



HAL
open science

Rôle des interactions entre la mitochondrie et le reticulum endoplasmique dans les défauts de sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques au cours du diabète de type 2

Florian Dingreville

► **To cite this version:**

Florian Dingreville. Rôle des interactions entre la mitochondrie et le reticulum endoplasmique dans les défauts de sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques au cours du diabète de type 2. Endocrinologie et métabolisme. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1341 . tel-02420531v2

HAL Id: tel-02420531

<https://theses.hal.science/tel-02420531v2>

Submitted on 20 Dec 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.



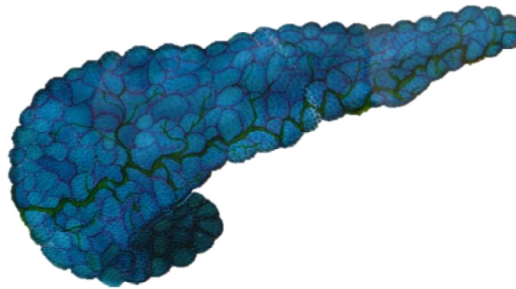
N°d'ordre NNT : 2018LYSE12341

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1
Ecole Doctorale N° ED 205
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

Spécialité de doctorat : Biologie
Discipline : Métabolisme

Soutenue publiquement le 19 décembre 2018, par :
Florian DINGREVILLE

**ROLE DES INTERACTIONS ENTRE LA MITOCHONDRIE ET LE RETICULUM
ENDOPLASMIQUE DANS LES DEFAUTS DE SECRETION D'INSULINE PAR LES
CELLULES BETA PANCREATIQUES AU COURS DU DIABETE DE TYPE 2**



Devant le jury composé de :

Van Coppenolle, Fabien Pinget, Michel	PU PU	CarMeN U1060 CEED	Président Examineur
Blondeau, Bertrand Bouzakri, Karim Ravier, Magalie	MCF Research Leader CR	INSERM UMRS938 CEED U1191	Rapporteur Rapporteur Rapportrice
Thivolet, Charles Madec, Anne-Marie	PU-PH MCF	CarMeN U1060 CarMeN U1060	Directeur de thèse Co-directrice de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Hubert Vidal, le directeur de CarMeN, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant ces 3 années de thèse. Je remercie également les membres du jury et les rapporteurs pour avoir évalué mon travail et pour leur participation à ma thèse.

Je remercie particulièrement mon encadrante, Anne-Marie Madec, pour m'avoir laissé une grande autonomie dans mon travail et pour m'avoir donné la chance de participer à de nombreux congrès. Merci pour vos conseils bienveillants et votre patience, ainsi que pour la correction des nombreuses fautes d'orthographe dans mon manuscrit...

Je remercie chaleureusement Jennifer Rieusset pour ses précieux conseils aussi bien techniques que scientifiques qui m'ont permis d'avancer grandement durant ma thèse. Je la remercie également énormément pour son implication dans mon article et le manuscrit de thèse qui m'ont permis d'avancer plus vite et plus sereinement.

Je remercie également Charles Thivolet pour son œil expert et sa vision plus proche du patient que ma vision plutôt théorique.

Un grand merci à toute l'équipe 3 et particulièrement à MAC, qui m'a bien aidé pour les WB, et pour sa bonne humeur quotidienne !

Merci aussi à mes collègues de bureaux actuels ou lointains. Une pensée se tourne vers Marine et nos plans machiavéliques. Benoît pour nos paris audacieux et nos réflexions philosophiques sur la vie. Jiji pour sa gentillesse sans limite et sa faculté à nous engraisser de sucreries. Murielle pour ses conseils et Céline pour tous les délires ensemble et nos pétages de plomb respectifs pour n'en citer que quelques-uns pour la postérité : « Et alors ! », « Ferme cette porte », « Elle-même ! », « Cougnou », « J'ai pas touché le gâteau ! ».

Je remercie également Christine, Béatrice, Guillaume, Kassem, Assia, Anne et Baptiste toujours à l'écoute pour leurs conseils et nos grands moments de réflexion.

Merci aux filles Aurélie, Stéphanie et Marie-Ambre pour nos moments de solitude et de sollicitude au microscope ^^

Merci aussi à toi Pascal pour ta bienveillance et ta gentillesse.

Merci au plateau génomique, spécialement à Sandra et Manu pour nos grands moments de fous rires ! Merci aussi à Emmanuelle M et Emmanuel C, respectivement pour leurs conseils et pour la sortie spéléo !

Merci à toute l'équipe à Rockfeller, Yves le breton pour ses conseils et sa qualité de zhytologue, Nolwenn la naine pour ses conseils. Fabien et Sylvie pour leurs conseils et merci à tous les autres !

Une pensée se tourne aussi vers les anciens thésards Manu Labaronne, Caro, Sabrina, Vanessa et mon partenaire de course Romain pour les moments passés avec eux.

Merci à Clémence pour sa gentillesse et ses conseils techniques plus qu'indispensables à la finalisation de ce manuscrit !

Je ne vous ai pas oubliés, les meilleurs pour la fin !

Merci à Sharkyky d'avoir été mon plus grand soutien moral pendant ces 3 années, malgré mes hauts très hauts et mes bas très bas ! Bref je t'adore !! #PAMM #BFF

Merci à maman Marwa, #youarethesunshineofmylife, #Habibi. Te côtoyer a été un grand plaisir et toujours une source de bonne humeur ! Merci aussi pour tes conseils de dernière minute sur la thèse ;)

Major Bassot de la BAC de Lyon Sud, merci pour ces 3 années de délires et de fun au labo ou en dehors ! Sans compter l'énorme soutien moral ! J'ai hâte d'être à ta thèse, c'est toi le prochain maintenant haha ! Merci je t'adore mon grand !

Merci à Agathe, comble de l'optimisme pour contrer mon pessimisme ! #Yougottheinvitation #Yougottherightadress #Younedsomemedication #TheanswerisalwaysYES. Les chants de Noël de Michael Bublé en ta compagnie vont me manquer !

Merci à Camille pour sa naïveté qui m'a fait beaucoup rire :p Nos disputes chien/chat vont quand même me manquer !! Et ton fameux « Niboux » ☺. Merci aussi à Eric pour le farniente et les purs moments d'escalade en plein air !

Merci à tous les étudiants de passage ainsi que les derniers arrivés : Guillain, Quentin, Joël, Mathilde, Johan, Julien et Pauline !

P'tit clin d'œil aussi à mes stagiaires : Jonathan, Axel, Christina et Margaux qui m'ont aidé dans mon travail !

Enfin, merci à tous mes amis extérieurs au labo qui m'ont permis de décompresser quand j'en avais besoin ! Particulièrement Nico et le saint climb, notre trio avec Julie et Mathieu, mes amours Julie et Doëtte, mes coups de cœur Faustine et Julien, Albert et Mélanie, Marine D et la copine Marine M, Florian V sans compter mes plus vieux amis David et Mehdi.

Un grand merci aussi à ma famille pour leur soutien, particulièrement à mes parents, ma sœur Chloé et ma p'tite nièce trop choute Coco !

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Table des matières

Titre/Résumé/Mots-clés	9
Title/Abstract/Key words	10
Abréviations	11
Avant-propos.....	17
Publications	19
Congrès/communications en 1 ^{er} auteur	20
INTRODUCTION	22
<u>Partie 1 : Physiologie de la cellule β</u>.....	23
1) La cellule β au centre du métabolisme.....	23
1.1) Localisation/Structure	23
1.2) Rôle clé de l'îlot dans la régulation de la glycémie.....	24
1.2.1) La cellules α	24
1.2.2) La cellules β	25
1.2.3) La cellule δ	25
1.2.4) La cellule PP.....	26
1.2.5) La cellule ϵ	25
1.3) La sécrétion d'insuline en réponse au glucose et action de l'insuline.....	26
1.3.1) Sécrétion d'insuline en réponse au glucose.....	26
1.3.2) Action de l'insuline	30
1.4) Les voies de potentialisation de la sécrétion d'insuline	32
1.5) Les voies d'inhibition de la sécrétion d'insuline	34
2) Rôle clé de deux organites dans la fonction β, le réticulum endoplasmique et la mitochondrie	35
2.1) Réticulum Endoplasmique (RE)	35
2.1.1) Structure.....	35
2.1.2) Fonctions	37
2.2) Mitochondrie.....	39
2.2.1) Structure.....	39
2.2.2) Fonctions	41
2.2.3) Dynamique mitochondriale	48

Partie 2 : Dysfonction de la cellule β et diabète de type 2	53
1) Généralités sur le diabète de type 2	53
2) Dysfonction β pancréatique, une caractéristique du diabète de type 2.....	55
2.1) Lipotoxicité	56
2.1.1) Métabolisme lipidique.....	56
2.1.2) Difficultés du modèle de lipotoxicité	56
2.1.3) Dysfonction β pancréatique et lipotoxicité.....	57
2.2) Glucotoxicité.....	59
2.2.1) Métabolisme glucidique	59
2.2.2) Difficultés du modèle de glucotoxicité.....	59
2.2.3) Glucotoxicité et dysfonction β pancréatique.....	59
2.3) Dédifférenciation β	63
3) Rôle du RE et de la mitochondrie dans la dysfonction β pancréatique associée à la glucotoxicité/lipotoxicité et le diabète de type 2	64
3.1) Stress du RE : UPR.....	64
3.1.1) La voie PERK-eIF2-ATF4	65
3.1.2) La voie IRE1-sXBP1	66
3.1.3) La voie ATF6	66
3.1.4) Stress du RE – dysfonction cellule β -Diabète monogénique.....	67
3.1.5) Stress du RE – dysfonction cellule β -Gluc/Lipotoxicité	67
3.2) Stress mitochondrial	69
3.2.1) Structure/Dynamique mitochondriale dans la cellule β	69
3.2.2) Dysfonction mitochondriale-Glucotoxicité/Lipotoxicité-Diabète de type 2.....	71
3.2.3) Stress Oxydant : ROS	72
3.2.4) UPR mitochondrial	76
3.3) Perturbation de l'homéostasie calcique.....	77
3.3.1) IP3R	79
3.3.2) Oscillations calciques dans l'îlot de Langerhans.....	80
Partie 3 : MAMs : Mitochondria-Associated ER Membranes	81
1) Découverte des MAMs	82
2) Ultrastructure des MAMs.....	82
3) Structure/Fonctions des MAMs	84
3.1) Biosynthèse lipidique.....	85

3.1.1) Les MAMs, une zone d'échange et de biosynthèse des lipides.....	85
3.1.2) Les complexes impliqués dans les échanges lipidiques RE-mitochondries	86
3.2) Les échanges calciques	88
3.3) Dynamique mitochondriale	95
3.3.1) Rôle des MAMs dans la dynamique mitochondriale	95
3.3.2) Les protéines aux MAMs intervenant dans la dynamique mitochondriale	97
3.4) Stress RE et MAMs.....	101
3.5) Autophagie/Mitophagie et MAMs	102
3.6) Lien distance des contacts/fonctions	103
4) Techniques d'étude des MAMs.....	104
4.1) Etude Ultra-structurale des MAMs.....	106
4.1.1) Microscopie Electronique (ME).....	106
4.1.2) Co-Immuno-Fluorescence (Co-IF)	106
4.1.3) Proximity Ligation Assay (PLA)	107
4.1.4) FRET.....	107
4.2) Etude de la composition protéique des MAMs	108
4.3) Etude fonctionnelle des MAMs	109
4.3.1) Signalisation calcique	109
4.3.2) Echanges lipidiques	109
4.4) Modulation des MAMs	110
4.4.1) Linker.....	110
4.4.2) FATE1: Spacer.....	111
5) Physiopathologie des MAMs	112
5.1) Pathologies associées aux MAMs	112
5.1.1) Les MAMs dans les processus inflammatoires et les pathologies associées	113
5.1.2) Les MAMs et les pathologies neurodégénératives	114
5.1.3) Les MAMs et le cancer.....	115
5.1) Rôle des MAMs dans l'insulino-résistance hépatique, musculaire et adipocytaire	115
5.2.1) Le foie	116
5.2.2) Le muscle	118
5.1.3) Le tissu adipeux	118
5.3) Rôle des MAMs dans la cellule β pancréatique	119

RESULTATS	120
<u>Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité.</u>.....	123
1) Résumé	123
2) Article 1.....	125
<u>Partie 2 : Etude de l'effet de la glucotoxicité sur les oscillations calciques cytosoliques.</u>...159	
<u>Partie 3 : Etude de la sous-expression de différentes protéines des MAMs : Mfn2, Grp75, CypD.</u>.....	164
<u>Partie 4 : Rôle protecteur de la modulation du translocon dans les effets délétères de la lipotoxicité</u>	167
1) Résumé	167
2) Article n°2.....	169
DISCUSSION.....	187
Comment les MAMs participent au contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ?	190
Implication de la dynamique mitochondriale dans le contrôle de la sécrétion d'insuline ?.....	190
D'où provient ce défaut de transfert calcique lié à la glucotoxicité ?	192
Stress du RE ou stress mitochondrial à qui la faute ?	196
Glucolipotoxicité des mécanismes similaires ou pas ?	197
Conclusions et perspectives.....	200
BIBLIOGRAPHIE.....	201

Titre :

Rôle des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique dans les défauts de sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques au cours du diabète de type 2.

