Finalement et de façon intéressante, nous avons observé que les cellules dans lesquelles l'expression de DLK a été significativement diminuée ne répondent pas à la leucine et cela en comparaison avec les cellules contrôles qui sécrètent de l'insuline en réponse à la leucine. En effet, dans la condition contrôle, la sécrétion d'insuline augmente, passant d'environ 5 % à 9 % d'insuline sécrété (pourcentage en fonction du contenu en insuline), alors que dans la condition siDLK, aucune variation du pourcentage d'insuline sécrétée n'est observée (Figure 21 C). De plus, nous avons mesuré l'expression de différents gènes importants impliqués dans la sécrétion d'insuline dans la cellule bêta. Parmi les différentes expressions mesurées, nous n'observons pas de différences du niveau d'ARNm dans les cellules dispersées transfectées par le siDLK en comparaison avec les cellules contrôles (Figure 21 D).

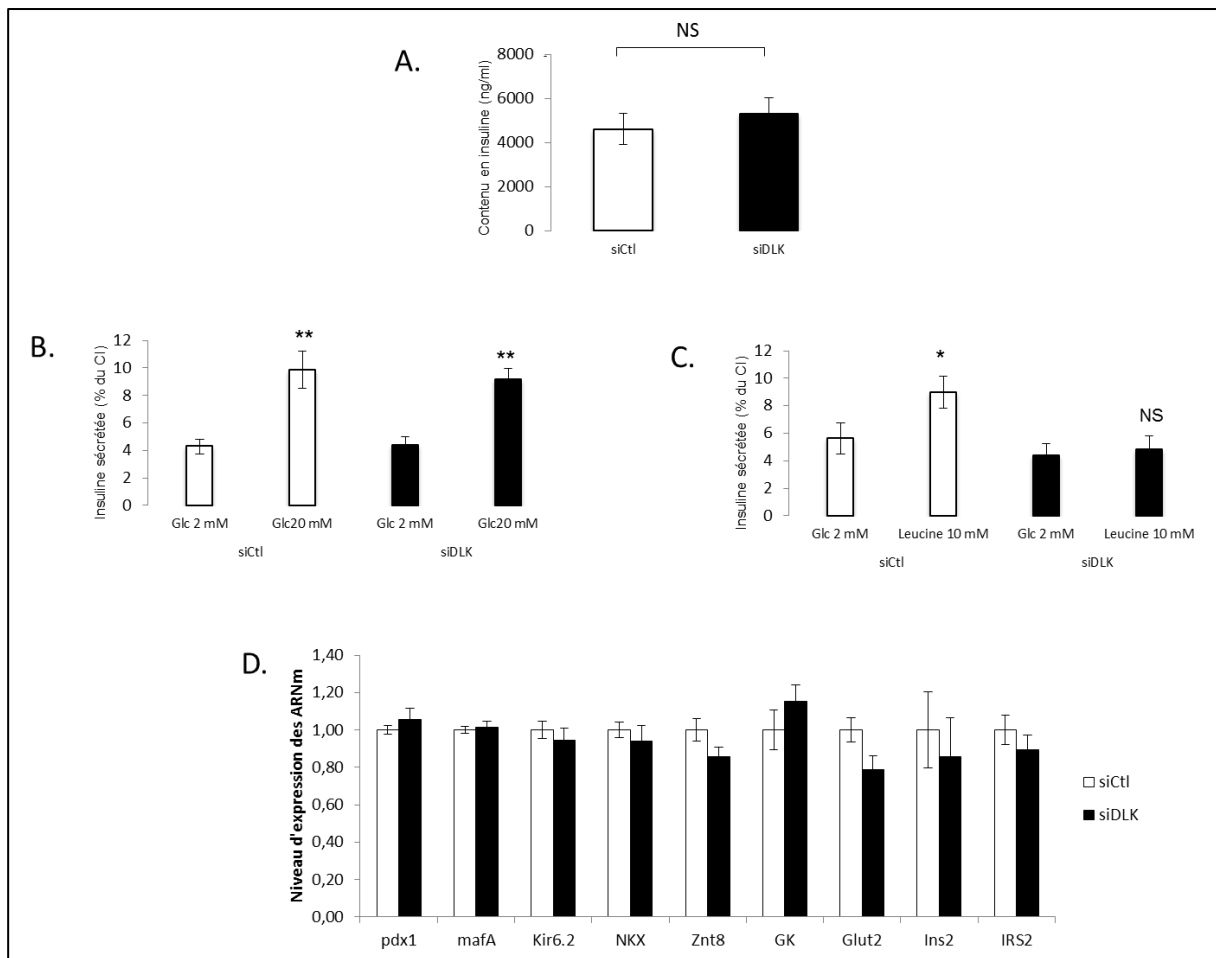


Figure 21 : Rôle de DLK dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et à la leucine dans des cellules dispersées d'îlots de rats âgés de 10 jours.

Les cellules dispersées d'îlots de rats âgés de 10 jours ont été transfectées par des siRNA dirigés contre l'ARNm du gène *Dlk* (siDLK) ou contre l'ARN du gène *gfp* (siCtl). A, B, C : Après 48 heures de transfection, un test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et à la leucine est réalisé. Après 45 minutes de privation en SVF et en glucose, les cellules dispersées sont soumises à différentes conditions : glucose (Glc 2mM ou Glc 20 mM) (B) ou de la leucine (Leucine 10 mM) (C). Puis l'insuline sécrétée ainsi que le contenu en insuline (A) des cellules est déterminé par un test ELISA. D. Après 48h de transfection, les ARN issus de ces cellules ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative, Le taux d'expression des ARNm des gènes mesurés ici sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Tbp*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « siCtl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 4 (A, B), 3 (D) et 2 (C) expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney (C) ou par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's (A, B et D). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

C. Etude de la signalisation de DLK en période postnatale : Rôle de JNK3

1. Identification des sérine-thréonine kinases activées dans des îlots de rats nouveaux nés

DLK est une MAP3K, elle est donc en amont d'un complexe impliquant une MAP2K, une MAPK et une protéine d'échafaudage. DLK est responsable de l'activation de différentes sérine-thréonine kinases.

Nous avons étudié les sérine-thréonine kinases actives dans des îlots de rats nouveau-nés et dans des îlots de rats adultes. Pour cela, nous avons utilisé la technologie du Pamgene. Cette technologie détermine quelles sont les kinases actives à travers des séquences peptidiques contenant des sites de phosphorylations connus. Ici, le Pamgene nous a permis de comparer l'activation des sérine-thréonine kinases entre des îlots de rats adultes et de rats nouveau-nés et de vérifier l'activation des cibles connues de DLK.

Nous avons par cette méthode identifié 25 sérine-thréonine kinases dont l'activité est plus élevée dans les îlots des rats nouveau-nés âgés de 10 jours en comparaison avec des îlots de rats adultes. Parmi ces kinases on retrouve au top de la liste, les mapk dont les cibles de DLK, les JNKs, JNK1, JNK2 et JNK3 (Figure 22).

Ainsi, l'activité des cibles de DLK est plus élevée durant le développement postnatal au sein de la cellule bêta pancréatique que chez les adultes.

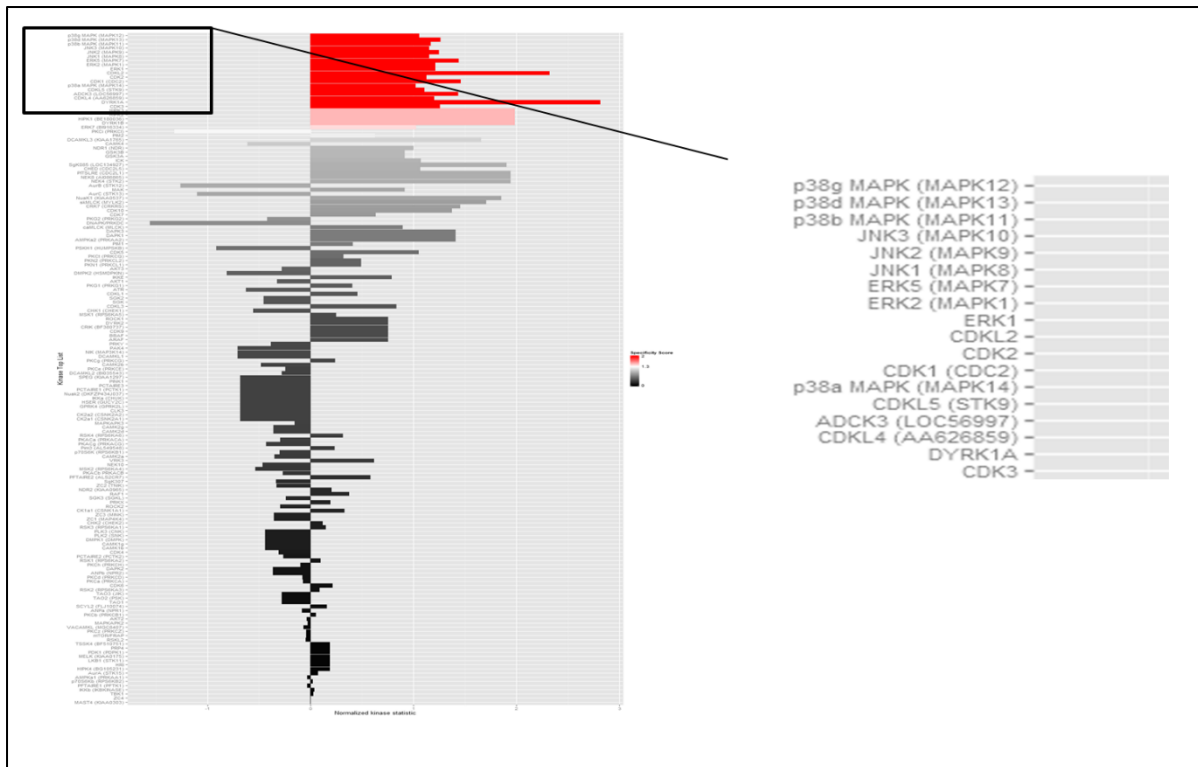


Figure 22 : Etude de l'activation des sérine-thréonine kinases dans les îlots de rats âgés de 10 jours.

Des îlots de rats âgés de 10 jours et d'îlots de rats adultes ont été isolés. Les protéines de ces îlots ont été extraites et les kinases actives ont été déterminées par le kit STK (Sérine Thréonine Kinases) de la technologie PAMGENE. Les kinases ayant un score vers la droite sont les kinases dont l'activité est plus élevée dans les îlots de rats que dans les îlots de rats adultes. Les scores supérieurs à 1.3 représentent les kinases correspondant le plus significativement aux séquences peptidiques données selon l'analyse bio-informatique.

2. Etude de l'implication de JNK3

Dans la littérature il est montré que DLK régule les MAPKs dans différents types cellulaires [209], [212]. Dans un premier temps nous avons vérifié la régulation de l'activation des JNKs par DLK dans les cellules bêta pancréatiques. Pour cela nous avons utilisé la lignée cellulaire bêta pancréatique de rat INS-1E, puisque nos études « ex-vivo » sont effectuées chez le rat. Les JNKs étant connues pour être phosphorylées et ainsi activées par les cytokines pro-inflammatoires, nous avons traité avec un cocktail de cytokines (Interleukine-1 β , TNF- α , Interferon- γ) des cellules INS-1E, dans lesquelles l'expression de DLK a été éteinte par transfection d'un siDLK. Nous observons alors, que la transfection du siDLK diminue fortement la phosphorylation des JNKs induite par les cytokines en comparaison avec les cellules transfectées par le siRNA contrôle (Figure 23 A). Ainsi, nous montrons un rôle de DLK dans la régulation de la voie des JNKs dans les cellules bêta pancréatiques.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction, les trois isoformes de JNKs, JNK1, JNK2 et JNK3 ont des rôles opposés dans la cellule bêta pancréatique. En effet, JNK1 et JNK2 sont pro-apoptotiques tandis que l'expression de JNK3 est nécessaire à la survie cellulaire [162]. Nous posons alors l'hypothèse que l'effet de DLK sur la prolifération cellulaire implique l'isoforme JNK3. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à montrer par immunoprécipitation l'interaction de ces deux kinases dans la cellule bêta pancréatique. Nous avons pu mettre en évidence une interaction de DLK et de JNK3 dans la cellule bêta par immunoprécipitation (Figure 23 B).

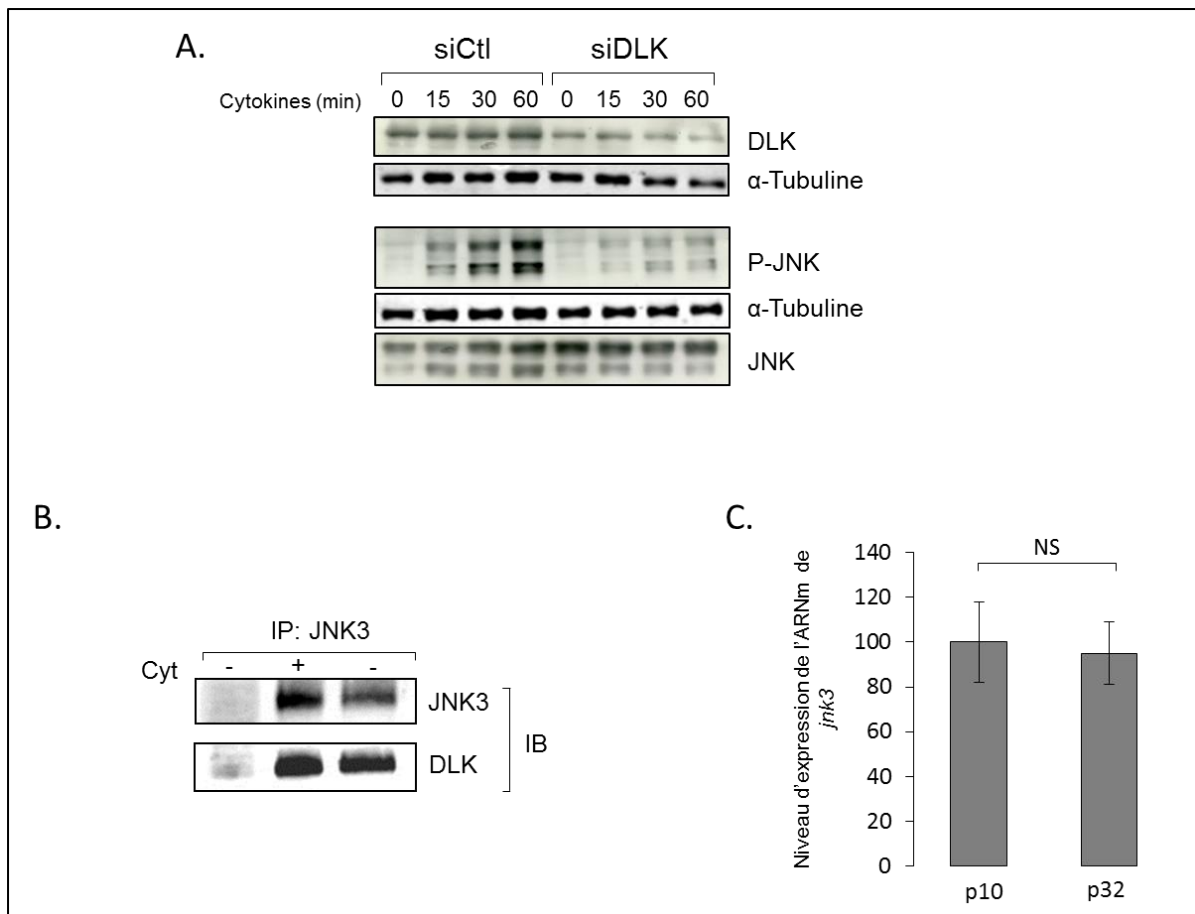


Figure 23 : Régulation de la voie des JNKs par DLK.

A. Les cellules INS-1E ont été transfectées par des siRNA dirigés contre l'ARNm du gène *dlk* (siDLK) ou contre l'ARN du gène *gfp* (siCtl). Après 72h de transfection, ces cellules ont été traitées 15, 30 et 60 minutes ou non par un mix de cytokines (Il-1 β 10 nM ; TNF α 15 nM ; IFN γ 150 nM). Les protéines sont ensuite extraites, séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines DLK, P-JNK, JNK et α -Tubuline. B. Les cellules INS-1E ont été traitées ou non 1 heure par un mix de cytokines (Il-1 β 10 nM ; TNF α 15 nM ; IFN γ 150 nM). Les protéines sont ensuite extraites puis immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine JNK3, puis les anticorps ont été récupérés par des billes magnétiques. Les protéines précipitées ont été analysées par Western-Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines JNK3 et DLK. C. Les îlots de Langerhans de rats âgés de 10 (p10) et 32 (p32) jours ont été isolés. Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Jnk3* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « p10 ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 (C) expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney.