Résumé :

La **mitochondrie** et le **réticulum endoplasmique (RE)** forment un réseau dans les cellules qui contrôle la fonction et le destin cellulaire. La mitochondrie de la cellule β pancréatique joue un rôle central dans la **sécrétion d'insuline** en réponse au glucose de par sa capacité à produire de l'ATP. Le RE lui prend en charge la mise en conformation de l'insuline et joue le rôle de stock calcique. Ces deux organites se rejoignent au niveau de points de contact appelés **Mitochondria Associated endoplasmic reticulum Membranes (MAMs)**. Les MAMs sont le siège d'**échanges calciques** et lipidiques entre les 2 organites. Les altérations de la mitochondrie et du RE ont été montrées comme des facteurs contribuant au développement du **diabète de type 2**. L'implication des MAMs n'a cependant jamais été étudiée dans la cellule β .

La **glucotoxicité** provoquée par une exposition chronique à des concentrations élevées de glucose, est un facteur clé de la dysfonction β pancréatique au cours du diabète de type 2. J'ai pu démontrer que la glucotoxicité augmentait la fission mitochondriale et le nombre de MAMs dans les cellules β humaines et INS-1E mais que ces MAMs présentaient des défauts d'échanges calciques, pouvant ainsi contribuer au défaut de la sécrétion d'insuline. J'ai ensuite modulé les MAMs soit via une stimulation aigue au glucose soit par l'utilisation d'un siRNA qui rompt partiellement les contacts entre le RE et la mitochondrie ou par l'utilisation d'un linker qui artificiellement force ces contacts. La stimulation aigue au glucose augmente les MAMs et le transfert de calcium du RE vers la mitochondrie alors que la rupture des contacts diminue la sécrétion d'insuline. Enfin le linker en forçant les rapprochements RE-mitochondrie, mime les effets de la glucotoxicité.

Ce travail, constitue la première étude structurelle et fonctionnelle des MAMs dans la cellule β pancréatique, éclairant leur rôle dans la dysfonction β pancréatique lors du développement du diabète de type 2.

Mots Clés : Mitochondrie, RE, MAMs, Diabète de type 2, Glucotoxicité, Sécrétion d'insuline, Calcium.

Title :

Role of the interactions between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in the pancreatic beta cell failure during type 2 diabetes.

Abstract :

Mitochondria and **endoplasmic reticulum (ER)** form a network in cells that control cellular function and fate. Mitochondria play a central role in **insulin secretion** in β cell by its ability to product ATP. ER takes in charge of insulin folding and is the major cell calcium store. Both organelles interact at contact sites, defined as mitochondria-associated membranes (**MAMs**), a multiprotein complex implicated in **calcium** transfer and lipid **exchange** . Alterations of mitochondria and ER have been shown to contribute to metabolic disorder such as **type 2 diabetes**. MAMS were recently implicated in the regulation of glucose homeostasis. But the role of MAMs in β cells is still largely unknown and their implication in glucotoxicity-associated β cell dysfunction remains to be defined.

Here, I report that acute glucose stimulation stimulated ER-mitochondria interactions and calcium (Ca^{2+}) exchange in INS-1E cells, whereas disruption of MAMs altered glucose-stimulated **insulin secretion** (GSIS). Conversely, chronic incubations with high glucose of either INS-1E cells or human pancreatic islets altered GSIS, and concomitantly reduced ER Ca^{2+} store, increased mitochondrial Ca^{2+} and reduced ATP-stimulated ER-mitochondria Ca^{2+} exchanges, despite an increase of organelle interactions. Furthermore, **glucotoxicity**-induced perturbations of Ca^{2+} signalling are associated with ER stress, altered mitochondrial respiration and mitochondria fragmentation, and these organelle stresses may participate to increased organelle tethering, as a protective mechanism. Lastly, sustained induction of ER-mitochondria interactions using a linker induced mitochondrial fission and altered GSIS.

Therefore, dynamic organelle coupling participates to GSIS in β cells and over-time disruption of organelle Ca^{2+} exchange might be a novel mechanism contributing to glucotoxicity-induced β cell dysfunction in type 2 diabetes.

Key words : Mitochondria, ER, MAMs, Type 2 Diabetes, Glucotoxicity, Insulin secretion, Calcium.

Abréviations

A

AA	Acides Aminés
AC	Adénylate Cyclase
Acétyl-CoA	Acétyl Coenzyme A
Ach	Acétylcholine
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adénosine Diphosphate
AG	Acides Gras
AGE	Advanced Glycation End product
ALA	α -Linolenic Acid
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ANT	Adenine-Nucleotide Translocator
Arf1	ADP-ribosylation factor 1
ARNt	ARN de transfert
AS160	Akt substrate 160
ASC	Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase activation and recruitment domain
ATF3/4/6	Activating Transcription Factor 3/4/6
ATG5/14	Autophagie related gene 5/14
ATP	Adénosine Tri Phosphate

B

Bak	Bcl homologous antagonist killer
Bap31	B-cell receptor associated protein 31
Bax	Bcl-2 associated protein X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer

C

Ca ²⁺	Calcium
CarMeN	Cardio Métabolisme Nutrition
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CiCR	Calcium Induced Calcium Release
Cisd2	CDGSH iron-sulfur cluster-containing protein 2
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CLPP	ATP dependent CLP protease proteolytic subunit
Co-IF	Co-Immuno-Fluorescence
Co-IP	Co-Immuno précipitation
COX1/2	Cytochrome C oxydase 1 ou 2

CypD	Cyclophilin D
Cyt C	Cytochrome C
D	
DAG	Diacylglycérol
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DOCS	Down-stream of CHOP
Drp1	Dynamin-Related Protein 1
E	
EIF2AK3	Eukaryotic translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3
eIF2 α	Eucaryotic translation initiation factor 2
EMC	ER Membrane protein Complex
EMRE	Essential MCU Regulator
ERAD	ER Associated protein Degradation
ERES	ER Exite Sites
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ERMES	ER-Miotchondria Encounter Structure
Ero1 α	Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1
ERp44	Endoplasmic reticulum protein 44
ET	Electron Tomography
ETC	Electron Transport Chain
F	
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FADH ₂	Dihydrure de Flavine Adénine Dinucléotide
FAT	Fatty Acid Translocase
FATE1	Fetal and adult testis-expressed transcript protein
FIB-SEM	Focused Ion Beam SEM
Fis1	Fission 1
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
G	
G6P	Glucose 6 phosphate
GADD34/153	Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene 54/153
GCK	Glucokinase
GFP	Green Fluorescent Protein
Gi	Protéines G inhibitrices
Gimap5	GTPase Immuno associated protein 5
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
Glc	Glucose
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLUT	GLUcose Transporter
Gp78	Glycoprotein 78
GPCRs	G Protein Coupled Receptors
GRP	Gastrin Releasing Peptide
Grp75/78/94	Glucose Related Protein 75/78/94
GSH	Glutathione

GSSG	Glutathione Disulfide
GTPases	Guanosine TriPhosphatases
H	
H ₂ O ₂	Peroxide d'hydrogène
HCSP	Highly Calcium Sensitive Pool
HCX	H ⁺ /Ca ²⁺ Exchangers
HFD	High Fat Diet
HFHS	High Fat High Sucrose
HK2	Hexokinase 2
HO·	Radicaux hydroxyl
HR1/2	Heptad-Repeat regions 1/2
hsPCA1	human secretory Pathway Ca ²⁺ ATPase 1
I	
IAPP	Islets Amyloid Polypeptide
IEM	Immunolectron Microscopy
IFN2	Inverted formin 2
IL-1β	Interleukine 1 beta
IMM	Inner Mitochondrial Membrane
IP3	Inositol triphosphate
IP3R	Inositol 3-Phosphate Receptor
IRE1	Inositol-requiring protein 1
IRS	Insulin Receptor Substrate
J	
JNK	c-Jun N terminal Kinase
K	
K ⁺	Potassium
KO	Knock Out
L	
Letm1	Leucin-Zipper EF Hand Containing Transmembrane protein 1
M	
MAFA	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A
mAKAP1	mitochondrial A Kinase Anchoring Protein 1
MAMs	Mitochondria Associated ER Membranes
MAVS	Mitochondrial AntiViral Signaling protein
Mcp1/2	Mdm10 Complementing Protein 1/2
MCS	Membrane Contact Site
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
Mdm5/10	Mitochondrial distribution and morphology protein 5/10
ME	Microscopie Electronique
Mff	Mitochondrial fission Factor
Mfn2	Mitofusin 2
MICOS	Mitochondrial Contact sites and cristae Organizing System
MICU1/2	Mitochondrial Calcium Uptake 1/2
MiD49/51	Mitochondrial Division

MITOL Mitochondrial E3 ubiquitin-protein ligase MARCH 5
MitoPLD Mitochondrial phospholipase D
Mmm Maintenance of mitochondrial
mTORC mammalian Target Of Rapamycin Complex 2

N

NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH Hydrure de Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCLX Na⁺/Ca²⁺/Li Exchangers
NFkB Nuclear Factor kB
NLRP3 NOD-like receptor protein 3
NOX NADPH oxidases

O

O₂ Oxygène
O₂⁻ Anions Superoxide
OGT Olinked β-N-acetylglucosamine Tranferase
OGTT Oral Glucose Tolerance Test
OMA1 Overlapping activities with m-AAA protease
OMM Outer Mitochondrial Membrane
OMS Organisation Mondiale de la Santé
OPA1 Optic Atrophy 1
OXPHOS Oxydative Phosphorylation complexe

P

PA Phosphatidic Acid
PACAP Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PACS2 Phosphofurin Acid Cluster Sorting protein 2
PC PhosphatidylCholine
PDH Pyruvate Déshydrogénase
PDI Protéine Disulfide Isomérase
Pdx1 Pancreatic and duodenal Homeobox 1
PE PhosphatidylEthanolamine
PERK Protein Kinase RNA-like ER Kinase
PI3K Phosphoinositide 3 Kinase
PIP2 Phosphatidyl Inositol DiPhosphate
PKA Protéines Kinase A
PKB Protéine Kinase B
PKC Protéine Kinase C
PKCλ/ε Protéine Kinase C λ/ε
PKR RNA-activated Protein Kinase
PLA Proximity Ligation Assay
PLC Phospholipase C
PML Promyelocytic Leukemia
PP Polypeptide Pancréatique
PP1 Protéine Phosphatase 1
PP2A Protéine Phosphatase 2A

PPiA	Peptidylpropyl Isomerase A
Prx4	Peroxiredoxine 4
PS	PhosphatidylSérine
PS1/2	Preseline 1 et 2
PSD	PS Decarboxylase
PSS	PS synthase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog on chromosome 10
PTP	Permability Transition Pore
Q	
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
R	
RAGE	Récepteurs aux AGEs
RE	Réticulum Endoplasmique
RER	Rough Endoplasmic Reticulum
RFP	Red Fluorescent Protein
RI	Récepteurs à l'insuline
RIG-I	Retinoic acid-Inducible Gene-I
ROS	Reactive Oxygen Species
RyR	Ryanodine Receptor
S	
S1/2P	Site 1/2 Protéases
Sac1	Suppressor of actin mutations 1-like
SBF-SEM	Serial Block Face-SEM
SEM	Scanning Electron Microscopy
SER	Smooth Endoplasmic Reticulum
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
Sig1R	Sigma 1 receptor
siRNA	Small interfering Ribo Nucleic Acid
SMP	Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid binding protein
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SS	Somatostatine
STIM	Stromal Interaction Molecule
STING	Stimulator of Interferon genes
sXBP1	splice X Box Binding Protein 1
T	
TAK-875	Fasiglifam
TCA	Tricarboxylic Acid Circle
TEM	Transmission Electron Microscopy
TG	Triglycérides
TOM-5	Translocase of the Outer Membrane 5
TRB3	Tribbles-related protein3
TRPM2	Transient Receptor Potential cation channel subfamily M, member 2
Trxs	Thioredoxine
TUDCA	Tauroursodeoxycholic Acid

Txnip	Thioredoxin-interacting protein
U	
UCP	UnCoupled Protein
UDP-GlcNAc	Uridine Diphosphate-N-Acetylglucosamine
UPR	Unfold Protein Response
UPR ^{am}	Unfold Protein Response activated by mistargeting of proteins
UPR ^{mt}	Unfold Protein Response mitochondriale
Ups2	Universal proteomics standard-2
V	
VDAC1	Voltage Dependent Anion-selective Channel 1
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
W	
WB	Western Blot
Wfs1	Wolfram syndrome protein 1
X	
XBP1	X-box Binding Protein 1
Y	
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Avant-propos

Le diabète est une pandémie mondiale. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), il a touché 108 millions d'adultes en 1980 pour 422 millions en 2014. La prévalence du diabète a presque doublé ces dernières années et généré 1.5 millions de morts en 2012, plaçant le diabète comme un problème majeur de santé publique.