Le niveau d'expression de JNK3 reste inchangé au cours du développement postnatal de la masse de cellules bêta (Figure 23 C), seule son activation augmente (Figure 22). La suppression de JNK3 dans des îlots de rats nouveaux nés conduit au même effet que DLK concernant la prolifération. En effet, la transfection d'un siRNA dirigé contre l'ARNm du gène *Jnk3* (Figure 24 A) diminue significativement la prolifération de la cellule bêta de rats âgés de 10 jours en comparaison à ces mêmes

îlots transfectés par un siCtl (Figure 24 B). Cette diminution de la prolifération en présence du siJNK3 atteint 75 %. De même, le niveau d'expression des gènes du cycle cellulaire *Ccnd2*, *Ccnd1*, *Cdk4* et *Cdkn2c* est significativement plus faible dans les conditions impliquant un silencing de JNK3 (Figure 24 C). Ces résultats supportent davantage l'existence d'un complexe associant DLK et JNK3 et impliqué dans la prolifération cellulaire au cours du développement postnatal.

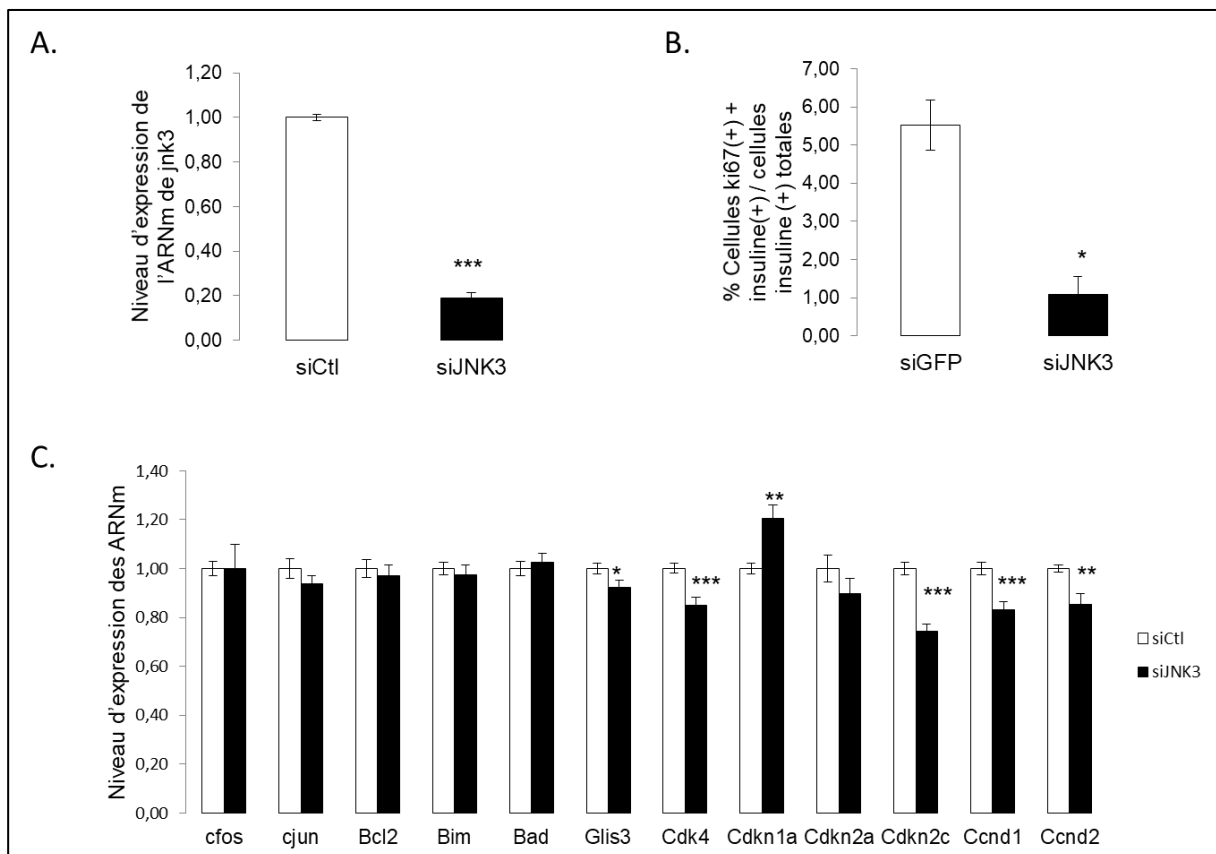


Figure 24 : Rôle de JNK3 dans la prolifération des cellules bêta d'îlots de rats âgés de 10 jours.

Les cellules dispersées d'îlots de rats âgés de 10 jours ont été transfectées par des siRNA dirigés contre l'ARNm du gène *Jnk3* (siJNK3) ou contre l'ARN du gène *gfp* (siCtl). A et C : Après 48h de transfection, les ARN issus de ces cellules ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm du gène *Jnk3* et des gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Tbp*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « siCtl ». B. la prolifération des cellules bêta a été étudiée par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines Insuline et Ki67. La prolifération des cellules bêta est quantifiée par la détermination du pourcentage de cellules positives à l'insuline et au Ki67. Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

D. Etude de l'expression de DLK dans des modèles de compensation de la cellule bêta pancréatique

Dans cette partie de mon travail nous nous sommes intéressés à l'expression de DLK dans des modèles connus d'expansion de la masse de cellules bêta pancréatiques. Cette expansion de la masse de cellules bêta est observée lors de processus physiologiques où la cellule bêta doit compenser pour subvenir aux besoins en insuline demandés par le corps. C'est ce que l'on retrouve par exemple au cours de la grossesse ainsi que durant l'obésité. Nous nous sommes donc attachés ici à étudier l'expression de DLK dans des îlots de modèles murins obèses et gestants ainsi que dans des îlots humains obèses et diabétiques.

Dans un premier temps, nous avons mesuré le niveau d'expression de DLK au cours de la gestation (Figure 25). Durant la gestation on observe en effet une expansion de la masse de cellules bêta permettant d'adapter la production d'insuline face à l'insulino-résistance se mettant en place. Dans la littérature, il a été montré chez des modèles murins, que durant la gestation, le niveau de prolifération de la masse de cellules bêta pancréatiques augmente à partir de 10 jours avec un pic atteint à 14 jours de gestation [71]. Après la mise bas, le taux de prolifération revient au niveau initial pré-gestation. Le profil d'expression de l'ARNm du gène *Dlk* quantifié par PCR quantitative suit le même schéma que celui de la prolifération (Figure 25 A). En effet, l'expression de DLK augmente à partir de 10 jours de gestation, atteint un pic d'expression à 14 jours puis son expression chute à partir de 20 jours de gestation ainsi que 3 jours après la mise bas. L'augmentation de l'expression de DLK à 14 jours de gestation a été confirmée par la technique du western-blotting (Figure 25 B). DLK semble donc être impliquée dans ce mécanisme d'expansion de la masse de cellules bêta au cours de la grossesse.

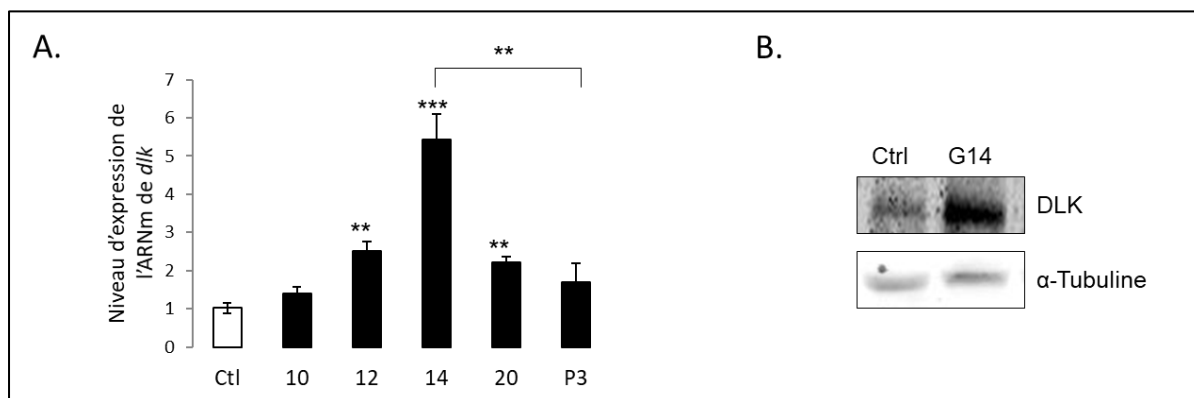


Figure 25 : Expression du gène *Dlk* dans les îlots de Langerhans durant la gestation chez la rate.

A. Les îlots de rates avant (Ctl), durant (à 10, 12, 13 et 20 jours) et après (p3) la gestation ont été isolés. Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Dlk* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « Ctl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. B. Des îlots de rates à avant (Ctl) et à 14 jours de gestation (G14) sont isolés. Les protéines sont extraites, séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines DLK et α -Tubuline.

Par la suite l'expression de DLK a été mesurée dans des modèles murins d'obésité connus, dans des îlots de souris *ob/ob*, mutées pour le gène de la leptine, ainsi que dans des îlots de souris soumises à un régime riche en lipides. Nous observons dans les deux cas une induction de l'expression de *Dlk* : une augmentation de l'ARNm du gène de *Dlk* dans les îlots de souris *ob/ob* (Figure 26 A), ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de DLK dans les îlots de souris soumises à un régime riche en lipides (Figure 26 B). Ces résultats mettent en évidence dans l'ensemble une augmentation de l'expression de DLK au cours de l'obésité.

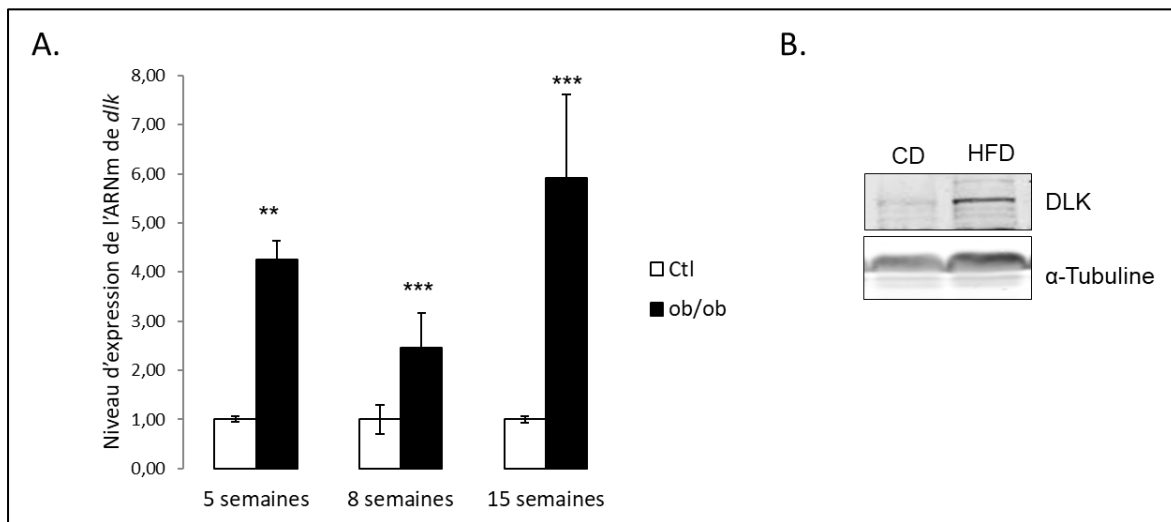


Figure 26 : Expression du gène *Dlk* dans les îlots durant l'obésité dans des modèles de souris obèses.

A. Les îlots de souris ob/ob de différents âges (5, 8 et 15 semaines) ont été isolés. Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Dlk* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « Ctl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test Mann-Whitney. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. B. Des îlots de souris soumises à un régime sain (Chow Diet, CD) ou à un régime riche en lipides (High Fat Diet, HFD) durant 8 semaines ont été isolés. Les protéines de ces îlots sont extraites, séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines DLK et α -Tubuline.

De plus, nous avons eu l'opportunité d'accéder à une banque de données d'ARNm d'îlots de patients humains grâce à une collaboration avec le laboratoire du Pr. Pattou (UMR 1190, Lille, France). Ces îlots de patients humains ont été divisés en différents groupes classés selon différents paramètres dont la BMI et le pourcentage d'hémoglobine glyquée (HbA1c). L'expression de DLK a été mesurée sur cette cohorte de patients humains. Dans un premier temps nous observons que le profil d'expression de DLK suit la même tendance que ce que l'on a pu observer dans les modèles murins. En effet, chez des patients obèses non diabétiques (HbA1c < 5,7), l'expression de DLK augmente de façon significative (Figure 27 A). Une étude de corrélation entre l'expression de DLK et la BMI des patients montre une tendance positive mais non significative (Figure 27 B). On note aussi que l'expression de DLK chez des patients obèses et diabétiques n'est pas induite (Figure 27 A). Néanmoins, l'étude de corrélation entre l'HbA1c nous montre une corrélation positive entre ces deux paramètres. (Figure 27 C). Ces résultats chez l'humain se montrent intéressants et indicatifs, ils supposent un rôle de DLK dans la compensation de la

masse de cellules bêta au cours de l'obésité chez l'homme. Il faudrait cependant augmenter le nombre d'individus présents dans cette étude afin de confirmer ces résultats.

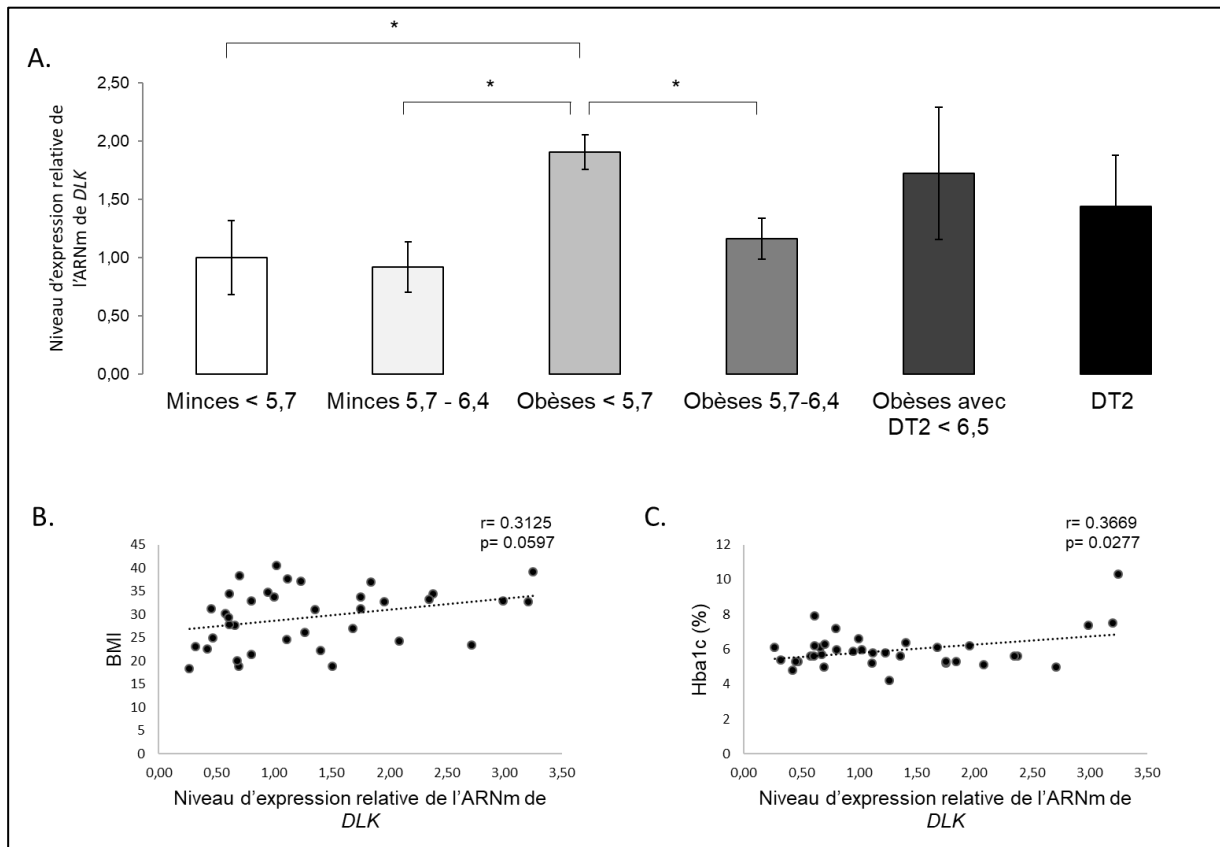


Figure 27 : Expression du gène *DLK* dans des îlots de sujets sains, obèses et diabétiques de type 2.