Les causes du diabète de type 2 sont à la fois génétiques et environnementales, dues essentiellement à la surnutrition ainsi qu'un style de vie de nos jours de plus en plus sédentaire. Le diabète de type 2 entraîne une insulino-résistance des tissus périphériques qui deviennent insensibles à l'action de l'insuline, une hormone hypoglycémiante qui permet la capture du glucose sanguin par les tissus périphériques tels que le muscle, le tissu adipeux ou le foie. Cette insulino-résistance est compensée par une hypersécrétion d'insuline qui à terme épuise la cellule β pancréatique insulinosécrétrice qui dysfonctionne et meurt.

Les mécanismes cellulaires sous-jacents à cette dysfonction restent encore peu connus et nécessitent de plus amples études. C'est dans ce contexte que nous cherchons à étudier les effets de la glucotoxicité (exposition chronique à des concentrations élevées de glucose) sur la sécrétion d'insuline par les cellules β . La mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) sont deux organites clés pour la fonctionnalité β pancréatique et leur dysfonction est une des caractéristiques du diabète de type 2. De plus, il existe des zones de contacts entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, ces zones de contacts sont appelées MAMs (Mitochondria Associated ER Membranes) et sont impliquées dans des échanges lipidiques et calciques entre les 2 organites. L'implication des MAMs dans la sécrétion d'insuline et dans la dysfonction β pancréatique inhérente au diabète de type 2 n'ont à ce jour encore jamais été étudiées.

C'est dans ce contexte qu'au sein du laboratoire CarMeN (Cardio Métabolisme Nutrition) j'ai effectué ma thèse. La glucotoxicité est maintenant reconnue comme l'un des facteurs impliqués dans la dysfonction β lors du diabète de type 2. J'ai tout d'abord mis en place un modèle de glucotoxicité dans la lignée cellulaire β de rat INS1-E, grâce auquel j'ai étudié l'impact de la glucotoxicité sur la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les

MAMs en relation avec l'homéostasie calcique et la sécrétion d'insuline. Dans un 2^{ème} temps, j'ai tenté de moduler les MAMs en ciblant par siRNA (small interfering RNA) des protéines reliées aux MAMs telles que Mfn2 (Mitofusine 2), Grp75 (Glucose related protein 75) et CypD (Cyclophilin D) mais également via l'utilisation d'un linker artificiel, qui force les contacts RE-mitochondrie.

Mes travaux de thèse ont pu révéler le « phénotype des MAMs » en réponse à la glucotoxicité. J'ai pu confirmer tout d'abord la dysfonction mitochondriale et réticulaire en réponse à la glucotoxicité. Ces mécanismes sont associés à une régulation positive des MAMs. Malgré cette adaptation positive, les transferts calciques entre les 2 organites sont fortement diminués et pourraient être à l'origine de l'altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

J'ai également regardé l'effet d'une stimulation aigue au glucose sur la sécrétion d'insuline, comme pour mimer l'augmentation de la glycémie en réponse à une prise alimentaire. Nous avons pu observer une régulation positive du nombre de points de contacts entre le RE et la mitochondrie, celle-ci s'accompagne d'un transfert calcique plus grand, qui pourrait entrer en jeu dans la sécrétion d'insuline.

Nous avons également forcé les contacts via l'utilisation d'un linker artificiel. Cette induction mime les effets de la glucotoxicité sur l'altération mitochondriale et le défaut de sécrétion d'insuline, démontrant ainsi le rôle essentiel des MAMs dans les effets délétères de la glucotoxicité.

Ces travaux apportent donc une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la glucotoxicité dans le diabète de type 2 mais également sur l'implication des MAMs dans la physiopathologie de la cellule β pancréatique.

Publications

Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon.

Cassel R, Ducreux S, Alam MR, **Dingreville F**, Berlé C, Burda-Jacob K, Chauvin MA, Chikh K, Païta L, Al-Mawla R, Crola Da Silva C, Rieusset J, Thivolet C, Van Coppenolle F, Madec AM. PLoS One. 2016.

Effects of urban coarse particles inhalation on oxidative and inflammatory parameters in the mouse lung and colon.

Vignal C, Pichavant M, Alleman LY, Djouina M, **Dingreville F**, Perdrix E, Waxin C, Ouali Alami A, Gower-Rousseau C, Desreumaux P, Body-Malapel M. Part Fibre Toxicol. 2017

Disruption of ER-mitochondria calcium signalling contributes to glucotoxicity-associated β cell dysfunction.

Dingreville F, Panthu B, Thivolet C, Ducreux S, Gouriou Y, Pesenti S, Chauvin MA, Errazuriz-Cerda E, Van Coppenolle F, Rieusset J* and Madec AM*.

Submitted to Diabetes octobre 2018

Congrès/communications en 1^{er} auteur

- **Congrès innovations et diabète (2-3 juin 2016, Montpellier, France)**

Communication orale : Glucolipototoxicité dans les cellules β -pancréatiques et homéostasie calcique.

- **Meetochondrie (14-17 mai 2017, Seignosse, France)**

Poster : Modulation de l'interface réticulum endoplasmique/mitochondrie et de la dynamique mitochondriale par la glucotoxicité dans la cellule β pancréatique

- **Congrès G2L2 (19 mai 2017, Lyon, France)**

Communication orale : Modulation of endoplasmic reticulum/mitochondrial interface and mitochondrial dynamic by glucotoxicity in pancreatic beta cells

- **EASD : European Association for the Study of Diabetes (11-15 septembre 2017, Lisbonne, Portugal)**

Communication orale : Modulation of endoplasmic reticulum and mitochondrial interface by glucotoxicity in pancreatic beta cells

- **22^{ème} journée de l'EDISS (11 octobre 2017, Lyon, France)**

Communication orale : Modulation of endoplasmic reticulum and mitochondrial interface by glucotoxicity in pancreatic beta cells

- **Eurodiameeting (9-10 Novembre 2017, Strasbourg, France)**

Poster : Modulation of endoplasmic reticulum/mitochondrial interface and mitochondrial dynamic by glucotoxicity in pancreatic beta cells

***Prix du meilleur poster**

- **SFD : Société Francophone du Diabète (20-23 mars 2018, Nantes, France)**

Communication orale : Modulation de l'interface réticulum endoplasmique/mitochondrie et de la dynamique mitochondriale par la glucotoxicité dans la cellule β

- **EMBO workshop (21-26 septembre 2018, Arosa, Suisse)**

Poster : Glucotoxicity-mediated beta cell dysfunction is associated with increased endoplasmic reticulum-mitochondria interactions, disrupted Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial fission in rat and human pancreatic beta cells.

***2^{ème} prix du meilleur poster**

- **23^{ème} journée de l'EDISS (11 octobre 2018, Lyon, France)**

Poster : Glucotoxicity-associated beta cell dysfunction are associated with increased endoplasmic reticulum-mitochondria interactions, disruption of calcium homeostasis and mitochondria fission in rat and human pancreatic beta cells.

INTRODUCTION

Partie 1 : Physiologie de la cellule β

1) La cellule β au centre du métabolisme

1.1) Localisation/Structure

Le pancréas est une glande amphicrine, c'est à dire à la fois exocrine et endocrine, qui assure de nombreuses fonctions essentielles au métabolisme chez les mammifères. Le pancréas se situe au niveau de la cavité abdominale (**Figure 1A**). Il est relié à la papille majeure du duodénum via le canal pancréatique principal par l'ampoule hépato-pancréatique et le sphincter hépato-pancréatique, ce qui permet au pancréas exocrine d'excréter les enzymes pancréatiques ainsi que des ions bicarbonate essentiels à la digestion dans les canaux excréteurs. Le pancréas exocrine est organisé sous forme de glandes acineuses ou acini et de canaux excréteurs qui vont confluer vers le canal pancréatique. Alors que le pancréas endocrine est organisé sous forme d'amas cellulaires arrondis ou d'îlots (**Figure 1B**) richement vascularisés, les îlots de Langerhans (Widmaier et al., 2013).

Chez l'homme on trouve environ 3,2-14,8 million d'îlots de Langerhans au sein du pancréas exocrine chez l'homme, ce qui constitue seulement 2% de la masse totale du pancréas (Da Silva Xavier, 2018). Chaque îlot est constitué d'un mélange hétérogène de cellules (**Figure 1C**) : 50-75 % sont les cellules β (sécrétant l'insuline), 35-40% sont les cellules α (sécrétant le glucagon), 5-10 % sont les cellules δ (sécrétant la **somatostatine ou SS**), 1 % sont des cellules **PP** (sécrétant le **Polypeptide Pancréatique**) (Hellman, 1959). Dernièrement des cellules appelées cellules ϵ (1% des cellules de l'îlot) ont été identifiées en périphérie des îlots de rats et des îlots humains après marquage à la grheline (Wierup et al., 2014). L'îlot est richement vascularisé par les artères spléniques et mésentériques supérieures. L'architecture de l'îlot diffère entre l'homme et les rongeurs. Chez l'homme, l'organisation des différentes cellules composant l'îlot semble aléatoire, mais reflète en fait un enchevêtrement de plusieurs structures manteau(α)/cœur(β) au sein du même îlot. Chez le rongeur, les cellules alpha se trouvent exclusivement en périphérie et les cellules β au centre, formant une seule structure manteau/coeur (Bosco et al., 2010; Cabrera et al., 2006).