A : Des îlots de sujets minces ($HbA1c < 5.7$ et $5.7-6.4$), obèses ($HbA1c < 5.7$, $5.7-6.4$, < 6.5 (DT2)) et diabétiques de type 2 (DT2) ont été isolés. Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *DLK* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *RPLP0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « Mincés < 5.7 ». Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. $*p < 0,05$. B et C : Corrélation de l'expression de l'ARNm du gène *DLK* avec le BMI (kg/m^2) (B) et l'HbA1c (%) (C) dans les différents groupes de sujets. Les résultats ont été analysés par un test de régression linéaire.

En somme, nous montrons ici que l'expression de DLK peut-être induite dans différents modèles de compensation comme au cours de la grossesse et de l'obésité. Ces résultats confirment donc le rôle de DLK dans l'augmentation de la masse de cellules bêta pancréatiques.

E. Régulation de l'expression de DLK dans des îlots pancréatiques

Dans cette partie de l'étude nous avons cherché à identifier quel facteur était susceptible d'induire l'expression de DLK au cours de la compensation de la masse de cellules bêta pancréatiques notamment durant la grossesse et l'obésité.

Les sérine-thréonine kinases sont activées par différents signaux extracellulaires *via* leurs récepteurs membranaires, tels que des facteurs de croissance, des hormones ou encore des nutriments. Nous avons sélectionné des facteurs connus pour être impliqués dans la prolifération de la cellule bêta au cours du développement postnatal, de la grossesse et de l'obésité afin d'étudier leur effet sur l'expression de DLK [59], [73].

Parmi ces facteurs nous avons principalement choisi des hormones : la prolactine, la sérotonine, l'estradiol ainsi que l'exendine 4, agoniste au récepteur au GLP-1. Nous avons traité des îlots de rats adultes isolés avec ces composés et étudié l'expression de DLK. Ici, l'expression de DLK a été mesurée par PCR quantitative. La prolactine, la sérotonine et l'estradiol ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de DLK dans les îlots pancréatiques (Figure 28).

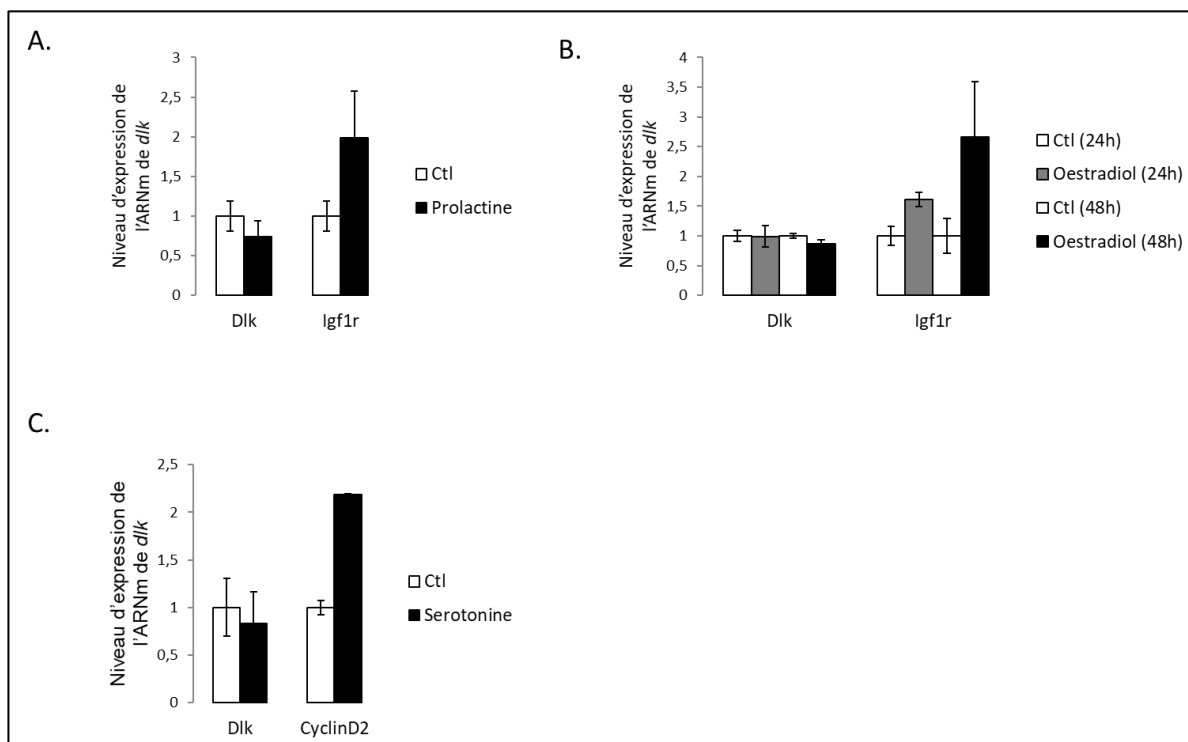


Figure 28 : Etude de la régulation de l'expression de DLK.

Des îlots de Langerhans de rats ont été isolés et traités par de la prolactine à 500 nM durant 48 heures (A), de l'Estradiol à 100 nM durant 24 et 48 heures (B), de la sérotonine à 100 µM durant 48 heures (C). Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Dlk* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « Ctl ».

De manière intéressante, seule l'exendine-4, mimétique du GLP-1 stimule de façon significative l'expression de DLK dans ces îlots. Cette régulation de DLK par l'exendine-4 a été montrée par PCR quantitative où l'on observe au bout de 12 heures de traitement une augmentation correspondant à un doublement (Figure 29).

Nous montrons ici que la signalisation du récepteur au GLP-1 pourrait être impliquée dans l'induction de l'expression de DLK dans la cellule bêta pancréatique.

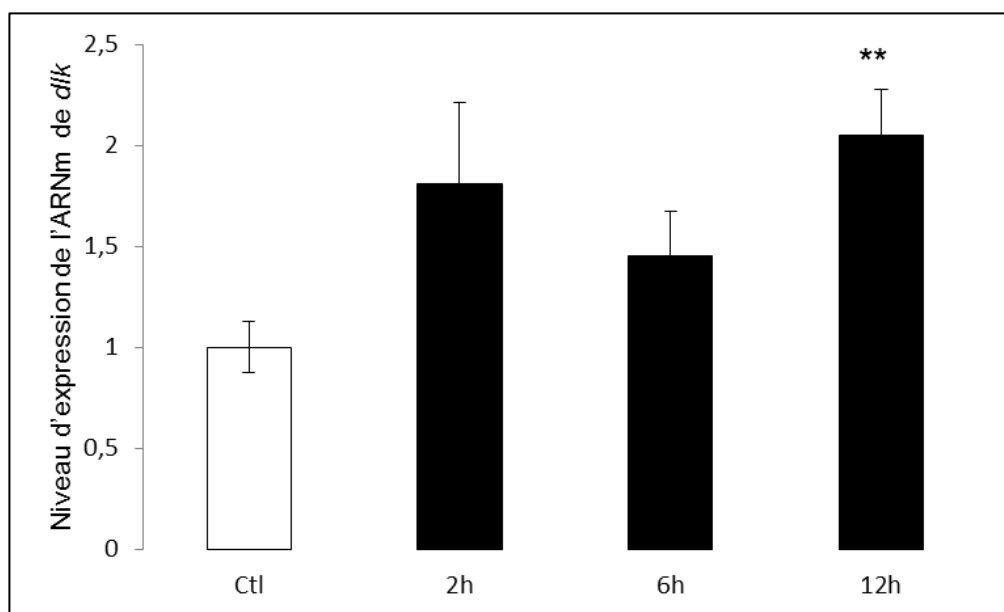


Figure 29 : Etude de la régulation de l'expression de DLK.

Des îlots de Langerhans de rats ont été isolés et traités par de l'exendine 4 à 50 nM durant 2, 6 et 12 heures. Les ARN issus de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Le taux d'expression des ARNm du gène *Dlk* est normalisé par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *Rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « Ctl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. ** $p < 0,01$.

F. Conclusion

Ainsi nous montrons que l'expression de DLK est régulée positivement au cours du développement postnatal *via* un mécanisme qui pourrait impliquer le GLP-1. Notre étude confirme aussi le rôle bénéfique de JNK3 sur la cellule bêta, qui, outre son rôle anti-apoptotique, est nécessaire à la prolifération des cellules bêta au cours du développement postnatal. L'augmentation de l'expression de DLK pourrait être responsable de l'activation de JNK3 et ainsi favoriser la prolifération des cellules bêta pancréatiques au cours du développement.

Nos données suggèrent aussi que l'induction de l'expression de DLK et l'activation de JNK3 pourraient être impliquées dans la compensation de la masse de cellules bêta au cours de l'obésité et de la grossesse. La signalisation orchestrée par DLK *via* JNK3 pourrait être ainsi un mécanisme d'adaptation de la cellule bêta, empêchant ainsi la survenue d'un diabète.

II. ETUDE DE L'EFFET DES LIPOPROTEINES MODIFIEES SUR LE DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES BETA PANCREATIQUES

A. Contexte général de l'étude

Le chapitre précédent met en évidence le rôle de la signalisation des MAPKs en particulier JNK3 dans le contrôle de la masse des cellules bêta pancréatiques au cours du développement normal postnatal. Nos observations soulignent ainsi le rôle complexe que pourraient jouer les JNKs sur la fonction et la survie des cellules bêta, selon les conditions physiologiques ou physiopathologiques. Un grand nombre d'études rapportent le rôle des JNKs comme médiateurs de l'apoptose des cellules bêta pancréatiques en réponse à des facteurs diabétogènes [151], [192], [193]. Notamment, des études précédentes réalisées par notre laboratoire ont montré que les JNKs peuvent-être activées par les LDL-oxydées.

Les taux et la modification des LDL sont associés à l'intolérance au glucose et au diabète [150]. En effet, une augmentation des concentrations de LDL-oxydées est corrélée avec la progression du diabète [149]. Des données in vitro montrent que les LDL-oxydées induisent la mort de la cellule bêta *via* l'activité des JNKs. La culture des cellules bêta avec un inhibiteur des JNKs protège les cellules de la mort induite par les LDL-oxydées [151]. Par ailleurs des études rapportent que les JNKs sont activées par le stress du réticulum endoplasmique (RE) [223]. Ces observations suggèrent que le stress du RE pourrait-être activé par les LDL-oxydées et ainsi induire l'apoptose des cellules bêta.

Les résultats obtenus dans ce chapitre confirment l'activation du RE par les LDL-oxydées et ont été publiés dans la revue PloS One, dont je suis co-première auteure, intitulé « Endoplasmic reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic beta-cell function caused by human oxidized LDL » [221].

B. Etude du rôle du stress du RE dans les effets des LDL-oxydées sur la cellule bêta

Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle du stress du RE dans les effets délétères des LDL-oxydées sur la cellule beta. Dans un premier temps, nous avons montré que les LDL-oxydées conduisent à une activation de la voie IRE1 α du stress du RE. En effet, les LDL-oxydées induisent la phosphorylation de IRE1 α et l'épissage de *Xbp1* dans un modèle de lignée cellulaire bêta pancréatique Min6 (Figure 30 [221]). Cette voie du stress du RE étant en partie responsable de l'activation de JNK1 et par conséquent induit l'apoptose (Figure 30 [221]). Dans cet article nous montrons que les LDL-oxydées activent aussi la voie ATF6 du stress du RE mais que par contre, la voie PERK n'est pas induite.

En effet, nous observons qu'un inhibiteur du stress du RE, le 4-PBA, inhibe les effets des LDL-oxydées sur l'expression de CHOP, protéines exprimées lors de l'activation de voies IRE1 α et ATF6, ainsi que sur l'expression de p58IPK. Cependant, les LDL-oxydées n'ont pas d'effet sur l'expression d'ATF4, ce dernier étant un facteur exprimé suite à l'activation de la voie PERK du stress du RE (Figure 30).

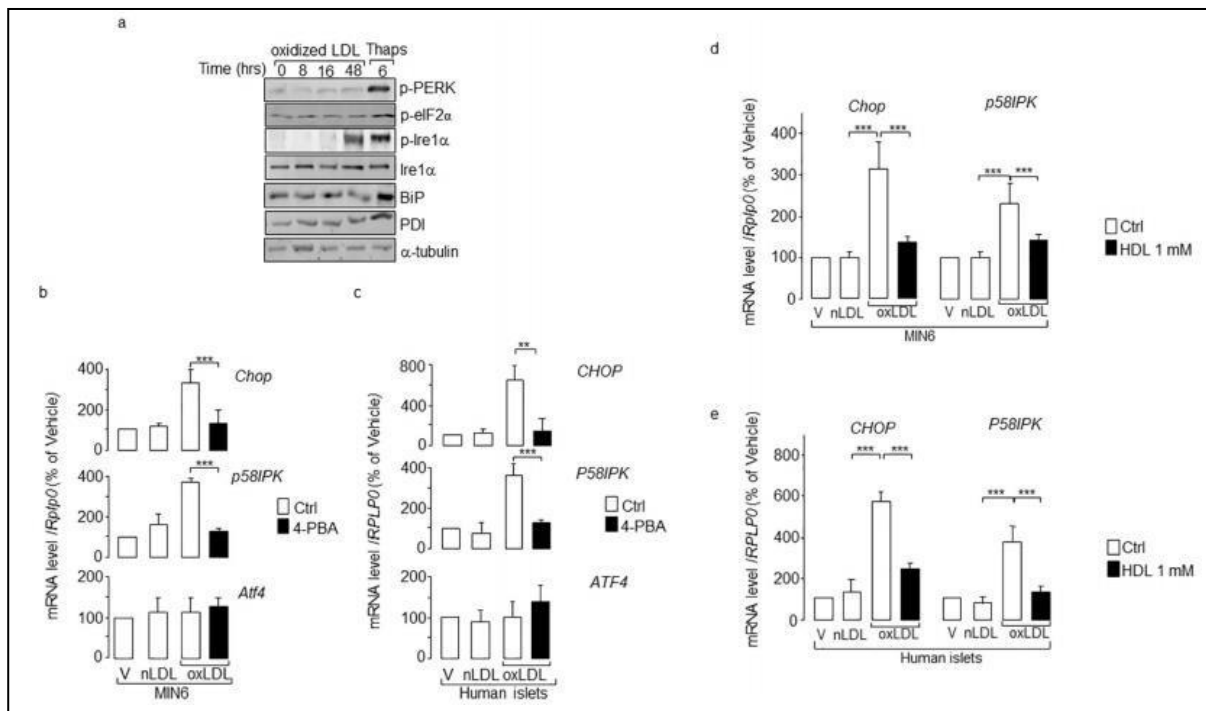


Figure 30 : Activation du stress du RE par les LDL-oxydées. Figure issue de la publication [221].

a. Des cellules min6 ont été traitées par 2mM de LDL-oxydées durant 8, 16 et 48 heures ou par 1 μ M de thapsigargine durant 6 heures. Les protéines de ces îlots ont été extraites, séparées par SDS-PAGE puis analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines P-PERK, P-eIF2 α , Ire1 α , Bip, PDI et α -Tubuline. B/C/D/E. Des cellules min6 et des îlots de Langerhans humains ont été traités par un véhicule (V), des LDL natifs (nLDL) ou par des LDL-oxydées (oxLDL) à 1 μ M durant 48 heures. Puis les cellules sont co-traitées ou non par du PBA à 2.5 mM (b et c) ou par des HDL à 1 mM (d et e). Les ARN issus de ces cellules et de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm des gènes *chop/CHOP*, *p58IPK/P58IPK* et *atf4/ATF4* sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *rplp0/RPLP0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « V ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Pour montrer le rôle du stress du RE dans les effets délétères des LDL-oxydées nous avons utilisé un inhibiteur du stress du RE le PBA (4-phenyl butyrate), une molécule chaperonne connue pour réduire le stress du RE. Pour cela nous avons traité des cellules sécrétrices d'insuline avec des LDL-oxydées en présence ou non de cet inhibiteur du stress du RE. Lorsque des cellules MIN6 ou des îlots de Langerhans humains sont traités par le PBA nous observons une diminution significative de l'apoptose induite par les LDL-oxydées (Figure 31 [200]). Nous avons également montré par PCR quantitative que ce même traitement par le PBA restaure l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2 et IB1 qui sont des protéines inhibées dans les cellules uniquement traitées avec des LDL-oxydées (Figure 31 [221]).

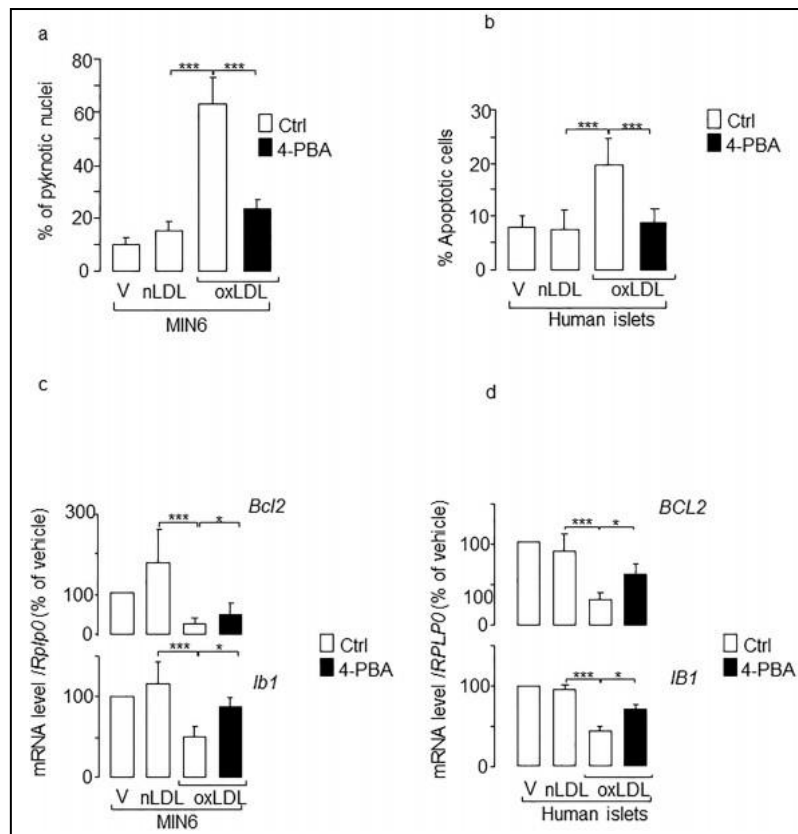


Figure 31: Effet du 4-PBA sur l'apoptose induite par les LDL-oxydées. Figure issue de la publication [221].

Des cellules min6 et des îlots de Langerhans humains ont été traités par un véhicule (V), des LDL-natifs (nLDL) ou par des LDL-oxydées (oxLDL) à 1 μ M durant 72 heures. Puis les cellules sont co-traitées ou non par du PBA à 2.5 mM. a et b : Le taux de cellules apoptotiques est déterminé par calcul du pourcentage des noyaux pycnotiques. c et d : Les ARN issus de ces cellules et de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm des gènes *Bcl2/BCL2* et *Ib1/IB1* sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *rplp0/RPLP0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « V ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. **p<0,01, ***p<0,001.

Par ailleurs, nous montrons également par PCR quantitative que les LDL-oxydées impactent l'expression de la pré-proinsuline *via* l'activation du stress du RE. En effet, un traitement au PBA restaure l'expression de la pré-proinsuline dans des cellules MIN6 et dans des îlots pancréatiques humains traités préalablement avec les LDL-oxydées (Figure 32 [221]).

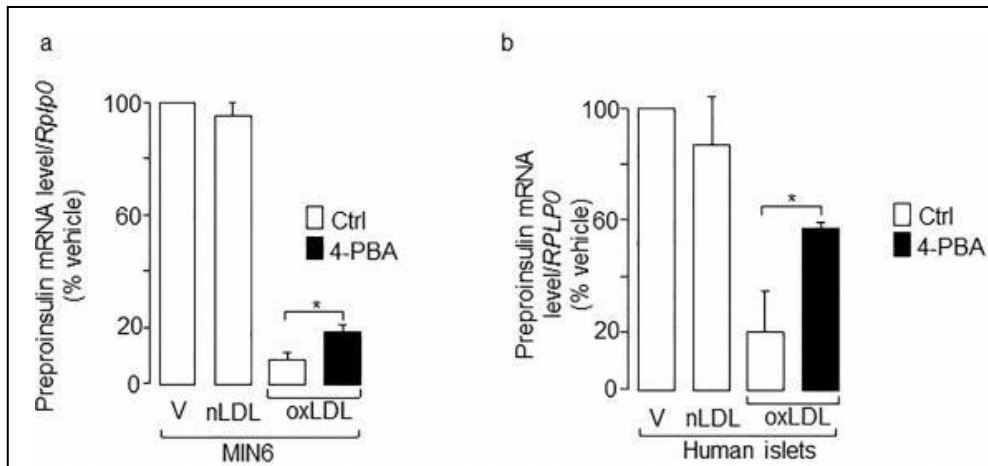


Figure 32: Effet du 4-PBA sur la perte de l'expression de l'insuline provoquée par les LDL-oxydées. Figure issue de la publication [221].

Des cellules min6 (a) et des îlots de Langerhans humains (b) sont traités par un véhicule (V), des LDL-natifs (nLDL) ou par des LDL-oxydées (oxLDL) à 1 μ M durant 72 heures. Puis les cellules sont co- traitées ou non par du PBA à 2.5 mM. Les ARN issus de ces cellules et de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm du gène de la *Preproinsuline*/Préproinsuline sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *rp1p0/rp1p0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « V ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. * $p < 0,05$.

C. Etude de l'implication d'ICER

Par ailleurs, le laboratoire a précédemment montré que la protéine CREM, ICER (Inducible cAMP Early Repressor) est aussi impliquée dans l'apoptose induite par les LDL-oxydées [157]. ICER est un membre de la famille des facteurs de transcription régulant l'élément de réponse CRE (cAMP responsive element). Il est connu, entre autres, pour réguler négativement le facteur de transcription CREB. Dans la cellule bêta ICER est un répresseur de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose mais aussi de gènes impliqués dans l'expression et la sécrétion d'insuline [157]. En effet, l'induction de l'expression d'ICER intervient dans la perte de la sécrétion d'insuline et dans la mort des cellules bêta induites par les LDL-oxydées.

C'est pourquoi nous supposons un lien entre l'activation du stress du RE et l'induction de l'expression d'ICER dans l'apoptose induite par les LDL-oxydées. Nous avons alors étudié le lien entre l'induction du stress du RE et l'induction de l'expression d'ICER. Pour cela nous avons traité des cellules min6 ainsi que des îlots humains par les LDL-oxydées en présence ou non de l'inhibiteur du stress du RE, le PBA. Puis nous avons mesuré par PCR quantitative l'expression de l'ARNm d'ICER.

L'inhibiteur du stress du RE n'attenué par l'induction de l'expression de l'ARNm d'ICER induite par les LDL-oxydées dans les cellules min6 et les îlots de humains. Nous concluons ici que les LDL-oxydées induisent l'expression d'ICER indépendamment de l'activation du stress du RE. Les LDL-oxydées activent donc deux différentes voies conduisant à l'apoptose des cellules bêta : le stress du RE et l'expression d'ICER.

Ainsi, nous montrons ici que l'apoptose des cellules bêta induite par les LDL-oxydées semble impliquer le stress du RE et ICER mais de manière indépendante. (Figure 33 [221]).

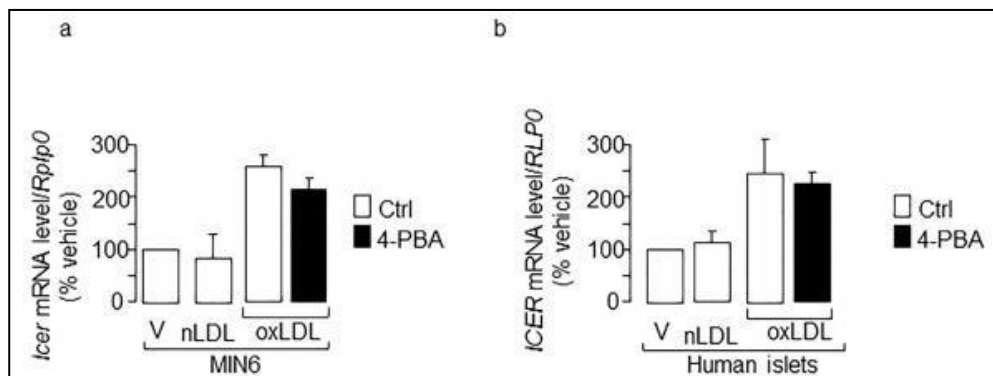


Figure 33: Effet du 4-PBA sur l'induction de l'expression d'ICER provoquée par les LDL-oxydés. Figure issue de la publication [221].

Des cellules min6 (a) et des îlots de Langerhans humains (b) sont traités par un véhicule, des LDL-natifs ou par des LDL-oxydées à 1 μ M durant 72 heures. Puis les cellules sont co-traitées ou non par du PBA à 2.5 mM. Les ARN issus de ces cellules et de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm du gène d'*Icer/Icer* sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *rplp0/rplp0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « Ctl ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's.

D. Etude de l'implication du stress oxydatif

Un autre stress important est également induit dans les cellules bêta par un environnement diabétogène, c'est le stress oxydatif. Les LDL-oxydées produisent du peroxyde d'oxygène au sein des cellules bêta et un traitement par un antioxydant, NAC (N-acetylcystein) prévient la perte de l'expression et de la sécrétion de l'insuline causés par les LDL-oxydées [157].

Nous avons ainsi cherché l'implication de ce stress oxydatif dans l'activation du stress du RE par les LDL-oxydées. Pour cela nous avons dans un premier temps vérifié que le stress oxydatif induit un stress du RE. Nous avons traité des cellules min6 et des îlots de Langerhans humains par du peroxyde d'oxygène et nous avons vérifié par PCR quantitative l'expression de différents gènes cibles du stress du RE. Nous avons montré ici que le peroxyde d'oxygène induit rapidement, à partir de 15 minutes, l'expression des gènes *chop/CHOP* et *p58IPK/P58IPK*, ce dernier étant induit par la voie ATF6 du stress du RE et cela dans nos deux modèles murins et humains. (Figure 34 [221])

De plus, nous avons montré que l'utilisation d'un antioxydant ici le NAC, réduit les effets des LDL-oxydées sur l'expression de ces deux gènes, *chop/CHOP* et *p58IPK/P58IPK* dans les min6 et les îlots humains. (Figure 34 [221])

Ainsi, nous montrons ici l'implication du stress oxydatif dans l'activation du stress du RE par les LDL-oxydées. En effet, l'inhibition du stress oxydatif inhibe l'activation du stress du RE par les LDL-oxydées. Les LDL-oxydées induisent un stress oxydatif qui induit d'une part un stress du RE et d'autre part, l'expression du facteur de transcription ICER, qui sont ensuite impliqués dans l'apoptose des cellules bêta et dans la diminution de l'expression et de la sécrétion de l'insuline.

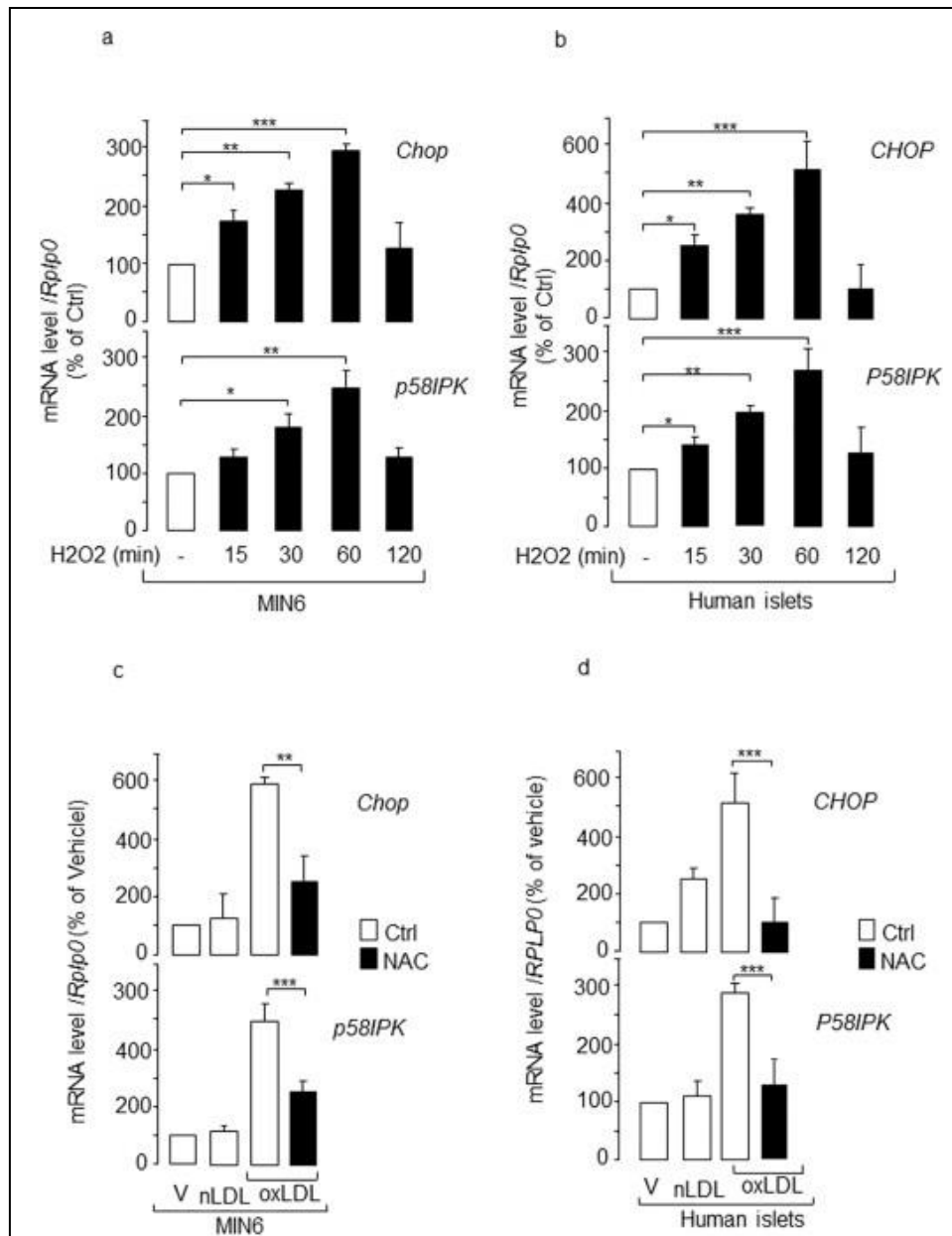


Figure 34 : Effet du stress oxydatif sur l'induction du stress du RE par les LDL-oxydées. Figure issue de la publication [221].

a et b : Des cellules min6 et des îlots de Langerhans humains ont été traités par 150 μ M de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) durant 15, 30, 60 et 120 minutes. c et d : Des cellules min6 et des îlots de Langerhans humains ont été traités par un véhicule, des LDL-natifs ou par des LDL-oxydées à 1 μ M (durant 72 heures. Puis les cellules sont co-traitées ou non par du N-acetylcystein (NAC) à 1 mM (c) et à 10 mM (d). Les ARN issus de ces cellules et de ces îlots ont été extraits, rétro-transcrits et quantifiés par PCR quantitative. Les taux d'expression des ARNm des gènes *chop/CHOP* et *p58IPK/P58IPK* sont normalisés par le taux d'expression des ARNm du gène de référence *rplp0/RPLP0*. Les résultats sont exprimés en quantité relative par rapport à la condition « V ». Les données sont la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les résultats ont été analysés par un test de Kruskal-Wallis et un post test Dunn's. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

E. Conclusion

Dans ce chapitre, nous montrons que les effets délétères des LDL-oxydées sur la cellule bêta proviennent entre autres de l'activation du stress du RE. Les LDL-oxydées activent en effet la voie IRE1 α , cette dernière étant responsable de l'activation des JNKs. Nos résultats montrent ainsi que le stress oxydatif participe à l'activation du stress du RE par les LDL-oxydées, ce qui déclenchera entre autres l'activation des JNKs et l'apoptose des cellules bêta.