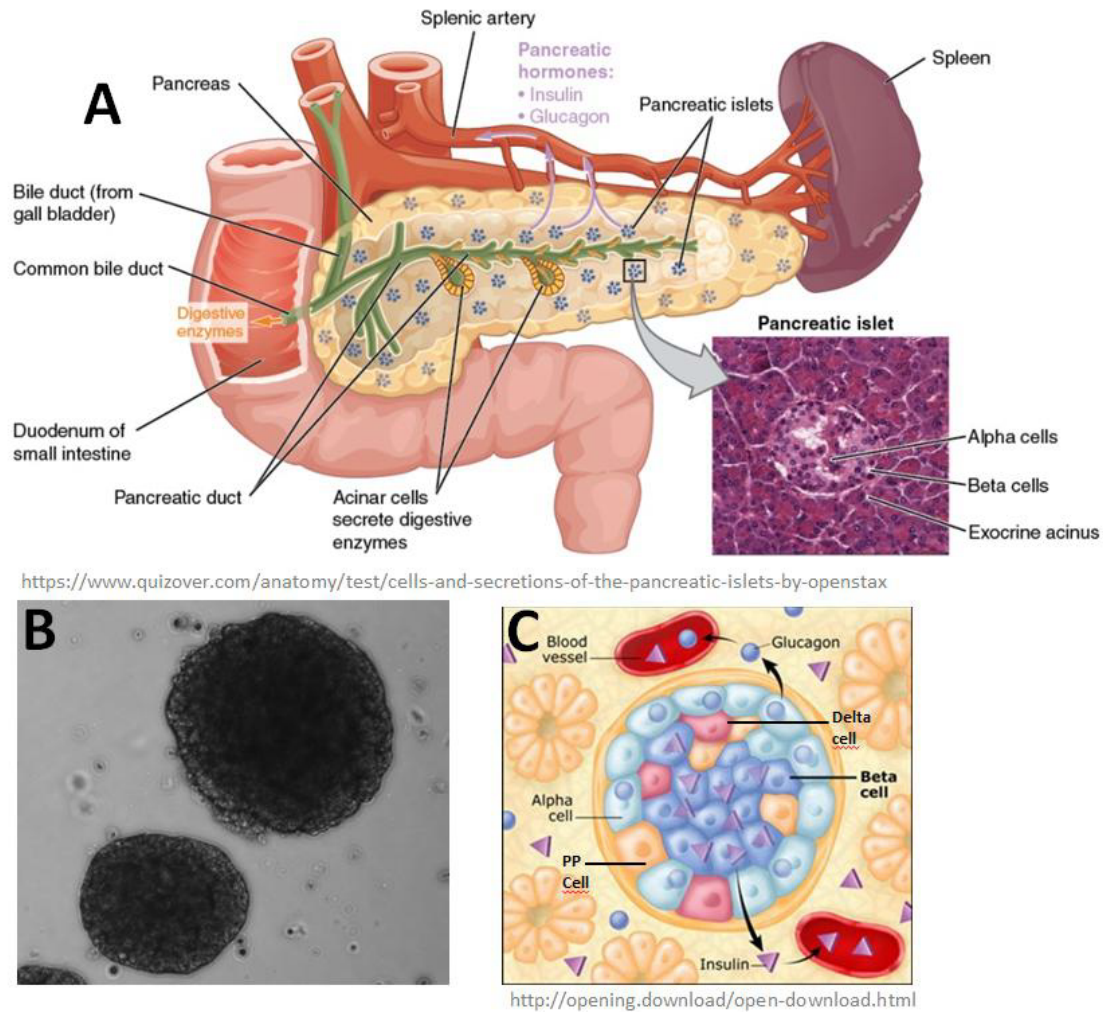


Figure 1: Localisation de l'îlot de Langerhans. A, Représentation d'un pancréas humain constitué de cellules Exocrines et de cellules Endocrines (Ilots de Langerhans). B, Image d'îlots de Langerhans d'origine humaine (U1060, CarMeN). C, Représentation de la structure cellulaire d'un îlot humain montrant la présence de cellules α , β , δ et PP.

1.2) Rôle clé de l'îlot dans la régulation de la glycémie

La présence des **transporteurs du glucose (GLUT)** et la riche vascularisation de l'îlot de Langerhans permet au pancréas endocrine de détecter des variations fines de la glycémie et ainsi de sécréter en conséquence différentes hormones.

1.2.1) La cellules α

Les cellules α sécrètent du glucagon, cette hormone permet d'augmenter la glycémie en condition d'hypoglycémie via la glycogénolyse hépatique (production de glucose à partir de glycogène). Il existe une relation antagoniste entre les cellules α et β pancréatiques, ainsi

le ratio Insuline/Glucagon contrôle l'anabolisme et le catabolisme. Néanmoins, depuis quelques années la cellule α a été reconnue comme une cellule « helper » de la cellule β . A la fois par sa faculté à se trans-différencier en cellule β (Ben-Othman et al., 2017) mais également sa faculté à produire du **GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1)** qui favorise la sécrétion d'insuline, la survie et la croissance de la cellule β (Stanojevic and Habener, 2015).

1.2.2) La cellules β

Les cellules β pancréatiques sécrètent de l'insuline, l'hormone dite hypoglycémiante. Elle régule la glycémie, c'est-à-dire la quantité de glucose dans le sang en sollicitant la capture et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques tels que le foie, le muscle ou encore le tissu adipeux. Elle permet ainsi de ramener la glycémie à des valeurs normales ou « normoglycémie » établies à 1g/L (5,5mM) de glucose chez l'homme. L'insuline, en se fixant sur son récepteur, déclenche une cascade de signalisation permettant l'arrivée à la membrane des transporteurs GLUT (dans le tissu adipeux et les muscles) responsables de la captation du glucose, ce qui permet de rétablir la normoglycémie. En outre, l'insuline à ce jour est l'unique hormone hypoglycémiante connue chez l'homme. Dans le foie et le muscle l'insuline stimule la glycogénèse, c'est-à-dire le stockage du glucose sous forme de glycogène. L'insuline agit également sur le métabolisme lipidique et protéique des tissus périphériques. Dans le muscle l'insuline favorise ainsi la synthèse protéique et diminue leur dégradation. Dans le tissu adipeux et le foie, l'insuline favorise la lipogénèse (Dimitriadis et al., 2011).

1.2.3) La cellule δ

Les cellules δ sont sécrétrices de somatostatine (SS). Malgré leur faible nombre (5-10%) au sein de l'îlot, leur morphologie complexe leur permet d'interagir avec de nombreuses cellules au sein de l'îlot. De la même manière que la cellule β pancréatique, elle est sensible à la glycémie et présente un mode de sécrétion similaire. La somatostatine peut agir de manière autocrine mais également paracrine comme un inhibiteur de la sécrétion d'insuline, de glucagon ou de SS par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines **G_i (Protéines G inhibitrices)** (Rorsman and Huisling, 2018).

1.2.4) La cellule PP

Les cellules PP (Polypeptide Pancréatique), ont une structure morphologique diffuse. C'est la population cellulaire la moins fréquente au sein de l'îlot ce qui n'a pas favorisé son étude, on trouve majoritairement ces cellules dans la tête du pancréas qui concentre 90% des cellules PP. Le rôle des cellules PP est très peu connu à ce jour, néanmoins on sait que le PP est relargué en période postprandiale et sécrété en réponse à l'arginine. Le glucose quant à lui n'a aucun effet sur sa sécrétion. Il n'a pas d'action sur la sécrétion d'insuline mais a des effets inhibiteurs sur le péristaltisme intestinal ainsi que sur la sécrétion de glucagon. Il n'est pas à exclure que les cellules PP entrent en jeu dans la régulation fonctionnelle de l'îlot mais cette hypothèse n'a pas encore été démontrée à ce jour (Brereton et al., 2015).

1.2.5) La cellule ϵ

Les cellules ϵ ou cellules à grhélina ont été découvertes récemment. Ces cellules représentent seulement 1% des cellules d'un îlot adulte mais sont plus nombreuses lors du développement fœtal et néonatal. Elles ont été retrouvées aussi bien chez l'homme que dans des modèles murins ou chez le poisson. Elles sont exprimées principalement en périphérie de l'îlot. Elles pourraient jouer un rôle inhibiteur sur la sécrétion d'insuline, mais cet effet inhibiteur est encore débattu à ce jour et pourrait s'expliquer par un effet dose-dépendant de la grhélina (Wierup et al., 2014).

1.3) La sécrétion d'insuline en réponse au glucose et action de l'insuline

1.3.1) Sécrétion d'insuline en réponse au glucose

L'insuline, du latin *insula* qui signifie île, est une hormone constituée de 2 chaînes polypeptidiques la chaîne A (21 Acides Aminés=AA) et la chaîne B (30 AA) reliées par 3 ponts disulfures (**Figure 2A**). Le gène INS code pour l'insuline, il est situé chez l'homme sur le chromosome 11. En outre, chez les rongeurs, il existe 2 gènes qui codent pour l'insuline, *Ins1* et *Ins2*. Après expression de ces gènes, la pré-pro-insuline (11,5 kDa) est formée et adressée au réticulum endoplasmique rugueux où elle est transformée en pro-insuline (9 kDa), c'est ici qu'elle acquiert sa structure tridimensionnelle par la formation des 3 ponts disulfures qui la constitue. Elle est ensuite adressée à l'appareil de Golgi pour être empaquetée dans des granules sécrétoires immatures ($\varnothing = 0.3 \mu\text{m}$) et scindée en forme

mature : Insuline (cristaux au cœur du granule ; 5,8 kDa) + peptide C (espace en périphérie) (Bendayan, 1993, 1989; Szymanowicz, 2012) (**Figure 2B-C**). La sécrétion des deux composants nécessite ensuite un acheminement à la membrane plasmique des granules avant fusion avec la membrane plasmique et exocytose (Rorsman and Renström, 2003). La pro-insuline constitue 30-50% de la synthèse totale de protéines par la cellule β , ce qui correspond à environ 334 000 molécules/minute (Schuit et al., 1991).

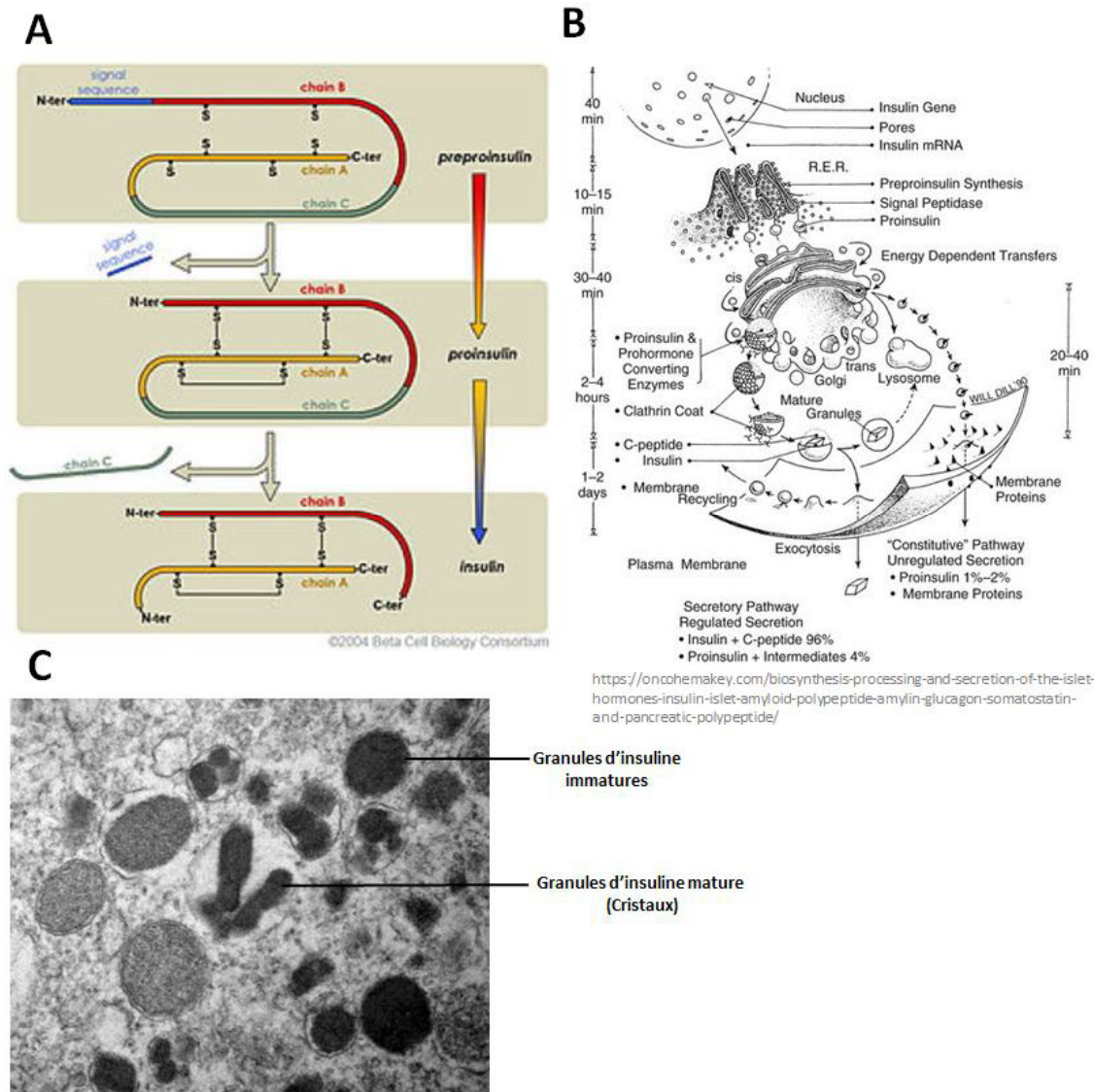


Figure 2 : Production et maturation de l'insuline. A, Maturation de l'insuline à partir de la pré-pro-insuline (Szymanowicz, 2012). B, Schéma représentatif de la maturation de l'insuline depuis sa production dans le noyau à partir de l'expression des gènes codant l'insuline. C, Images en microscopie électronique (ME) de granules de sécrétion d'insuline dans une cellule β pancréatique humaine (U1060, CarMeN).