DISCUSSION ET

PERSPECTIVES

I. LA SIGNALISATION DLK/JNK3 CONTROLE LA MASSE DE CELLULES BETA AU COURS DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL, DE L'OBESITE ET DE LA GROSSESSE

Le développement pancréatique durant la période postnatale est caractérisé par une expansion de la masse de cellules bêta permettant d'acquérir un niveau de production d'insuline adéquate pour répondre aux besoins de l'organisme. Il a été montré que chez les rongeurs mais aussi chez l'humain, cette augmentation de la masse de cellules bêta résulte d'une élévation du taux de prolifération [37]. Il a par ailleurs, été montré que le plus fort taux de prolifération de ces cellules chez le rat est atteint à 10 jours après la naissance [38].

Dans la première partie de notre travail, nous montrons que DLK est exclusivement exprimée dans le cytosol des cellules bêta chez le rat et que son expression est induite durant le développement postnatal chez le raton âgé de 10 jours. Nous montrons également que la diminution de l'expression de DLK dans les îlots de rats nouveau-nés conduit à une diminution de la prolifération des cellules bêta. Par ailleurs, le taux basal d'apoptose des cellules bêta n'est pas impacté par l'absence de DLK, ce qui indique que la diminution de la prolifération ne semble pas liée à une augmentation de l'apoptose cellulaire. Ces résultats nous conduisent à l'hypothèse d'un rôle de cette sérine-thréonine kinase dans le développement de la masse des cellules sécrétrices d'insuline.

Plusieurs résultats confortent le rôle de la MAPK JNK3 dans la cascade de signalisations induite en aval de DLK dans la régulation postnatale de l'expansion

des cellules bêta. Tout d'abord de nombreuses études montrent que DLK est la MAP3K impliquée dans l'activation des JNKs. Par ailleurs, notre étude de mesure de l'activité des sérine-thréonine kinases (STK) dans des îlots de rats âgés de 10 jours et dans des îlots de rats adultes montre que les JNKs sont plus activées dans les îlots de rats nouveau-nés. Parmi les différentes JNKs, JNK1 et JNK2 sont pro-apoptotiques et ont été identifiées comme étant des médiateurs de l'apoptose induite par différents stress cellulaires [162]. Ici, les résultats de nos expériences montrent que DLK n'est pas impliquée dans l'apoptose des cellules bêta et que l'absence de JNK3 conduit à une diminution de la prolifération des cellules bêta dans des îlots de rats âgés de 10 jours. Il semble donc que DLK et JNK3 aient des effets comparables, et donc que JNK3 soit la candidate à l'action de DLK, parmi les trois JNKs, et qu'une augmentation de l'expression de DLK stimule l'activité de JNK3.

Dans le système nerveux central DLK active les 3 isoformes JNKs *via* la MAP2K, MKK7. Dans les cellules bêta, JNK3 est la plus abondante parmi les isoformes JNKs. Comme DLK, JNK3 a aussi un profil d'expression plus restreint, elle ne s'exprime que dans les neurones et les cellules bêta, alors que JNK1 et JNK2 sont exprimées dans plusieurs autres types cellulaires [162], [171]. Ainsi, ces observations confortent les résultats précédents, à savoir que l'activation de la signalisation JNK3 par DLK serait privilégiée par rapport à celle de JNK1 et JNK2.

L'activation des JNKs par DLK est connue pour se faire au sein d'un complexe réalisé par des protéines d'échafaudages, parmi lesquelles les « Islets-Brain ». Une protéine d'échafaudage suit également un profil d'expression restreint aux neurones et aux cellules bêta identique à JNK3 et DLK, c'est la MAPK8IP1 appelée aussi islet-brain 1 (IB1). Ces observations suggèrent que JNK3 est régulée par DLK et MKK7 dans un complexe organisé par IB1. L'interaction de ce complexe au sein de la cellule bêta pourrait-être démontrée par immunoprécipitation en supprimant l'expression d'IB1. Le rôle d'IB1 sur la prolifération des cellules bêta de rats nouveau-nés pourrait permettre de conforter l'idée de l'importance de ce complexe au cours du développement ainsi que de la compensation de la masse de cellules bêta.

II. REGULATION DE LA SIGNALISATION DLK/JNK3 PAR LE GLP-1

Des études ont montré dans les cellules bêta que l'expression de JNK3 et d'IB1 est stimulée par les mimétiques du GLP-1, tels que l'exendine 4 [192], [205]. Nos travaux ont permis de souligner la régulation de l'expression de DLK par l'exendine 4 dans des îlots de rats. Le GLP-1 joue un rôle important dans la prolifération des cellules bêta [224]. Ainsi, nous supposons que cette hormone pourrait être essentielle pour la prolifération des cellules bêta dans des contextes physiologiques et physiopathologiques. Au cours du développement postnatal et jusqu'au sevrage, le développement des cellules entéro-endocrines est parallèle à celui des cellules bêta, suggérant un dialogue entre ces 2 types cellulaires [225]. Nous suggérons que la maturation des cellules entéro-endocrines productrices du GLP-1 pourrait contribuer au développement des cellules bêta *via* l'activation de la signalisation JNK3 au cours du développement postnatal et que le mécanisme par lequel le GLP-1 stimule l'expression de DLK serait indépendant de l'induction de l'expression du récepteur au GLP-1 (GLP1-R). En effet, deux grandes études montrent que l'expression du récepteur au GLP-1 (GLP1-R) est plus faible dans les îlots de rats nouveau-nés par rapport aux îlots de rats adultes [38], [67]. Chez l'humain l'expression du GLP1-R n'est pas différente entre des sujets jeunes et âgés [226].

III. IMPLICATION DE LA SIGNALISATION DLK/JNK3 DANS LA COMPENSATION ET LE DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES BETA : ROLE DU STRESS OXYDATIF ET DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE (RE)

A. Rôle du stress du RE dans le développement de la masse des cellules bêta

Nos différents travaux exposés ici étudient d'une part le développement de la masse de cellule bêta et les mécanismes pouvant être activés lors de la compensation de cette masse notamment au cours de l'obésité et d'autre part les mécanismes impliqués dans le déclin de la cellule bêta lors du développement d'un diabète de type 2. Dans ce dernier axe nous montrons le rôle du stress du RE dans les effets délétères des LDL-oxydées sur la cellule bêta.

Cependant, comme nous l'avons dit dans l'introduction, le rôle du stress du RE au sein de la cellule bêta peut être paradoxal. En effet, différentes études montrent que le stress du réticulum endoplasmique est impliqué dans le développement postnatal de la masse de cellules bêta pancréatiques. Il a été montré sur un modèle de souris invalidées pour le gène codant la protéine PERK, spécifiquement dans la cellule bêta, qu'une masse de cellules bêta nettement réduite comparée aux souris contrôles. Chez ces souris invalidées pour PERK, le taux de prolifération en période postnatale est nettement impacté [144] et les souris développent un diabète dès la naissance. Nous pouvons donc supposer un lien entre l'activation de la signalisation de DLK et le stress du RE. De plus, une étude montre que l'agoniste du récepteur au GLP-1, l'exendine-4, est capable d'induire un des effecteurs du stress du RE, ATF4 d'une manière indépendante de la phosphorylation d'eIF2 α [227]. L'exendine-4 régule l'expression d'ATF4 *via* la voie AMPc/PKA. La voie PERK a été montrée comme pouvant être impliquée dans l'homéostasie et le maintien de la cellule bêta [228]. Le lien existant entre le stress du RE et l'expression de DLK pourrait provenir de la liaison entre les complexes DLK/JNK3 et la voie GLP-1/ATF4 lors du

développement et de la compensation de la cellule bêta [227].

Nous montrons dans notre étude que le GLP-1 est à l'origine de l'augmentation de DLK et ainsi de l'augmentation de l'activation de JNK3. Dans les cellules, l'activité des différentes isoformes des JNKs dépend de leurs niveaux d'expression respectifs et de leurs activités respectives. Nous savons que JNK1 est la MAPK activée lors d'un stress du RE *via* la voie IRE1 α [143]. Nous supposons ici, qu'une fois activée JNK1 exerce un rôle pro-apoptotique dans la cellule bêta. Le GLP-1 pourrait renverser cet effet, *via* la régulation positive de JNK3 et ainsi permettre à cette isoforme de prendre le dessus sur JNK1 et induire la protection et la prolifération des cellules bêta dans un contexte de compensation.

B. Rôle du stress oxydatif et du RE dans la perte de la masse des cellules bêta dans le diabète

Une des causes principales du développement d'un diabète de type 2 est la défaillance de la cellule bêta pancréatique. Le dysfonctionnement des cellules bêta et la perte de leur masse sont induits par différents stress cellulaires activés par différents facteurs tels que l'hyperglycémie chronique et/ou la présence d'acides gras libres [229]. Parmi ces stress le stress oxydatif et le stress du RE ont largement été montrés comme participant au déclin fonctionnel de la cellule bêta. En effet, ils sont principalement connus pour induire l'apoptose de ces cellules lors de l'évolution de la maladie [148], [230]. Dans le deuxième axe de recherche développé ici, nous montrons que les LDL-oxydées sont responsables du déclin de la cellule bêta, ils induisent l'apoptose cellulaire dans la lignée MIN6 et dans des îlots de Langerhans humains. Nous nous sommes intéressés aux mécanismes régulant cette mort cellulaire et nous avons montré que les LDL-oxydées provoquent un stress oxydatif dans les cellules bêta, ce dernier induisant à terme l'activation de différentes voies, la voie IRE1 α et ATF6 du stress du RE responsables de la mort des cellules bêta.

De nombreuses études indiquent un effet synergique entre le stress oxydatif et le stress du RE. De plus, un lien d'activation croisée a été montré, en effet, l'activation du stress du RE aboutit à l'activation du stress oxydatif et réciproquement [231], [232]. Différents facteurs diabétogènes sont responsables de la production de

ROS (Reactive Oxygen Species) dans la cellule. C'est le cas de la glucolipotoxicité mais aussi de l'oxydation de différents lipides et en particulier du cholestérol qui forme alors des oxystérols induisant la formation de ROS [231], [232]. Ces derniers peuvent être responsables de l'activation d'un stress du RE. Inversement le stress du RE peut produire des ROS qui engendrent à leur tour un stress oxydatif. Car la formation de ponts-disulfures au cours de la synthèse des protéines ainsi que l'accumulation de protéines mal conformées dans le RE sont une source de production de ROS qui peuvent ainsi déclencher un stress oxydatif [233]. De plus, il a été montré que la protéine CHOP traduite lors d'un stress du RE est responsable de l'activation d'un stress oxydatif. D'autre part il a été montré que l'activation de la transcription du gène ERO-1 β est également responsable de la formation de ROS et induit une perturbation de l'activité mitochondriale [141]. La mitochondrie quant-à-elle amplifie les effets du stress du RE. En effet, lors de ce dernier, le Ca²⁺ libéré est récupéré par la mitochondrie dont la fonction est alors altérée ce qui conduit à une forte production de ROS qui vont agir sur la libération du Ca²⁺ par le RE [234].

Notre étude s'inscrit dans ce contexte et conforte le lien existant entre le stress du RE et le stress oxydatif. En effet, nous montrons que le déclenchement du stress du RE par les LDL-oxydées nécessite au préalable l'activation d'un stress oxydatif. Nous montrons aussi que le peroxyde d'oxygène, un des nombreux ROS, active le stress du RE. La principale cause de production des ROS par le RE est la formation de ponts disulfures. Seulement, dans notre étude nous montrons que les principales protéines responsables de la formation de ces ponts disulfures ne sont pas induites par les LDL-oxydées [213]. Un des autres liens entre le stress oxydatif et le stress du RE est la mitochondrie. La voie PERK est la voie principale faisant le lien avec l'activation de la mitochondrie. En effet, il est connu que PERK se situe dans la membrane mitochondriale associée au RE et constitue une structure importante pour le passage du Ca²⁺ du RE vers la mitochondrie [234]. Or, nous montrons dans notre étude que les LDL-oxydées ne semblent également pas activer cette voie.

Par ailleurs, une précédente étude montre que l'expression du répresseur transcriptionnel ICER est induite par les LDL-oxydées et l'hyperglycémie chronique dans la cellule bêta [157]. L'induction d'ICER par l'hyperglycémie chronique et les LDL-oxydées réduit l'expression de la protéine d'échafaudage IB1 [151], [157]. La

diminution d'IB1 est une des causes principales par laquelle les LDL-oxydées induisent l'apoptose des cellules bêta [158]. Des études futures seront nécessaires afin de démontrer si la diminution de l'expression d'IB-1 est associée avec la perte de l'activation de JNK3.

IV. CONCLUSION

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux sérine-thréonine kinases impliquées dans le développement postnatal de la masse de cellules bêta ainsi que dans la compensation de cette masse au cours de la grossesse et de l'obésité. Nous avons montré que l'expression d'une sérine-thréonine kinase, DLK, est induite au cours de ces différents états. L'expression de cette kinase est en effet nécessaire à la prolifération de la cellule bêta durant le développement postnatal. Nous avons montré ici que DLK agit via un complexe impliquant la MAPK JNK3. Ainsi, nous révélons l'existence d'un complexe nécessaire à l'expansion de la masse de cellules bêta durant le développement postnatal.

Un diabète de type 2 survient lorsque la cellule bêta n'est plus en mesure de s'adapter à l'insulino-résistance des tissus cibles de l'insuline. Les stress induits dans la cellule bêta au cours du développement d'un diabète sont en grande partie responsables de cet échec de la cellule bêta. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au stress oxydatif et au stress du RE. Nous avons montré que les LDL-oxydées sont responsables de l'activation de ces deux types de stress cellulaires. De plus, nous avons montré que le stress oxydatif est responsable du déclenchement d'un stress du RE lors d'un traitement aux LDL- oxydées. Cette étude suggère un rôle pour ce mécanisme dans la mort de la cellule bêta induite par les LDL-oxydées au cours d'un diabète de type 2.

LISTE DES

PUBLICATIONS

❖ PLoS One. 2016 Sep 6;11(9):e0163046. doi: 10.1371/journal.pone.0163046. eCollection 2016.

Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL.

Plaisance V, Brajkovic S, Tenenbaum M, Favre D, Ezanno H, Bonnefond A, Bonner C, Gmyr V, Kerr-Conte J, Gauthier BR5, Widmann C, Waeber G, Pattou F, Froguel P, Abderrahmani A.

ABSTRACT

Elevated plasma concentration of the pro-atherogenic oxidized low density lipoprotein cholesterol (LDL) triggers adverse effects in pancreatic beta-cells and is associated with type 2 diabetes. Here, we investigated whether the endoplasmic reticulum (ER) stress is a key player coupling oxidative stress to beta-cell dysfunction and death elicited by human oxidized LDL. We found that human oxidized LDL activates ER stress as evidenced by the activation of the inositol requiring 1 α , and the elevated expression of both DDIT3 (also called CHOP) and DNAJC3 (also called P58IPK) ER stress markers in isolated human islets and the mouse insulin secreting MIN6 cells. Silencing of Chop and inhibition of ER stress markers by the chemical chaperone phenyl butyric acid (PBA) prevented cell death caused by oxidized LDL. Finally, we found that oxidative stress accounts for activation of ER stress markers induced by oxidized LDL. Induction of Chop/CHOP and p58IPK/P58IPK by oxidized LDL was mimicked by hydrogen peroxide and was blocked by co-treatment with the N-acetylcystein antioxidant. As a conclusion, the harmful effects of oxidized LDL in beta-cells requires ER stress activation in a manner that involves oxidative stress. This mechanism may account for impaired beta-cell function in diabetes and can be reversed by antioxidant treatment.

❖ Diabetes. 2018 Jul;67(7):1310-1321. doi: 10.2337/db17-1539. Epub 2018 May 4.

Increased Hepatic PDGF-AA Signaling Mediates Liver Insulin Resistance in Obesity-Associated Type 2 Diabetes.

Abderrahmani A, Yengo L, Caiazzo R, Canouil M, Cauchi S, Raverdy V, Plaisance V, Pawlowski V, Lobbens S, Maillat J, Rolland L, Boutry R, Queniat G, Kwapich M, Tenenbaum M, Bricambert J, Saussenthaler S, Anthony E, Jha P, Derop J, Sand O, Rabearivelo I, Leloire A, Pigeyre M, Daujat-Chavanieu M, Gerbal-Chaloin S, Dayeh T, Lassailly G, Mathurin P, Staels B, Auwerx J, Schürmann A, Postic C, Schafmayer C, Hampe J, Bonnefond A, Pattou F, Froguel P.