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose (**Figure 3A**), principal stimulateur de la cellule β , est permise grâce à la présence à la membrane de la cellule β de transporteurs GLUT qui font entrer le glucose dans la cellule. Chez l'homme, les isoformes GLUT1/3 sont exprimées, chez le rongeur, l'isoforme GLUT2 est préférentiellement exprimée (De Vos et al., 1995; McCulloch et al., 2011) L'initiation du métabolisme glucidique est due à la **glucokinase (GCK)** qui transforme le glucose en **glucose 6 phosphate (G6P)** et ainsi enclenche la glycolyse dans le cytoplasme. Elle résulte en la formation du pyruvate utilisé ensuite par le cycle de l'acide citrique dans la mitochondrie pour produire de l'**ATP (Adénosine Tri Phosphate)**, le substrat énergétique de la cellule. Ainsi en présence de fortes concentrations de glucose, le rapport **ATP/ADP (Adénosine Diphosphate)** augmente et inhibe les canaux membranaires potassiques ATP-dépendants entraînant une diminution de la perméabilité aux ions **K⁺ (Potassium)** dans la cellule. Au repos, en absence de glucose, le potentiel de membrane des cellules β est stable (-60 à -70 mV). L'augmentation du rapport ATP/ADP crée ainsi une dépolarisation (-30 mV) membranaire qui va à son tour activer les canaux calciques voltage-dépendants membranaires de type L et induire une entrée massive de calcium dans la cellule, provoquant dans un premier temps la sécrétion des granules d'insuline immédiatement relargables proches de la membrane plasmique (5-10% des granules totaux) c'est la première phase de sécrétion d'insuline (**Figure 3B**). La cellule β entre alors dans une phase oscillatoire (Phase 2) avec augmentation et diminution du calcium cytosolique, dues aux oscillations du potentiel de membrane. Il existe 3 types d'oscillations, les oscillations rapides (1-3 sec), lentes (4-5 min) et mixtes (superposition d'oscillations lentes et rapides). L'activation des canaux **K⁺ calcium-dépendants** consécutive à l'augmentation des concentrations de calcium cytosolique et l'ouverture des canaux **K⁺ voltage-dépendant (Kv2.1)** permettent une repolarisation membranaire au cours des oscillations rapides. Pour les oscillations lentes, il n'est pas à exclure une contribution du métabolisme (diminution des concentrations d'ATP car la quantité d'ATP consommée pour l'exocytose des granules est plus grande que celle produite par la cellule) (MacDonald et al., 2005). De plus ces oscillations sont synchronisées au sein d'un même îlot (Voir partie 2). La phase 2 a pour conséquence la désorganisation du cytosquelette d'actine permettant de réduire le maillage dans lequel sont pris les granules d'insuline dits de réserve. La phosphorylation de la tubuline, qui forme comme des « rails » dans la cellule, va permettre le déplacement des granules vers la membrane plasmique (Henquin, 2009; Rorsman and Braun, 2013). Cette

seconde phase (**Figure 3B**) maintient une sécrétion continue mais à moindre quantité que la première phase.

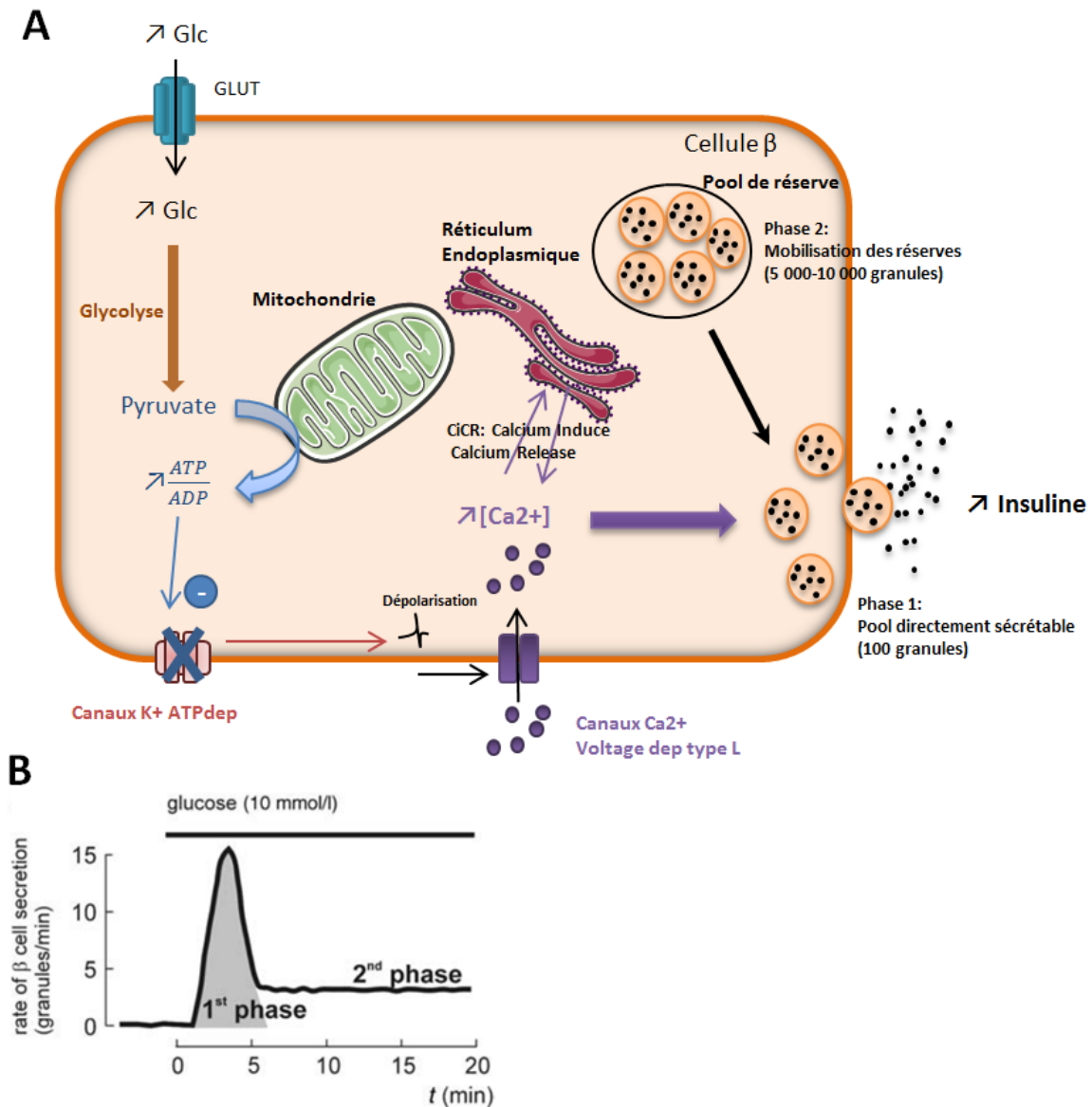


Figure 3 : La sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans la cellule β . A, Représentations des événements impliqués dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Glc: Glucose, GLUT: transporteurs de glucose, ATP : Adénosine triphosphate, ADP: Adenosine Diphosphate, K⁺: Potassium, Ca²⁺ : Calcium. B, Représentation graphique des 2 phases de sécrétion d'insuline montrant la première phase via l'utilisation du pool de sécrétion directement relargable (Rorsman and Renström, 2003).

Pour apporter quelques chiffres, la sécrétion basale d'insuline correspond à environ 1 granule d'insuline/min soit <0.01% du contenu d'insuline/min. En phase 1, la production passe à 15 granules/min puis à 5 granules/min pour la phase 2. On estime la présence de

5 000 à 10 000 granules sécrétoires/cellule β chez l'homme (Rosengren et al., 2012). Récemment un nouveau type de pool de granules sécrétoires a été découvert en addition du pool de réserve et du pool directement relargable, le pool **HCS** (**Highly Calcium Sensitive Pool**). Ce pool colocalise avec des canaux calciques et leur nombre de granules serait sous la dépendance des **protéines kinases A (PKA)** et **C (PKC)**.

1.3.2) Action de l'insuline

Le récepteur à l'insuline est un récepteur transmembranaire qui appartient à la famille des tyrosines kinases ; Il peut être activé soit par l'insuline, soit par l'**IGF1/2 (Insulin Growth Factor 1/2)**. La fixation de l'insuline sur son récepteur provoque son changement de conformation et induit sa phosphorylation sur résidu tyrosine par autophosphorylation, ce qui permet le recrutement de protéines adaptatrices comme celles de la famille des **IRSs (Insulin Receptor Substrates)**, ainsi que de nombreuses autres protéines adaptatrices (**Figure 4**). Ce recrutement permet ensuite d'activer à terme la **PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase)** qui successivement va activer **Akt** appelé aussi **PKB (Protein Kinase B)** mais également la **PKC λ/ϵ (Protein Kinase C λ/ϵ)**, impliquées dans la translocation à la membrane des vésicules riches en transporteurs GLUT (dans le muscle et le tissu adipeux). Le recrutement d'IRS permet aussi l'activation des voies **ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase)** ce qui favorise la croissance, la différenciation cellulaire et la synthèse protéique. L'expression du récepteur à l'insuline est ubiquitaire. Les tissus périphériques sont particulièrement des tissus insulino-dépendants, l'insuline permet ainsi d'activer leur métabolisme oxydatif (favorise la glycolyse et le cycle de Krebs) mais aussi de favoriser le stockage du glucose sous forme de glycogène (Cheng et al., 2010; Siddle, 2011). Plus précisément, dans le tissu adipeux, l'insuline permet aussi l'inhibition de la lipolyse et dans le foie l'inhibition de la production hépatique de glucose.