ABSTRACT

In type 2 diabetes (T2D), hepatic insulin resistance is strongly associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). In this study, we hypothesized that the DNA methylome of livers from patients with T2D compared with livers of individuals with normal plasma glucose levels can unveil some mechanism of hepatic insulin resistance that could link to NAFLD. Using DNA methylome and transcriptome analyses of livers from obese individuals, we found that hypomethylation at a CpG site in PDGFA (encoding platelet-derived growth factor α) and PDGFA overexpression are both associated with increased T2D risk, hyperinsulinemia, increased insulin resistance, and increased steatohepatitis risk. Genetic risk score studies and human cell modeling pointed to a causative effect of high insulin levels on PDGFA CpG site hypomethylation, PDGFA overexpression, and increased PDGF-AA secretion from the liver. We found that PDGF-AA secretion further stimulates its own expression through protein kinase C activity and contributes to insulin resistance through decreased expression of insulin receptor substrate 1 and of insulin receptor. Importantly, hepatocyte insulin sensitivity can be restored by PDGF-AA-blocking antibodies, PDGF receptor inhibitors, and by metformin, opening therapeutic avenues. Therefore, in the liver of obese patients with T2D, the increased PDGF-AA signaling contributes to insulin resistance, opening new therapeutic avenues against T2D and possibly NAFLD.

❖ Revue Francophone des Laboratoires Volume 2018, Issue 502, May 2018,
Pages 26-32. Doi : 10.1016/S1773-035X(18)30145

Physiopathologie du diabète

Tenenbaum M, Bonnefond A, Froguel P, Abderrahmani A

RÉSUMÉ

Le diabète est défini par une hyperglycémie survenant lorsque la quantité d'insuline plasmatique n'est plus suffisamment produite et/ou assez active par rapport aux besoins de l'organisme. La physiopathologie à l'origine de cette carence, complexe et hétérogène, permet de distinguer différents types de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel. Outre les facteurs génétiques et environnementaux, les travaux de recherche révèlent désormais l'importance de l'épigénétique, de la fonction intestinale et du microbiote comme des acteurs clés dans le développement des différents types de diabète.

ABSTRACT

Diabetes is defined by hyperglycemia. The disease develops when insulin production does not meet the insulin demand from the body. The pathophysiological mechanisms that account for the beta-cell demise is complex and heterogenous among the different types of diabetes including type 1 diabetes, type 2 diabetes ad gestational diabetes. Beside of genetic and environmental factors, many studies have unveiled the key role of epigenetics, gut microbiota and intestine permeability in the development of the different types of diabetes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. V. Röder, B. Wu, Y. Liu, et W. Han, « Pancreatic regulation of glucose homeostasis », *Exp. Mol. Med.*, vol. 48, p. e219, mars 2016.
- [2] S. Bonner-Weir, « Life and death of the pancreatic beta cells », *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 11, n° 9, p. 375-378, nov. 2000.
- [3] D. J. Steiner, A. Kim, K. Miller, et M. Hara, « Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition », *Islets*, vol. 2, n° 3, p. 135-145, mai 2010.
- [4] A. Kim, K. Miller, J. Jo, G. Kilimnik, P. Wojcik, et M. Hara, « Islet architecture: A comparative study », *Islets*, vol. 1, n° 2, p. 129-136, oct. 2009.
- [5] N. Khandekar, B. A. Berning, A. Sainsbury, et S. Lin, « The role of pancreatic polypeptide in the regulation of energy homeostasis », *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 418 Pt 1, p. 33-41, déc. 2015.
- [6] M. Z. Strowski et A. D. Blake, « Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas », *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 286, n° 1-2, p. 169-179, mai 2008.
- [7] A. C. Hauge-Evans *et al.*, « Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function », *Diabetes*, vol. 58, n° 2, p. 403-411, févr. 2009.
- [8] T. Shiiya *et al.*, « Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, n° 1, p. 240-244, janv. 2002.
- [9] I. Quesada, E. Tudurí, C. Ripoll, et A. Nadal, « Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes », *J. Endocrinol.*, vol. 199, n° 1, p. 5-19, oct. 2008.
- [10] F. G. Banting et C. H. Best, « The internal secretion of the pancreas », *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 7, n° 5, p. 251-266, févr. 1922.
- [11] G. A. Rutter, T. J. Pullen, D. J. Hodson, et A. Martinez-Sanchez, « Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion », *Biochem. J.*, vol. 466, n° 2, p. 203-218, mars 2015.
- [12] C. Magnan et A. Ktorza, « Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique », *EMC - Endocrinologie*, vol. 2, n° 4, p. 241-264, déc. 2005.
- [13] M. Prentki, « New insights into pancreatic β -cell metabolic signaling in insulin

- secretion », *Eur J Endocrinol*, vol. 134, n° 3, p. 272-286, janv. 1996.
- [14] R. Roduit *et al.*, « A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli », *Diabetes*, vol. 53, n° 4, p. 1007-1019, avr. 2004.
- [15] A. R. Saltiel et C. R. Kahn, « Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism », *Nature*, 13-déc-2001. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/414799a>. [Consulté le: 31-mai-2018].
- [16] J. M. Wells et D. A. Melton, « Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers », *Development*, vol. 127, n° 8, p. 1563-1572, avr. 2000.
- [17] R. E. Jennings, A. A. Berry, J. P. Strutt, D. T. Gerrard, et N. A. Hanley, « Human pancreas development », *Development*, vol. 142, n° 18, p. 3126-3137, sept. 2015.
- [18] B. Z. Stanger, A. J. Tanaka, et D. A. Melton, « Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver », *Nature*, vol. 445, n° 7130, p. 886-891, févr. 2007.
- [19] A. Apelqvist *et al.*, « Notch signalling controls pancreatic cell differentiation », *Nature*, vol. 400, n° 6747, p. 877-881, août 1999.
- [20] B. Sosa-Pineda, K. Chowdhury, M. Torres, G. Oliver, et P. Gruss, « The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas », *Nature*, vol. 386, n° 6623, p. 399-402, mars 1997.
- [21] P. Collombat *et al.*, « Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development », *Genes Dev*, vol. 17, n° 20, p. 2591-2603, oct. 2003.
- [22] P. Collombat *et al.*, « Embryonic endocrine pancreas and mature β cells acquire α and PP cell phenotypes upon Arx misexpression », *J Clin Invest*, vol. 117, n° 4, p. 961-970, avr. 2007.
- [23] E. Conrad, R. Stein, et C. S. Hunter, « Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development », *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 25, n° 8, p. 407-414, août 2014.
- [24] K. A. Johansson *et al.*, « Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types », *Dev. Cell*, vol. 12, n° 3, p. 457-465, mars 2007.
- [25] L. Scaglia, C. J. Cahill, D. T. Finegood, et S. Bonner-Weir, « Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat », *Endocrinology*, vol. 138, n° 4, p. 1736-1741, avr. 1997.
- [26] N. Ben-Othman *et al.*, « From pancreatic islet formation to beta-cell regeneration », *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 101, n° 1, p. 1-9, juill. 2013.

- [27] B. E. Gregg *et al.*, « Formation of a Human β -Cell Population within Pancreatic Islets Is Set Early in Life », *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 97, n° 9, p. 3197-3206, sept. 2012.
- [28] J. J. Meier *et al.*, « β -Cell Replication Is the Primary Mechanism Subservicing the Postnatal Expansion of β -Cell Mass in Humans », *Diabetes*, vol. 57, n° 6, p. 1584-1594, juin 2008.
- [29] H. C. Kaung, « Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat », *Developmental Dynamics*, vol. 200, n° 2, p. 163-175, juin 1994.
- [30] R. C. McEvoy et K. L. Madson, « Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation », *Biol. Neonate*, vol. 38, n° 5-6, p. 248-254, 1980.
- [31] S. A. Kassem, I. Ariel, P. S. Thornton, I. Scheimberg, et B. Glaser, « Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. », *Diabetes*, vol. 49, n° 8, p. 1325-1333, août 2000.
- [32] D. T. Finegood, L. Scaglia, et S. Bonner-Weir, « Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model », *Diabetes*, vol. 44, n° 3, p. 249-256, mars 1995.
- [33] E. Bernal-Mizrachi, W. Wen, S. Stahlhut, C. M. Welling, et M. A. Permutt, « Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia », *J. Clin. Invest.*, vol. 108, n° 11, p. 1631-1638, déc. 2001.
- [34] D. J. Barker, C. N. Hales, C. H. Fall, C. Osmond, K. Phipps, et P. M. Clark, « Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth », *Diabetologia*, vol. 36, n° 1, p. 62-67, janv. 1993.
- [35] D. J. P. Barker, « The developmental origins of adult disease », *J Am Coll Nutr*, vol. 23, n° 6 Suppl, p. 588S-595S, déc. 2004.
- [36] G. Gu, J. Dubauskaite, et D. A. Melton, « Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors », *Development*, vol. 129, n° 10, p. 2447-2457, mai 2002.
- [37] S. Georgia et A. Bhushan, « β cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal β cell mass », *J Clin Invest*, vol. 114, n° 7, p. 963-968, oct. 2004.
- [38] C. Jacovetti, S. J. Matkovich, A. Rodriguez-Trejo, C. Guay, et R. Regazzi, « Postnatal β -cell maturation is associated with islet-specific microRNA changes induced by nutrient shifts at weaning », *Nat Commun*, vol. 6, p. 8084, sept. 2015.

- [39] B. Reusens et C. Remacle, « Programming of the endocrine pancreas by the early nutritional environment », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 38, n° 5, p. 913-922, mai 2006.
- [40] A. C. Ravelli *et al.*, « Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine », *Lancet*, vol. 351, n° 9097, p. 173-177, janv. 1998.
- [41] T. Sparre *et al.*, « Intrauterine programming of fetal islet gene expression in rats—effects of maternal protein restriction during gestation revealed by proteome analysis », *Diabetologia*, vol. 46, n° 11, p. 1497-1511, nov. 2003.
- [42] A. Garofano, P. Czernichow, et B. Bréant, « Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat », *Diabetologia*, vol. 41, n° 9, p. 1114-1120, sept. 1998.
- [43] A. Snoeck, C. Remacle, B. Reusens, et J. J. Hoet, « Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas », *Biol. Neonate*, vol. 57, n° 2, p. 107-118, 1990.
- [44] A. Garofano, P. Czernichow, et B. Bréant, « In utero undernutrition impairs rat beta-cell development », *Diabetologia*, vol. 40, n° 10, p. 1231-1234, oct. 1997.
- [45] M. E. Cerf *et al.*, « Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy », *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 288, n° 5, p. R1122-1128, mai 2005.
- [46] R. A. Simmons, L. J. Templeton, et S. J. Gertz, « Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat », *Diabetes*, vol. 50, n° 10, p. 2279-2286, oct. 2001.
- [47] J. Hogg, V. K. Han, D. R. Clemmons, et D. J. Hill, « Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans », *J. Endocrinol.*, vol. 138, n° 3, p. 401-412, sept. 1993.
- [48] D. J. Withers, D. J. Burks, H. H. Towery, S. L. Altamuro, C. L. Flint, et M. F. White, « Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated β -cell development and peripheral insulin signalling », *Nature Genetics*, vol. 23, n° 1, p. 32-40, sept. 1999.
- [49] H. Chen *et al.*, « PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic β -cells », *Nature*, vol. 478, n° 7369, p. 349-355, oct. 2011.
- [50] G. Xu, D. A. Stoffers, J. F. Habener, et S. Bonner-Weir, « Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats », *Diabetes*, vol. 48, n° 12, p. 2270-2276, déc. 1999.
- [51] C. Tourrel, D. Bailbé, M. J. Meile, M. Kergoat, et B. Portha, « Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at

- adult age », *Diabetes*, vol. 50, n° 7, p. 1562-1570, juill. 2001.
- [52] C. Jacovetti *et al.*, « MicroRNAs modulate core-clock gene expression in pancreatic islets during early postnatal life in rats », *Diabetologia*, vol. 60, n° 10, p. 2011-2020, oct. 2017.
- [53] J. A. Kushner *et al.*, « Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β -Cell Growth », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, n° 9, p. 3752-3762, janv. 2005.
- [54] J. Krishnamurthy *et al.*, « p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential », *Nature*, vol. 443, n° 7110, p. 453-457, sept. 2006.
- [55] X.-H. Pei, F. Bai, T. Tsutsui, H. Kiyokawa, et Y. Xiong, « Genetic evidence for functional dependency of p18Ink4c on Cdk4 », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, n° 15, p. 6653-6664, août 2004.
- [56] U. Gunasekaran, C. W. Hudgens, B. T. Wright, M. F. Maulis, et M. Gannon, « Differential regulation of embryonic and adult β cell replication », *Cell Cycle*, vol. 11, n° 13, p. 2431-2442, juill. 2012.
- [57] H. Zhang *et al.*, « The FoxM1 transcription factor is required to maintain pancreatic beta-cell mass », *Mol. Endocrinol.*, vol. 20, n° 8, p. 1853-1866, août 2006.
- [58] X. Xu *et al.*, « Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas », *Cell*, vol. 132, n° 2, p. 197-207, janv. 2008.
- [59] W.-J. Song *et al.*, « Exendin-4 Stimulation of Cyclin A2 in β -Cell Proliferation », *Diabetes*, vol. 57, n° 9, p. 2371-2381, sept. 2008.
- [60] R. Lupi *et al.*, « Effects of exendin-4 on islets from type 2 diabetes patients », *Diabetes Obes Metab*, vol. 10, n° 6, p. 515-519, juin 2008.
- [61] B. L. Taylor, J. Benthuisen, et M. Sander, « Postnatal β -Cell Proliferation and Mass Expansion Is Dependent on the Transcription Factor Nkx6.1 », *Diabetes*, vol. 64, n° 3, p. 897-903, mars 2015.
- [62] M. T. Guillam *et al.*, « Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2 », *Nat. Genet.*, vol. 17, n° 3, p. 327-330, nov. 1997.
- [63] X. Wu *et al.*, « Perinatal survivin is essential for the establishment of pancreatic beta cell mass in mice », *Diabetologia*, vol. 52, n° 10, p. 2130-2141, oct. 2009.
- [64] B. Blum, S. Hrvatin, C. Schutz, C. Bonal, A. Rezaniaand, et D. A. Melton, « Functional β -cells maturation is marked by an increase in the glucose threshold for insulin secretion and by expression of urocortin3 », *Nat Biotechnol*, vol. 30, n° 3, p. 261-264, févr. 2012.
- [65] C. Hellerström et I. Swenne, « Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells », *Diabetes*, vol. 40 Suppl 2, p. 89-93, déc. 1991.