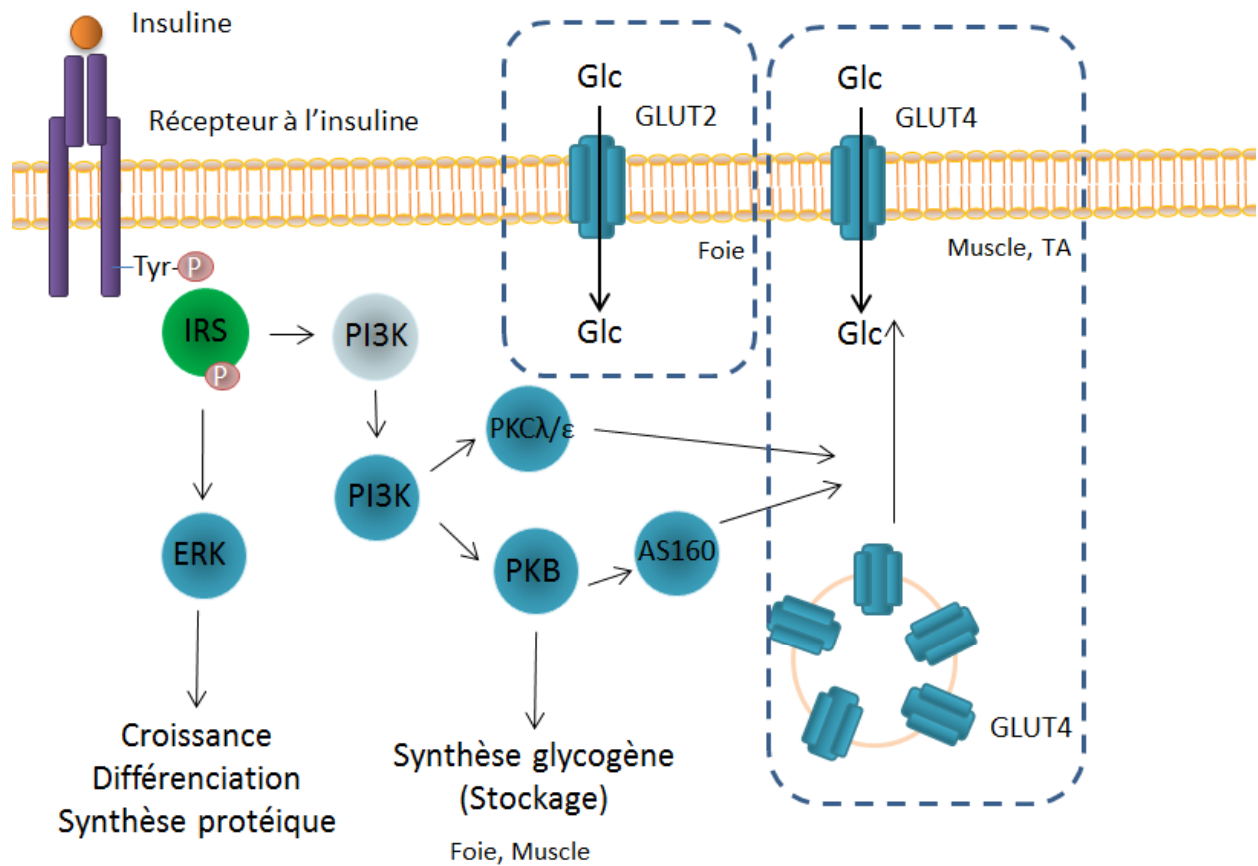


Figure 4 : Voie de signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques. Schéma de l'action de l'insuline sur les tissus périphériques, tels que le foie, le muscle ou le **tissu adipeux (TA)**. L'insuline agit sur son récepteur et induit la phosphorylation d'IRS1 qui va activer la PI3K, qui à son tour va activer la PKB et la PK λ/ϵ provoquant la translocation des vésicules contenant les transporteurs GLUT à la membrane (pour la PKB via l'activation d'AS160) et faciliter ainsi la capture du **glucose (Glc)**.

Il est intéressant de noter que la cellule β est aussi sensible à l'insuline. Ce concept de régulation autocrine de la cellule β par l'insuline est néanmoins encore controversé. La cellule β exprime les différents composants de la voie de la signalisation de l'insuline, comme le récepteur à l'insuline, IRS 1 à 4, PI3K, Akt ou encore **AS160 (Akt substrate 160)** (Bouzakri et al., 2009; Kulkarni et al., 1999b). Historiquement l'insuline a été décrite comme un régulateur négatif de la fonction de la cellule β . Mais des données récentes suggèrent que l'insuline pourrait jouer un rôle positif dans la sécrétion d'insuline, la transcription de gènes, la traduction et les flux calciques (Leibiger et al., 2002). En effet, dans les modèles **KO (Knock Out)** du récepteur à l'insuline, spécifiques à la cellule β , on observe une diminution du contenu en insuline et une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, qui

pourrait probablement être lié à une diminution de la masse β (Kulkarni et al., 1999a). Ces mécanismes d'autorégulation pourraient entrer en jeu dans la sécrétion d'insuline, via une augmentation des concentrations calciques cytosoliques directement par une stimulation du relargage des stocks calciques réticulaires (Aspinwall et al., 2000). L'origine exacte de cette augmentation reste discutée, elle pourrait être dépendante de la production d'**IP3 (Inositol triphosphate)** ou du blocage des pompes de recapture du calcium (Aspinwall et al., 2000; Xu et al., 2000). Il n'est pas non plus à exclure que cette régulation soit différente selon le temps d'exposition à l'insuline. Des études contradictoires montrent cependant la régulation négative de la cellule β par l'insuline, qui serait capable d'ouvrir les canaux potassiques ATP-dépendants par l'intermédiaire de la PI3K (Khan et al., 2001; Spanswick et al., 2000).

1.4) Les voies de potentialisation de la sécrétion d'insuline

L'augmentation du calcium cytosolique nécessaire à la sécrétion d'insuline peut se faire aussi en sollicitant les stocks calciques réticulaires. Cette voie est appelée la voie d'amplification ou de potentialisation de la sécrétion d'insuline, elle fait majoritairement appel à des **GPCRs (G Protein Coupled Receptors)**. Ces récepteurs, lorsqu'ils sont couplés à des protéines G activatrices (comme Gq), vont par l'intermédiaire de l'activation de la **phospholipase C (PLC)** dégrader le **PIP2 (Phosphatidyl Inositol DiPhosphate)** et induire la formation de **Diacylglycérol (DAG)** et d'**IP3 (Inositol triphosphate)**. L'IP3, en se fixant sur son récepteur au réticulum endoplasmique, va provoquer la libération des stocks calciques cytosoliques et ainsi provoquer la sécrétion d'insuline (Magnan and Ktorza, 2005). D'autre part, le DAG formé active la **protéine kinase C (PKC)**, impliquée aussi dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline (Aizawa et al., 1998). Il existe aussi d'autres GPCRs qui sont couplés cette fois à la protéine activatrice Gs ; lors de leurs activations l'**adénylate cyclase (AC)** convertit l'ATP en **AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique)**, un activateur de la **Protéine Kinase A (PKA)**. L'AMPc et la PKA sont des régulateurs importants de l'exocytose des granules d'insuline (Kalwat and Cobb, 2017; Malaisse et al., 1967) (**Figure 5**).

Les principaux acteurs qui interviennent dans l'activation de cette voie sont ceux du système parasympathique (issu du nerf vague) comme l'**Ach (Acétylcholine)**, le **VIP (Vasoactive intestinal peptide)**, le **GRP (Gastrin releasing peptide)** ou **PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide)**. Ces voies de sécrétion d'insuline sont activées par

le système nerveux et constitue la phase pré-absorptive, c'est à dire celle qui précède la prise alimentaire pour permettre au corps d'anticiper l'augmentation de la glycémie (Ahrén, 2000; Pénicaud, 2017)

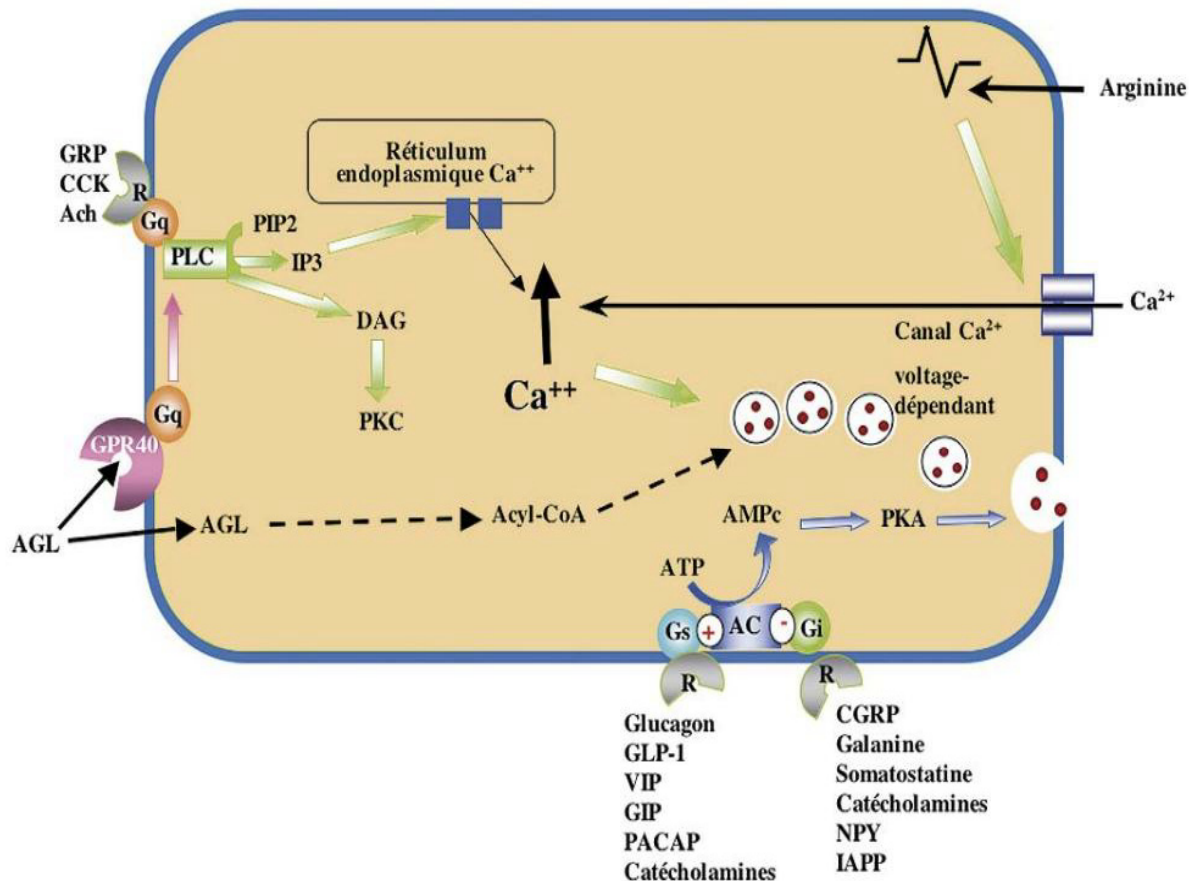


Figure 5: Voies de potentialisation ou d'inhibition de la sécrétion d'insuline. Schéma représentant les différentes voies de potentialisation ou d'inhibition de la sécrétion d'insuline dépendantes des GPCRs (G Protein Coupled Receptor), mettant en avant les 2 principales voies de signalisation activées, la voie IP3/PKC et la voie AMPc/PKA. IP3: Inositol Triphosphate, PKC : Protéine Kinase C, AMPc: Adénosine Monophosphate cyclique, PKA : Protéine Kinase A (Magnan and Ktorza, 2005).

De la même manière que le système sympathique, il existe un axe entéro-insulaire qui régule la sécrétion d'insuline. Cet axe fait intervenir les signaux hormonaux sécrétés en réponse à une prise alimentaire par les cellules entéro-endocrines intestinales pour stimuler la sécrétion d'insuline avant l'absorption complète du bol alimentaire. L'ensemble de ces signaux hormonaux sont rassemblés sous le terme d'« incrétines ». Les principales incrétines sont le GLP1 (Glucagon like peptide 1), **GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide)**. Le GIP est sécrété par les cellules K de la partie proximale de l'intestin, alors

que le GLP1 lui est sécrété par la partie distale (cellules L du jéjunum et de l'iléon). Leur sécrétion est activée par le glucose majoritairement mais aussi par les **acides gras (AG)** ou les AA (Kalwat and Cobb, 2017).

Le glucagon est une hormone insulaire produite par les cellules α pancréatiques, qui peut agir sur la cellule β par voie paracrine ou endocrine. Malgré ses effets opposés à l'insuline sur la glycémie, le glucagon stimule la sécrétion d'insuline, par l'intermédiaire de GPCRs (Ahrén, 2015; Song et al., 2017).

A ce jour, de nombreux modulateurs positifs de la sécrétion d'insuline existent tels que les hormones thyroïdiennes ou certains AA (Chen et al., 2018). Les mécanismes sous-jacents à leurs effets restent cependant à être élucidés.

1.5) Les voies d'inhibition de la sécrétion d'insuline

Les voies d'inhibition de la sécrétion d'insuline sont elles aussi initiées principalement par des GPCRs, couplés cette fois à des protéines G_i (inhibitrices). Leur activation inhibe l'activité de l'AC et donc la génération d'AMPc, d'autre part ils provoquent une hyperpolarisation membranaire bloquant le couplage glucose/sécrétion d'insuline (Kalwat and Cobb, 2017).