- [66] C. R. Bliss et G. W. Sharp, « Glucose-induced insulin release in islets of young rats: time-dependent potentiation and effects of 2-bromostearate », *Am. J. Physiol.*, vol. 263, n° 5 Pt 1, p. E890-896, nov. 1992.
- [67] A. Jermendy *et al.*, « Rat neonatal beta cells lack the specialised metabolic phenotype of mature beta cells », *Diabetologia*, vol. 54, n° 3, p. 594-604, mars 2011.
- [68] M. Stolovich-Rain *et al.*, « Weaning Triggers a Maturation Step of Pancreatic β Cells », *Developmental Cell*, vol. 32, n° 5, p. 535-545, mars 2015.
- [69] S. Ernst, C. Demirci, S. Valle, S. Velazquez-Garcia, et A. Garcia-Ocaña, « Mechanisms in the adaptation of maternal β -cells during pregnancy », *Diabetes Manag (Lond)*, vol. 1, n° 2, p. 239-248, mars 2011.
- [70] A. E. Butler *et al.*, « Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy », *Diabetologia*, vol. 53, n° 10, p. 2167-2176, oct. 2010.
- [71] M. Johansson, G. Mattsson, A. Andersson, L. Jansson, et P.-O. Carlsson, « Islet Endothelial Cells and Pancreatic β -Cell Proliferation: Studies in Vitro and during Pregnancy in Adult Rats », *Endocrinology*, vol. 147, n° 5, p. 2315-2324, mai 2006.
- [72] H. Kim *et al.*, « Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy », *Nature Medicine*, vol. 16, n° 7, p. 804-808, juill. 2010.
- [73] C. Huang, F. Snider, et J. C. Cross, « Prolactin Receptor Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Modulation of β -Cell Mass during Pregnancy », *Endocrinology*, vol. 150, n° 4, p. 1618-1626, avr. 2009.
- [74] S. Rieck *et al.*, « The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice », *Mol. Endocrinol.*, vol. 23, n° 10, p. 1702-1712, oct. 2009.
- [75] J. A. Parsons, T. C. Brelje, et R. L. Sorenson, « Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion », *Endocrinology*, vol. 130, n° 3, p. 1459-1466, mars 1992.
- [76] C. Toselli, C. M. Hyslop, M. Hughes, D. R. Natale, P. Santamaria, et C. T. L. Huang, « Contribution of a non- β -cell source to β -cell mass during pregnancy », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 6, p. e100398, 2014.
- [77] D. B. Davis *et al.*, « FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation », *Mol. Endocrinol.*, vol. 24, n° 9, p. 1822-1834, sept. 2010.
- [78] S. C. Hanley *et al.*, « β -Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes », *Endocrinology*, vol. 151, n° 4, p. 1462-1472, avr. 2010.
- [79] A. E. Butler *et al.*, « Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area

- and beta cell turnover in human pregnancy », *Diabetologia*, vol. 53, n° 10, p. 2167-2176, oct. 2010.
- [80] E. Montanya, V. Nacher, M. Biarnés, et J. Soler, « Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. », *Diabetes*, vol. 49, n° 8, p. 1341-1346, août 2000.
- [81] B. G. Topp, M. D. McArthur, et D. T. Finegood, « Metabolic adaptations to chronic glucose infusion in rats », *Diabetologia*, vol. 47, n° 9, p. 1602-1610, sept. 2004.
- [82] M. Tenenbaum, A. Bonnefond, P. Froguel, et A. Abderrahmani, « Physiopathologie du diabète », *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2018, n° 502, p. 26-32, mai 2018.
- [83] E. Mariño *et al.*, « Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes », *Nat. Immunol.*, vol. 18, n° 5, p. 552-562, mai 2017.
- [84] H. Beyan, L. Wen, et R. D. Leslie, « Guts, germs, and meals: the origin of type 1 diabetes », *Curr. Diab. Rep.*, vol. 12, n° 5, p. 456-462, oct. 2012.
- [85] M. Lönnrot *et al.*, « Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study », *Diabetes*, vol. 49, n° 8, p. 1314-1318, août 2000.
- [86] R. Bergholdt *et al.*, « Identification of novel type 1 diabetes candidate genes by integrating genome-wide association data, protein-protein interactions, and human pancreatic islet gene expression », *Diabetes*, vol. 61, n° 4, p. 954-962, avr. 2012.
- [87] P. Firdous *et al.*, « Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives », *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, p. 253, 2018.
- [88] R. Mishra *et al.*, « Relative contribution of type 1 and type 2 diabetes loci to the genetic etiology of adult-onset, non-insulin-requiring autoimmune diabetes », *BMC Med*, vol. 15, avr. 2017.
- [89] L. Bellamy, J.-P. Casas, A. D. Hingorani, et D. Williams, « Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis », *The Lancet*, vol. 373, n° 9677, p. 1773-1779, mai 2009.
- [90] T. D. Clausen *et al.*, « High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia », *Diabetes Care*, vol. 31, n° 2, p. 340-346, févr. 2008.
- [91] C. Demirci *et al.*, « Loss of HGF/c-Met Signaling in Pancreatic β -Cells Leads to

- Incomplete Maternal β -Cell Adaptation and Gestational Diabetes Mellitus », *Diabetes*, vol. 61, n° 5, p. 1143-1152, mai 2012.
- [92] H. Zhang *et al.*, « Gestational Diabetes Mellitus Resulting From Impaired β -Cell Compensation in the Absence of FoxM1, a Novel Downstream Effector of Placental Lactogen », *Diabetes*, vol. 59, n° 1, p. 143-152, janv. 2010.
- [93] S. Rieck et K. H. Kaestner, « Expansion of β -cell mass in response to pregnancy », *Trends Endocrinol Metab*, vol. 21, n° 3, p. 151-158, mars 2010.
- [94] W. L. Lowe, D. M. Scholtens, V. Sandler, et M. G. Hayes, « Genetics of Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Metabolism », *Curr. Diab. Rep.*, vol. 16, n° 2, p. 15, févr. 2016.
- [95] K. Mokka, N. Houttu, T. Vahlberg, E. Munukka, T. Rönnemaa, et K. Laitinen, « Gut microbiota aberrations precede diagnosis of gestational diabetes mellitus », *Acta Diabetol*, vol. 54, n° 12, p. 1147-1149, déc. 2017.
- [96] Y. M. Cho *et al.*, « Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population », *Diabetologia*, vol. 52, n° 2, p. 253-261, févr. 2009.
- [97] J. Robitaille et A. M. Grant, « The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus », *Genet. Med.*, vol. 10, n° 4, p. 240-250, avr. 2008.
- [98] S. E. Kahn, R. L. Hull, et K. M. Utzschneider, « Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes », *Nature*, vol. 444, n° 7121, p. 840-846, déc. 2006.
- [99] J. B. Meigs *et al.*, « Body Mass Index, Metabolic Syndrome, and Risk of Type 2 Diabetes or Cardiovascular Disease », *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 91, n° 8, p. 2906-2912, août 2006.
- [100] E. Masson, « Traitements oraux du diabète », *EM-Consulte*. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/10567/traitements-oraux-du-diabete>. [Consulté le: 14-juill-2018].
- [101] L. Bouwens et I. Rومان, « Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass », *Physiological Reviews*, vol. 85, n° 4, p. 1255-1270, oct. 2005.
- [102] A. E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza, et P. C. Butler, « Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes », *Diabetes*, vol. 52, n° 1, p. 102-110, janv. 2003.
- [103] S. E. Kahn *et al.*, « Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function », *Diabetes*, vol. 42, n° 11, p. 1663-1672, nov. 1993.
- [104] K. M. V. Narayan, J. P. Boyle, T. J. Thompson, E. W. Gregg, et D. F.

- Williamson, « Effect of BMI on lifetime risk for diabetes in the U.S », *Diabetes Care*, vol. 30, n° 6, p. 1562-1566, juin 2007.
- [105] A. Must, J. Spadano, E. H. Coakley, A. E. Field, G. Colditz, et W. H. Dietz, « The disease burden associated with overweight and obesity », *JAMA*, vol. 282, n° 16, p. 1523-1529, oct. 1999.
- [106] A. Schienkiewitz, M. B. Schulze, K. Hoffmann, A. Kroke, et H. Boeing, « Body mass index history and risk of type 2 diabetes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 84, n° 2, p. 427-433, août 2006.
- [107] Y. Saisho, A. E. Butler, E. Manesso, et P. C. Butler, « Response to Comment on: Saisho et al. β -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care* 2013;36:111-117 », *Diabetes Care*, vol. 36, n° 7, p. e112, juill. 2013.
- [108] S. Yoneda *et al.*, « Predominance of β -cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, n° 5, p. 2053-2061, mai 2013.
- [109] T. Mezza *et al.*, « Insulin Resistance Alters Islet Morphology in Nondiabetic Humans », *Diabetes*, vol. 63, n° 3, p. 994-1007, mars 2014.
- [110] G. M. Steil *et al.*, « Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 280, n° 5, p. E788-796, mai 2001.
- [111] R. E. Mosser *et al.*, « High-fat diet-induced β -cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 308, n° 7, p. E573-582, avr. 2015.
- [112] K. Tajima *et al.*, « Effects of metformin on compensatory pancreatic β -cell hyperplasia in mice fed a high-fat diet », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 313, n° 3, p. E367-E380, 01 2017.
- [113] L. C. Alonso *et al.*, « Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication », *Diabetes*, vol. 56, n° 7, p. 1792-1801, juill. 2007.
- [114] R. E. Stamateris *et al.*, « Glucose Induces Mouse β -Cell Proliferation via IRS2, MTOR, and Cyclin D2 but Not the Insulin Receptor », *Diabetes*, vol. 65, n° 4, p. 981-995, 2016.
- [115] R. E. Stamateris, R. B. Sharma, D. A. Hollern, et L. C. Alonso, « Adaptive β -cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression », *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 305, n° 1, p. E149-159, juill. 2013.
- [116] J. Yamamoto *et al.*, « Neuronal signals regulate obesity induced β -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, p. 1930, déc. 2017.

- [117] K. Mezghenna *et al.*, « Increased neuronal nitric oxide synthase dimerisation is involved in rat and human pancreatic beta cell hyperactivity in obesity », *Diabetologia*, vol. 54, n° 11, p. 2856-2866, nov. 2011.
- [118] S. Camastra *et al.*, « beta-cell function in morbidly obese subjects during free living: long-term effects of weight loss », *Diabetes*, vol. 54, n° 8, p. 2382-2389, août 2005.
- [119] Y. Q. Liu, T. L. Jetton, et J. L. Leahy, « beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 42, p. 39163-39168, oct. 2002.
- [120] C. J. Nolan *et al.*, « Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling », *Diabetologia*, vol. 49, n° 9, p. 2120-2130, sept. 2006.
- [121] E. Irlles *et al.*, « Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: Pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes », *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 404, p. 46-55, mars 2015.
- [122] S. A. Arslanian, F. Bacha, R. Saad, et N. Gungor, « Family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin sensitivity and an impaired balance between insulin sensitivity and insulin secretion in white youth », *Diabetes Care*, vol. 28, n° 1, p. 115-119, janv. 2005.
- [123] P. A. Halban *et al.*, « β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment », *Diabetes Care*, vol. 37, n° 6, p. 1751-1758, juin 2014.
- [124] D. Accili *et al.*, « When β -cells fail: lessons from dedifferentiation », *Diabetes Obes Metab*, vol. 18 Suppl 1, p. 117-122, sept. 2016.
- [125] C. Leloup *et al.*, « Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion », *Diabetes*, vol. 58, n° 3, p. 673-681, mars 2009.
- [126] C. Leloup *et al.*, « Balancing Mitochondrial Redox Signaling: A Key Point in Metabolic Regulation », *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 14, n° 3, p. 519-530, oct. 2010.
- [127] V. P. Bindokas, A. Kuznetsov, S. Sreenan, K. S. Polonsky, M. W. Roe, et L. H. Philipson, « Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 11, p. 9796-9801, mars 2003.
- [128] J.-P. Deglasse, L. P. Roma, D. Pastor-Flores, P. Gilon, T. P. Dick, et J.-C. Jonas, « Glucose Acutely Reduces Cytosolic and Mitochondrial H₂O₂ in Rat Pancreatic Beta Cells », *Antioxidants & Redox Signaling*, mai 2018.
- [129] H. K. Takahashi *et al.*, « Acute nutrient regulation of the mitochondrial

- glutathione redox state in pancreatic β -cells », *Biochem. J.*, vol. 460, n° 3, p. 411-423, juin 2014.
- [130] S. Lortz, E. Gurgul-Convey, O. Naujok, et S. Lenzen, « Overexpression of the antioxidant enzyme catalase does not interfere with the glucose responsiveness of insulin-secreting INS-1E cells and rat islets », *Diabetologia*, vol. 56, n° 4, p. 774-782, avr. 2013.
- [131] T. Nishikawa et E. Araki, « Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 9, n° 3, p. 343-353, mars 2007.
- [132] R. Lupi *et al.*, « Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger », *Diabetes Metab.*, vol. 33, n° 5, p. 340-345, nov. 2007.
- [133] J. L. Evans, I. D. Goldfine, B. A. Maddux, et G. M. Grodsky, « Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction? », *Diabetes*, vol. 52, n° 1, p. 1-8, janv. 2003.
- [134] M. Y. Donath, J. Størling, K. Maedler, et T. Mandrup-Poulsen, « Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes », *J Mol Med*, vol. 81, n° 8, p. 455-470, août 2003.
- [135] F. Brozzi *et al.*, « Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms », *Diabetologia*, vol. 58, n° 10, p. 2307-2316, oct. 2015.
- [136] Y. Li *et al.*, « Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 35, p. 37030-37039, août 2004.
- [137] M. C. Akerfeldt *et al.*, « Cytokine-induced beta-cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling », *Diabetes*, vol. 57, n° 11, p. 3034-3044, nov. 2008.
- [138] E. Bachar, Y. Ariav, M. Ketzinel-Gilad, E. Cerasi, N. Kaiser, et G. Leibowitz, « Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1 », *PLoS ONE*, vol. 4, n° 3, p. e4954, 2009.
- [139] I. Kharroubi, L. Ladrière, A. K. Cardozo, Z. Dogusan, M. Cnop, et D. L. Eizirik, « Free Fatty Acids and Cytokines Induce Pancreatic β -Cell Apoptosis by Different Mechanisms: Role of Nuclear Factor- κ B and Endoplasmic Reticulum Stress », *Endocrinology*, vol. 145, n° 11, p. 5087-5096, nov. 2004.
- [140] C. M. O'Neill *et al.*, « Circulating levels of IL-1 β +IL-6 cause ER stress and dysfunction in islets from prediabetic male mice », *Endocrinology*, vol. 154, n°

- 9, p. 3077-3088, sept. 2013.
- [141] I. Tabas et D. Ron, « Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress », *Nature Cell Biology*, vol. 13, n° 3, p. 184-190, mars 2011.
- [142] B. Song, D. Scheuner, D. Ron, S. Pennathur, et R. J. Kaufman, « Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes », *J. Clin. Invest.*, vol. 118, n° 10, p. 3378-3389, oct. 2008.
- [143] F. Brozzi *et al.*, « Ubiquitin D Regulates IRE1 α /c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Protein-dependent Apoptosis in Pancreatic Beta Cells », *J Biol Chem*, vol. 291, n° 23, p. 12040-12056, juin 2016.
- [144] W. Zhang, D. Feng, Y. Li, K. Iida, B. McGrath, et D. R. Cavener, « PERK EIF2AK3 control of pancreatic β cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis », *Cell Metabolism*, vol. 4, n° 6, p. 491-497, déc. 2006.
- [145] S. H. Back *et al.*, « Translation attenuation through eIF2 α phosphorylation prevents oxidative stress and maintains the differentiated state in beta cells », *Cell Metab.*, vol. 10, n° 1, p. 13-26, juill. 2009.
- [146] K. L. Lipson *et al.*, « Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1 », *Cell Metab.*, vol. 4, n° 3, p. 245-254, sept. 2006.
- [147] M. Usui *et al.*, « Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance », *Metab. Clin. Exp.*, vol. 61, n° 8, p. 1118-1128, août 2012.
- [148] M. Cnop, F. Foufelle, et L. A. Velloso, « Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes », *Trends Mol Med*, vol. 18, n° 1, p. 59-68, janv. 2012.
- [149] P. Holvoet *et al.*, « The Metabolic Syndrome, Circulating Oxidized LDL, and Risk of Myocardial Infarction in Well-Functioning Elderly People in the Health, Aging, and Body Composition Cohort », *Diabetes*, vol. 53, n° 4, p. 1068-1073, avr. 2004.
- [150] M. Nakhjavani *et al.*, « Serum oxidized-LDL is associated with diabetes duration independent of maintaining optimized levels of LDL-cholesterol », *Lipids*, vol. 45, n° 4, p. 321-327, avr. 2010.
- [151] A. Abderrahmani *et al.*, « Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells », *Diabetologia*, vol. 50, n° 6, p. 1304-1314, juin 2007.
- [152] J. Pétremand *et al.*, « HDLs protect pancreatic β -cells against ER stress by

- restoring protein folding and trafficking », *Diabetes*, vol. 61, n° 5, p. 1100-1111, mai 2012.
- [153] M. Kawamura, J. W. Heinecke, et A. Chait, « Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway », *J. Clin. Invest.*, vol. 94, n° 2, p. 771-778, août 1994.
- [154] A. Liguori *et al.*, « Effect of glycaemic control and age on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in diabetes mellitus type 1 », *Eur. Heart J.*, vol. 22, n° 22, p. 2075-2084, nov. 2001.
- [155] H. Yoshida et R. Kisugi, « Mechanisms of LDL oxidation », *Clin. Chim. Acta*, vol. 411, n° 23-24, p. 1875-1882, déc. 2010.
- [156] F. Okajima *et al.*, « Oxidized but not acetylated low-density lipoprotein reduces preproinsulin mRNA expression and secretion of insulin from HIT-T15 cells », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1687, n° 1-3, p. 173-180, févr. 2005.
- [157] D. Favre *et al.*, « Role for inducible cAMP early repressor in promoting pancreatic beta cell dysfunction evoked by oxidative stress in human and rat islets », *Diabetologia*, vol. 54, n° 9, p. 2337-2346, 2011.
- [158] J.-A. Haefliger *et al.*, « Reduction of connexin36 content by ICER-1 contributes to insulin-secreting cells apoptosis induced by oxidized LDL particles », *PLoS ONE*, vol. 8, n° 1, p. e55198, 2013.
- [159] A. Chaudhury *et al.*, « Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management », *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 8, p. 6, 2017.
- [160] R. L. Tuttle *et al.*, « Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha », *Nat. Med.*, vol. 7, n° 10, p. 1133-1137, oct. 2001.
- [161] T. Yuan, B. Lups, K. Maedler, et A. Ardestani, « mTORC2 Signaling: A Path for Pancreatic β Cell's Growth and Function », *J. Mol. Biol.*, vol. 430, n° 7, p. 904-918, mars 2018.
- [162] S. Abdelli *et al.*, « JNK3 is abundant in insulin-secreting cells and protects against cytokine-induced apoptosis », *Diabetologia*, vol. 52, n° 9, p. 1871-1880, sept. 2009.
- [163] L. H. Osaki et P. Gama, « MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation », *Int J Mol Sci*, vol. 14, n° 5, p. 10143-10161, mai 2013.
- [164] M. Cargnello et P. P. Roux, « Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases », *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 75, n° 1, p. 50-83, mars 2011.