Le système sympathique est un des acteurs majeurs des voies inhibitrices. Les acteurs majeurs impliqués sont la noradrénaline, le neuropeptide Y, la galanine, la **CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide)** et la Somatostatine. La somatostatine est à la fois produite par les cellules D insulaires mais aussi en tant que neurotransmetteur par le système nerveux sympathique) (Ahrén, 2000) (**Figure 5**)

De nombreuses hormones sont également associées à l'inhibition de la sécrétion d'insuline, incluant le cortisol, la progestérone, les œstrogènes ou encore les catécholamines ou l'**IAPP (Islets Amyloid Polypeptide)**.... (Magnan and Ktorza, 2005)

2) Rôle clé de 2 organites dans la fonction β , le réticulum endoplasmique et la mitochondrie

2.1) Réticulum Endoplasmique (RE)

2.1.1) Structure

Toutes les cellules Eucaryotes possèdent un **réticulum endoplasmique (RE)**. Le RE constitue près de 50% de la membrane totale composant une cellule animale, néanmoins ce pourcentage peut varier en fonction du type cellulaire. Le RE forme un réseau de saccules aplatis et de tubules interconnectés étendus dans l'intégralité du cytosol depuis l'enveloppe nucléaire jusqu'au cortex cellulaire, occupant 9% du volume total de la cellule (Alberts, 2000; Chen et al., 2013) (**Figure 6**). Cette masse est constituée d'un empilement de saccules formant des couches de feuilletts articulés autour d'un espace interne appelé lumière du RE. Le RE subit également des réarrangements dynamiques, tel que l'extension de tubules et leur mouvement. De ce fait, le réticulum n'est pas isolé dans la cellule, il est connecté à d'autres organites tels que la mitochondrie, mais il forme également des contacts étroits avec la membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes, les peroxisomes et l'appareil de golgi. Il dirige ainsi la fonctionnalité et le destin cellulaire par des échanges lipidiques et calciques, ces zones de contacts étant appelées **MCS (Membrane Contact Site)** (Wang and Dehesh, 2018). Ainsi le RE permet d'assurer différentes fonctions, selon la zone où il se retrouve. Néanmoins l'étude morphologique précise du RE reste difficile actuellement de par la complexité que forme ce réseau dans la cellule.

Bien que le réticulum soit continu en condition physiologique, une étude de 1997 a décrit de manière élégante que l'élévation des concentrations de calcium cytosolique pouvait être à l'origine d'une fragmentation du réseau réticulaire (Subramanian and Meyer, 1997). Les propriétés dynamiques du RE encore très peu étudiées à ce jour susciteront je pense à l'avenir autant d'engouement que celui actuellement dévoué à la fragmentation mitochondriale... Néanmoins, l'altération structurelle de la morphologie du RE a déjà été associée à diverses pathologies telles que le diabète de type 2, de par l'observation par exemple dans des cellules β pancréatiques de diabétiques d'une dilatation du RE (Masini et al., 2017), mais également des maladies neuro-dégénératives comme la maladie

d'Alzheimer (Katayama et al., 2004), classée dans la catégorie des maladies appelées « Maladies des organites ».

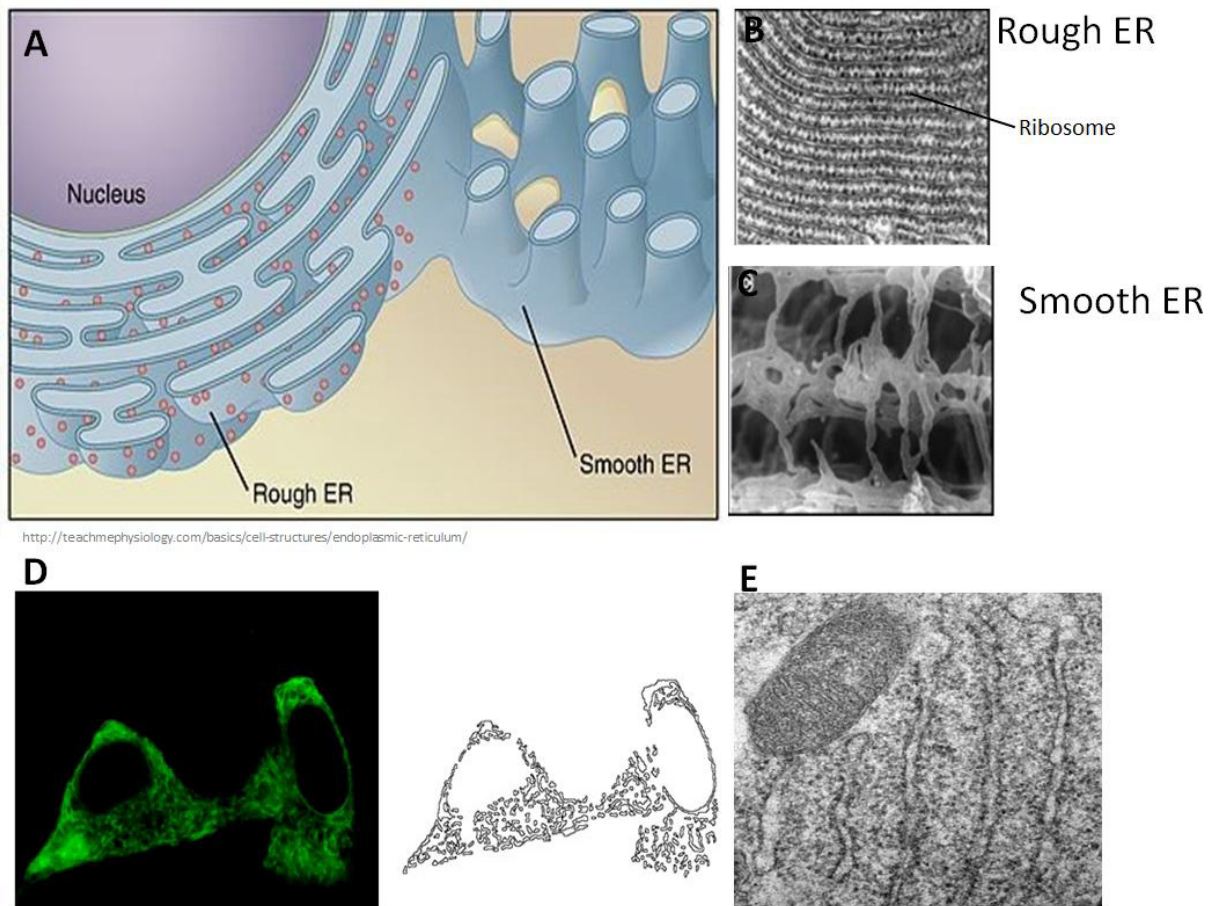


Figure 6 : Structure du RE. A, Représentation du **réticulum endoplasmique rugueux (RER)** présentant des ribosomes à sa surface et du **réticulum endoplasmique lisse** à forme tubulaire (ou **Smooth, SER**). B, Image de microscopie électronique du RER. C, Image en tomographie du SER (Shibata et al., 2006). D, Image en microscopie confocale après marquage du RE par une sonde fluorescente, représentant le réseau du réticulum endoplasmique dans une lignée de cellules β pancréatiques de rat (INS1-E) (U1060, CarMeN). E, Image en microscopie électronique du RER dans une cellule β pancréatique humaine (U1060, CarMeN).

On peut distinguer 3 types de réticulum, celui constituant l'enveloppe nucléaire, le réticulum rugueux et le réticulum dit lisse. Le **RE rugueux (RER, Rough Endoplasmic Reticulum)** porte des ribosomes à sa surface et s'organise en feuillettes (**Figure 6C**), le **RE lisse (SER, Smooth Endoplasmic Reticulum)** lui ne porte pas de ribosome à sa surface et il est plutôt de forme tubulaire (**Figure 6C**). De manière intéressante le RE lisse est plus abondant dans les cellules dont la fonction métabolique est importante telles que les hépatocytes

(Alberts, 2000). La structure même du RER peut varier en fonction du type cellulaire ou de l'état physiologique ; dans les cellules à forte capacité sécrétoire celui-ci est très dense organisé en fine couche de citernes. Dans la cellule β , le RE forme un réseau étendu tout le long de la cellule, constitué majoritairement de RER (**Figure 6 D-E**). D'autre part, l'étude des échanges bidirectionnels entre le RE et l'appareil de golgi ont fait émerger l'existence d'un RE sans ribosome dit « de transition » ou **ERES (ER Exit Sites)** assurant la navette entre les 2 organites (Langhans et al., 2012).

2.1.2) Fonctions

-La maturation des protéines

Le réticulum endoplasmique a un rôle clé dans la biosynthèse des protéines qu'elles soient transmembranaires ou hydrosolubles. Les ribosomes assurent la traduction des protéines, c'est à dire la synthèse des protéines à partir des ARNm (Acide Ribo-Nucléique messenger). Le passage des polypeptides formés par les ribosomes dans le RE est dépendant de la présence d'un signal d'adressage au RE. La translocation des polypeptides dans le RE se fait ensuite par l'intermédiaire du translocon, un canal présent à la membrane du RE (**Figure 7**). Le translocon est un complexe multiprotéique. L'hétérotrimère Sec61 forme un canal conducteur, qui permet le passage des polypeptides nouvellement synthétisés dans le RE, c'est l'élément central constituant le translocon. Le translocon est formé également de nombreuses protéines et complexes qui s'associent de manière transitoire ou permanente au complexe Sec61 (Lang et al., 2017). Approximativement 1/3 des protéines se déplacent à travers la membrane du RE au cours de leur traduction. Le RE permet de mettre en place la structure tridimensionnelle des protéines de par la formation de ponts disulfures, nécessaires notamment à la mise en conformation de l'insuline (3 ponts disulfures) dans la cellule β . Mais également le RE assure la glycosylation, l'hydroxylation et la lipidation des protéines. Ce processus nécessite la présence de protéines chaperonnes intra-réticulaires comme **Grp78** ou **Grp94 (Glucose related protein 78/94)** assurant un contrôle qualité séquestrant ainsi les protéines mal conformées ou conformées de manière incomplète, empêchant ainsi leur transport vers l'appareil de golgi. Les chaperonnes du RE jouent le rôle de catalyseurs de la mise en conformation des protéines. Le RE est également le siège de machineries enzymatiques complexes régulant les modifications post-traductionnelles. Le RE

peut également jouer un rôle dans la biosynthèse des lipides et leur adressage, dans des réactions de détoxification, la dégradation du glycogène ou encore la régulation du calcium intracellulaire (Baumann and Walz, 2001). Seules les protéines dont la conformation est correcte peuvent sortir du RE. Le RE est hautement régulé par un système de contrôle qualité. Les protéines mal conformées sont ainsi éliminées par le complexe ERAD (ER-associated protein Degradation), qui permet d'extraire les protéines du RE pour les guider vers le protéasome où elles seront dégradées (Tsai et al., 2002).

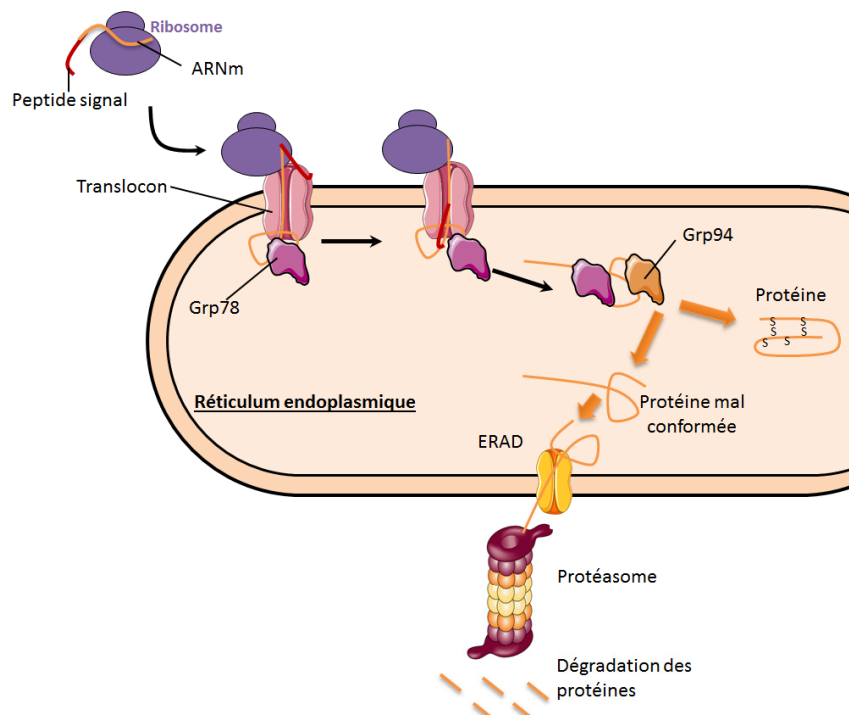


Figure 7 : Rôle du RE dans la maturation des protéines et la prise en charge des protéines mal conformées

-Le RE, stock calcique de la cellule

Le réticulum endoplasmique sert aussi de réserve calcique à la cellule, la concentration du calcium au sein de la lumière du RE est de l'ordre de 1-2 mM, soit 10 000 fois plus élevée que la concentration cytosolique de l'ordre de 0.1 μ M ; malgré une telle quantité de calcium, des diminutions fines de calcium au sein du RE peuvent entraîner des dysfonctions cellulaires (Wiel et al., 2014). D'autre part, la majorité du calcium est liée à des « Ca^{2+} -Binding Protein » dans la lumière du RE. Les flux calciques RE-cytoplasme sont régulés par l'intermédiaire de canaux calciques présents dans la membrane du RE tels que le

récepteur **STIM (Stromal Interaction Molecule)**, **Ryanodine Receptor (RyR)** et **l'IP3R (Inositol Tri-phosphate Receptor)** capables d'exporter le calcium dans le cytosol mais aussi de transférer le calcium du réticulum à la mitochondrie. La pompe **SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase)** permet la recapture du calcium depuis le cytosol jusque dans la lumière du RE et ainsi de restaurer l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique. Dans la cellule β , il existe 2 isoformes SERCA2b (Ubiquitaire) et SERCA3 (spécifique à la cellule β) (Ravier et al., 2011). Le rôle des RyR dans la cellule β est actuellement débattu de par leurs très faible expression dans les cellules primaires (Rorsman and Ashcroft, 2018). Le translocon a aussi récemment été incriminé par notre équipe comme jouant également le rôle de canal de fuite calcique en condition de surexposition aux acides gras dans la cellule β pancréatique (Cassel et al., 2016).