- [165] I. Briaud, M. K. Lingohr, L. M. Dickson, C. E. Wrede, et C. J. Rhodes, « Differential Activation Mechanisms of Erk-1/2 and p70S6K by Glucose in Pancreatic β -Cells », *Diabetes*, vol. 52, n° 4, p. 974-983, avr. 2003.
- [166] M. Leduc *et al.*, « ERK1 is dispensable for mouse pancreatic beta cell function but is necessary for glucose-induced full activation of MSK1 and CREB », *Diabetologia*, vol. 60, n° 10, p. 1999-2010, oct. 2017.
- [167] S. B. Widenmaier, Z. Ao, S.-J. Kim, G. Warnock, et C. H. S. McIntosh, « Suppression of p38 MAPK and JNK via Akt-mediated inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 constitutes a core component of the beta-cell pro-survival effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 44, p. 30372-30382, oct. 2009.
- [168] G. Zhou *et al.*, « p38 MAP kinase interacts with and stabilizes pancreatic and duodenal homeobox-1 », *Curr. Mol. Med.*, vol. 13, n° 3, p. 377-386, mars 2013.
- [169] A. Zeke, M. Misheva, A. Reményi, et M. A. Bogoyevitch, « JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships », *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 80, n° 3, p. 793-835, juill. 2016.
- [170] C. Guo et A. J. Whitmarsh, « The β -Arrestin-2 Scaffold Protein Promotes c-Jun N-terminal Kinase-3 Activation by Binding to Its Nonconserved N Terminus », *J Biol Chem*, vol. 283, n° 23, p. 15903-15911, juin 2008.
- [171] L. Carboni, R. Carletti, S. Tacconi, C. Corti, et F. Ferraguti, « Differential expression of SAPK isoforms in the rat brain. An in situ hybridisation study in the adult rat brain and during post-natal development », *Molecular Brain Research*, vol. 60, n° 1, p. 57-68, sept. 1998.
- [172] G. Solinas et B. Becattini, « JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response », *Mol Metab*, vol. 6, n° 2, p. 174-184, déc. 2016.
- [173] S. Gupta *et al.*, « Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. », *EMBO J*, vol. 15, n° 11, p. 2760-2770, juin 1996.
- [174] J.-J. Ventura, A. Hübner, C. Zhang, R. A. Flavell, K. M. Shokat, et R. J. Davis, « Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK », *Mol. Cell*, vol. 21, n° 5, p. 701-710, mars 2006.
- [175] Y. R. Chen, X. Wang, D. Templeton, R. J. Davis, et T. H. Tan, « The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 50, p. 31929-31936, déc. 1996.
- [176] I. Sánchez-Perez, J. R. Murguía, et R. Perona, « Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death », *Oncogene*, vol. 16, n° 4, p. 533-540, janv. 1998.
- [177] M. Brown *et al.*, « An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response », *J. Cell. Sci.*, vol. 129, n° 12, p.

2317-2328, 15 2016.

- [178] J. Hayakawa *et al.*, « Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress », *Mol. Cell*, vol. 16, n° 4, p. 521-535, nov. 2004.
- [179] G. Tuncman, J. Hirosumi, G. Solinas, L. Chang, M. Karin, et G. S. Hotamisligil, « Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, n° 28, p. 10741-10746, juill. 2006.
- [180] R. Singh, Y. Wang, Y. Xiang, K. E. Tanaka, W. A. Gaarde, et M. J. Czaja, « Differential Effects of JNK1 and JNK2 Inhibition on Murine Steatohepatitis and Insulin Resistance », *Hepatology*, vol. 49, n° 1, p. 87-96, janv. 2009.
- [181] A. Jaeschke *et al.*, « Disruption of the Jnk2 (Mapk9) gene reduces destructive insulinitis and diabetes in a mouse model of type I diabetes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, n° 19, p. 6931-6935, mai 2005.
- [182] V. Aguirre, E. D. Werner, J. Giraud, Y. H. Lee, S. E. Shoelson, et M. F. White, « Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 2, p. 1531-1537, janv. 2002.
- [183] G. Solinas, W. Naugler, F. Galimi, M.-S. Lee, et M. Karin, « Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, n° 44, p. 16454-16459, oct. 2006.
- [184] S. Vernia *et al.*, « The PPAR α -FGF21 hormone axis contributes to metabolic regulation by the hepatic JNK signaling pathway », *Cell Metab.*, vol. 20, n° 3, p. 512-525, sept. 2014.
- [185] D. Kawamori *et al.*, « Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase », *Diabetes*, vol. 52, n° 12, p. 2896-2904, déc. 2003.
- [186] H. Kaneto, G. Xu, N. Fujii, S. Kim, S. Bonner-Weir, et G. C. Weir, « Involvement of c-Jun N-terminal Kinase in Oxidative Stress-mediated Suppression of Insulin Gene Expression », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 33, p. 30010-30018, août 2002.
- [187] J. Lanuza-Masdeu, M. I. Arévalo, C. Vila, A. Barberà, R. Gomis, et C. Caelles, « In Vivo JNK Activation in Pancreatic β -Cells Leads to Glucose Intolerance Caused by Insulin Resistance in Pancreas », *Diabetes*, vol. 62, n° 7, p. 2308-2317, juill. 2013.
- [188] S. Balakrishnan, M. Sadasivam, A. Kannan, A. Panneerselvam, et C. Prahalthan, « Glucose modulates Pax6 expression through the JNK/p38 MAP kinase pathway in pancreatic beta-cells », *Life Sciences*, vol. 109, n° 1, p. 1-7,

juill. 2014.

- [189] G. L. Robinson, E. Henderson, M. E. Massari, C. Murre, et R. Stein, « c-jun inhibits insulin control element-mediated transcription by affecting the transactivation potential of the E2A gene products », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, n° 3, p. 1398-1404, mars 1995.
- [190] A. Natalicchio *et al.*, « Exendin-4 protects pancreatic beta cells from palmitate-induced apoptosis by interfering with GPR40 and the MKK4/7 stress kinase signalling pathway », *Diabetologia*, vol. 56, n° 11, p. 2456-2466, nov. 2013.
- [191] A. Natalicchio *et al.*, « Exendin-4 prevents c-Jun N-terminal protein kinase activation by tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) and inhibits TNFalpha-induced apoptosis in insulin-secreting cells », *Endocrinology*, vol. 151, n° 5, p. 2019-2029, mai 2010.
- [192] M. Ferdaoussi *et al.*, « Exendin-4 protects beta-cells from interleukin-1 beta-induced apoptosis by interfering with the c-Jun NH2-terminal kinase pathway », *Diabetes*, vol. 57, n° 5, p. 1205-1215, mai 2008.
- [193] M. Prause *et al.*, « JNK1 Deficient Insulin-Producing Cells Are Protected against Interleukin-1 β -Induced Apoptosis Associated with Abrogated Myc Expression », *J Diabetes Res*, vol. 2016, p. 1312705, 2016.
- [194] A. T. Templin *et al.*, « Apoptosis Repressor With Caspase Recruitment Domain Ameliorates Amyloid-Induced β -Cell Apoptosis and JNK Pathway Activation », *Diabetes*, vol. 66, n° 10, p. 2636-2645, 2017.
- [195] S. M. Abaraviciene, I. Lundquist, et A. Salehi, « Rosiglitazone counteracts palmitate-induced beta-cell dysfunction by suppression of MAP kinase, inducible nitric oxide synthase and caspase 3 activities », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, n° 14, p. 2256-2265, juill. 2008.
- [196] X. Antoniou, M. Falconi, D. Di Marino, et T. Borsello, « JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases », *J. Alzheimers Dis.*, vol. 24, n° 4, p. 633-642, 2011.
- [197] E. Keramaris *et al.*, « c-Jun N-terminal kinase 3 deficiency protects neurons from axotomy-induced death in vivo through mechanisms independent of c-Jun phosphorylation », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 2, p. 1132-1141, janv. 2005.
- [198] X. Wei *et al.*, « Targeting the Dvl-1/ β -arrestin2/JNK3 interaction disrupts Wnt5a-JNK3 signaling and protects hippocampal CA1 neurons during cerebral ischemia reperfusion », *Neuropharmacology*, vol. 135, p. 11-21, juin 2018.
- [199] D. D. Yang *et al.*, « Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene », *Nature*, vol. 389, n° 6653, p. 865-870, oct. 1997.
- [200] C.-Y. Kuan *et al.*, « A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, n° 25, p. 15184-15189, déc.

2003.

- [201] B.-S. Li *et al.*, « Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3 », *EMBO J.*, vol. 21, n° 3, p. 324-333, févr. 2002.
- [202] S.-H. Qi *et al.*, « Neuroprotection of ethanol against ischemia/reperfusion-induced brain injury through decreasing c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) activation by enhancing GABA release », *Neuroscience*, vol. 167, n° 4, p. 1125-1137, juin 2010.
- [203] W. T. Kimberly, J. B. Zheng, T. Town, R. A. Flavell, et D. J. Selkoe, « Physiological Regulation of the β -Amyloid Precursor Protein Signaling Domain by c-Jun N-Terminal Kinase JNK3 during Neuronal Differentiation », *J. Neurosci.*, vol. 25, n° 23, p. 5533-5543, juin 2005.
- [204] V. Waetzig et T. Herdegen, « A Single c-Jun N-terminal Kinase Isoform (JNK3-p54) Is an Effector in Both Neuronal Differentiation and Cell Death », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 1, p. 567-572, mars 2003.
- [205] H. Ezanno *et al.*, « JNK3 is required for the cytoprotective effect of exendin 4 », *J Diabetes Res*, vol. 2014, p. 814854, 2014.
- [206] S. Abdelli, K. K. Papas, K. R. Mueller, M. P. Murtaugh, B. J. Hering, et C. Bonny, « Regulation of the JNK3 signaling pathway during islet isolation: JNK3 and c-fos as new markers of islet quality for transplantation », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 7, p. e99796, 2014.
- [207] S. Abdelli et C. Bonny, « JNK3 maintains expression of the insulin receptor substrate 2 (IRS2) in insulin-secreting cells: functional consequences for insulin signaling », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 5, p. e35997, 2012.
- [208] L. B. Holzman, S. E. Merritt, et G. Fan, « Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. », *J. Biol. Chem.*, vol. 269, n° 49, p. 30808-30817, sept. 1994.
- [209] A. S. Ghosh, B. Wang, C. D. Pozniak, M. Chen, R. J. Watts, et J. W. Lewcock, « DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity », *J. Cell Biol.*, vol. 194, n° 5, p. 751-764, sept. 2011.
- [210] V. Valakh, E. Frey, E. Babetto, L. J. Walker, et A. DiAntonio, « Cytoskeletal disruption activates the DLK/JNK pathway, which promotes axonal regeneration and mimics a preconditioning injury », *Neurobiol Dis*, vol. 77, p. 13-25, mai 2015.
- [211] G. Fan, S. E. Merritt, M. Kortenjann, P. E. Shaw, et L. B. Holzman, « Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2 », *J. Biol. Chem.*, vol. 271, n° 40, p. 24788-24793, oct. 1996.
- [212] S. E. Merritt, M. Mata, D. Nihalani, C. Zhu, X. Hu, et L. B. Holzman, « The

- mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 15, p. 10195-10202, avr. 1999.
- [213] D. Ferraris, Z. Yang, et D. Welsbie, « Dual leucine zipper kinase as a therapeutic target for neurodegenerative conditions », *Future Med Chem*, vol. 5, n° 16, p. 1923-1934, oct. 2013.
- [214] J. E. Shin, Y. Cho, B. Beirowski, J. Milbrandt, V. Cavalli, et A. DiAntonio, « Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration », *Neuron*, vol. 74, n° 6, p. 1015-1022, juin 2012.
- [215] P. Nix, N. Hisamoto, K. Matsumoto, et M. Bastiani, « Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, n° 26, p. 10738-10743, juin 2011.
- [216] S. Hirai, A. Kawaguchi, R. Hirasawa, M. Baba, T. Ohnishi, et S. Ohno, « MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo », *Development*, vol. 129, n° 19, p. 4483-4495, oct. 2002.
- [217] S. Huntwork-Rodriguez *et al.*, « JNK-mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis », *J. Cell Biol.*, vol. 202, n° 5, p. 747-763, sept. 2013.
- [218] S. Borchers *et al.*, « TNF α -induced DLK activation contributes to apoptosis in the beta-cell line HIT », *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, vol. 390, n° 8, p. 813-825, août 2017.
- [219] M.-J. Stahnke *et al.*, « Inhibition of human insulin gene transcription and MafA transcriptional activity by the dual leucine zipper kinase », *Cell. Signal.*, vol. 26, n° 9, p. 1792-1799, sept. 2014.
- [220] M. Wallbach *et al.*, « Distinct functions of the dual leucine zipper kinase depending on its subcellular localization », *Cell. Signal.*, vol. 28, n° 4, p. 272-283, avr. 2016.
- [221] V. Plaisance *et al.*, « Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 9, p. e0163046, 2016.
- [222] T. Scholzen et J. Gerdes, « The Ki-67 protein: from the known and the unknown », *J. Cell. Physiol.*, vol. 182, n° 3, p. 311-322, mars 2000.
- [223] D. L. Eizirik, A. K. Cardozo, et M. Cnop, « The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus », *Endocr. Rev.*, vol. 29, n° 1, p. 42-61, févr. 2008.
- [224] S. Park *et al.*, « Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 2, p. 1159-1168, janv. 2006.
- [225] C. L. May et K. H. Kaestner, « Gut Endocrine Cell Development », *Mol Cell Endocrinol*, vol. 323, n° 1, p. 70-75, juill. 2010.

- [226] C. Dai *et al.*, « Age-dependent human β cell proliferation induced by glucagon-like peptide 1 and calcineurin signaling », *J Clin Invest*, vol. 127, n° 10, p. 3835-3844, oct. 2017.
- [227] B. Yusta *et al.*, « GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress », *Cell Metab.*, vol. 4, n° 5, p. 391-406, nov. 2006.
- [228] Y. Gao *et al.*, « PERK Is Required in the Adult Pancreas and Is Essential for Maintenance of Glucose Homeostasis », *Molecular and Cellular Biology*, vol. 32, n° 24, p. 5129, déc. 2012.
- [229] M. Prentki et C. J. Nolan, « Islet beta cell failure in type 2 diabetes », *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n° 7, p. 1802-1812, juill. 2006.
- [230] H. Kaneto *et al.*, « Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 38, n° 5-6, p. 782-793, 2006.
- [231] G. Leonarduzzi *et al.*, « Early involvement of ROS overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, n° 3-4, p. 375-380, avr. 2006.
- [232] Y. Kanda *et al.*, « Dietary restriction preserves the mass and function of pancreatic β cells via cell kinetic regulation and suppression of oxidative/ER stress in diabetic mice », *J. Nutr. Biochem.*, vol. 26, n° 3, p. 219-226, mars 2015.
- [233] P.-C. Wei *et al.*, « Loss of the oxidative stress sensor NPGPx compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease », *Mol. Cell*, vol. 48, n° 5, p. 747-759, déc. 2012.
- [234] T. Verfaillie *et al.*, « PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress », *Cell Death Differ.*, vol. 19, n° 11, p. 1880-1891, nov. 2012.