De par son contrôle de l'homéostasie calcique et de la mise en conformation de l'insuline, le réticulum endoplasmique joue un rôle particulièrement important pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans la cellule β pancréatique, le rendant très sensible aux surcharges énergétiques comme celles induites par une exposition prolongée au glucose ou aux lipides (Plus de détails partie 2).

2.2) Mitochondrie

2.2.1) Structure

Il existe 2 types cellulaires sur Terre, les Procaryotes et les Eucaryotes. Depuis quelques années déjà, la provenance de la mitochondrie dans la cellule a laissé plus d'une question en suspens. Plusieurs théories ont établi l'origine de la mitochondrie comme une possible endosymbiose entre le précurseur de la cellule Eucaryote et l'ancêtre des α -protéobactéries (Archibald, 2015). Bien que l'origine de la mitochondrie soulève encore des questions, sa structure et ses fonctions au sein des cellules Eucaryotes sont à ce jour très bien décrites.

La mitochondrie se caractérise par une forme cylindrique rigide, proche de l'aspect des bactéries. Elles ont un diamètre compris entre 0,4 à 1 μm , mais subissent constamment des remodelages tels que la fusion entre plusieurs mitochondries ou à l'inverse la fission donnant à celles-ci un aspect ponctiforme ; elles forment ainsi un réseau qui réagit au statut

nutritionnel (Picard and Turnbull, 2013). Elles ont également la faculté de se déplacer dans la cellule le long de microtubules pour répondre aux demandes énergétiques des compartiments subcellulaires. La mitochondrie est constituée d'une double membrane, la membrane interne (IMM, Inner Mitochondrial Membrane) formant des crêtes entourant la matrice mitochondriale, la membrane externe (OMM, Outer Mitochondrial Membrane) délimitant les contours de la mitochondrie et en contact avec le cytosol, l'OMM est aussi en contact avec l'espace intermembranaire situé entre l'OMM et l'IMM (De Pinto et al., 2010; Ghadially, 1975) (**Figure 8A-C**)

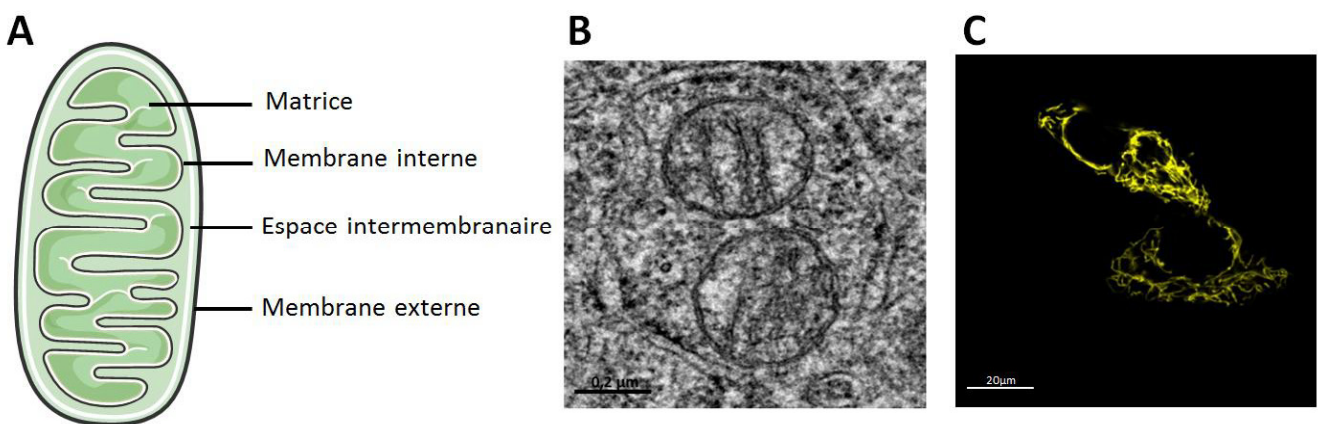


Figure 8 : Structure de la mitochondrie. A, Schéma de la structure de la mitochondrie, constituée d'un espace intermembranaire entouré d'une membrane externe et d'une membrane interne. Au centre on retrouve la matrice mitochondriale. B, Image de microscopie électronique de 2 mitochondries cernées par le RE dans une cellule β pancréatiques humaines. C, Image représentant le réseau mitochondrial dans une lignée de cellules β pancréatiques de rat (INS1-E) en microscopie confocale après marquage des mitochondries par une sonde fluorescente (U1060, CarMeN).

Les membranes externes et internes ont une perméabilité et une composition différentes. Ainsi l'IMM est imperméable aux ions et comprend les différents complexes de la chaîne respiratoire (Complexe I à IV) ainsi que l'ATP synthase (Complexe V) et permet d'assurer la respiration mitochondriale (Nouette-Gaulain et al., 2016).

La matrice est le siège de la β -oxydation des acides gras et du pyruvate, mais également le point initiateur du cycle de l'acide citrique, cet espace riche en enzymes est également le point de départ de la respiration cellulaire.

L'OMM, à l'image d'un tamis laisse passer toutes les molécules d'un poids moléculaire inférieur à 5000 daltons. Elle est parcourue par des porines telles que **VDAC (Voltage Dependant Activated Channel)** important pour les échanges calciques entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (voir partie 3). Elle est aussi le lieu d'échanges lipidiques et le siège de nombreuses protéines permettant la stabilisation des contacts entre la mitochondrie et d'autres organites (Tagaya, 2017).

2.2.2) Fonctions

-Le cycle de Krebs

La glycolyse résultant de l'entrée de glucose dans la cellule assure la production de pyruvate qui, par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase, génère de **l'acétyl Coenzyme A (Acétyl-CoA)**. La β -oxydation des acides gras peut aussi jouer ce rôle grâce à l'acyl-CoA synthétase présente dans l'OMM. L'acétyl-CoA est le point d'initiation du cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs). Le cycle de Krebs a lieu au sein de la matrice mitochondriale et il permet la production de **NADH (Hydrure de Nicotinamide Adénine Dinucléotide)** et de **FADH₂ (Dihydrure de Flavine Adénine Dinucléotide)**, à partir du **NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide)** et du **FAD (Flavine Adénine Dinucléotide)** respectivement. Ces deux coenzymes NADH et FADH₂ sont essentielles à la phosphorylation oxydative mitochondriale (Biamonti et al., 2018). Le cycle de Krebs est ainsi constitué par dix réactions catalysées par huit enzymes clés.

-La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative permet la phosphorylation de l'ADP en ATP sous la dépendance de la chaîne respiratoire mitochondriale. Celle-ci est constituée de plusieurs complexes. Le complexe I de la NADH déshydrogénase accepte et transmet les électrons du NADH à l'ubiquinone qui la transmet à son tour au complexe III, alors que le complexe II de la succinate déshydrogénase transmet les électrons du FADH₂. L'ubiquinone via la cytochrome C oxidoréductase (Complexe III) transfère les électrons au complexe IV de la cytochrome oxydase. Celle-ci catalyse la réduction de **l'O₂ (Oxygène)** en 2H₂O. Ces différents complexes créent un gradient électrochimique de protons (accumulation d'ions H⁺ dans l'espace intermembranaire) de par l'énergie libérée par le passage des électrons. Cette force

protonique permet à l'ATP synthase de convertir l'ADP (Adénosine Di-Phosphate) en ATP (Adénosine Tri-Phosphate) (**Figure 9**) augmentant donc le rapport ATP/ADP essentiel à divers processus cellulaires (Nouette-Gaulain et al., 2016), tels que la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique. Cette réaction peut être perturbée par des fuites de protons (H^+), définies comme le découplage de la chaîne respiratoire et implique l'expression de protéines au sein de la membrane interne de la famille des UCP (UnCoupled Protein) (Echtay et al., 2018). Le rôle précis des UCPs dans le découplage de la chaîne respiratoire reste néanmoins encore débattu à ce jour.

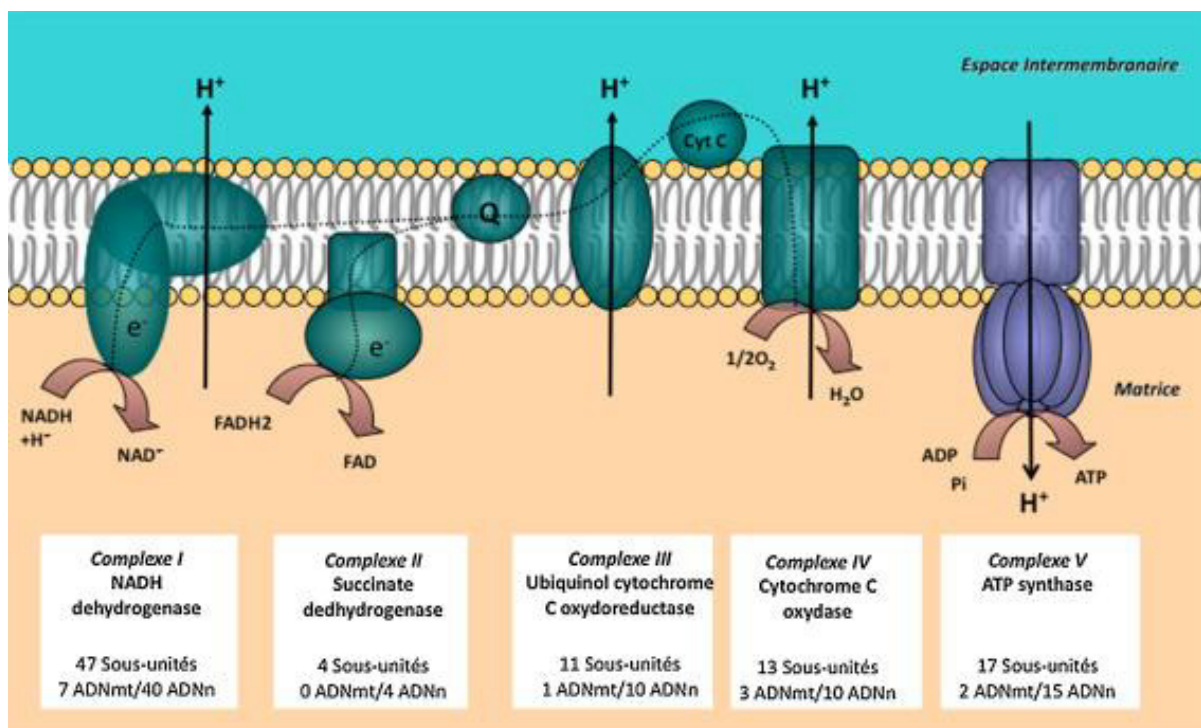


Figure 9 : Schéma représentant les différents complexes I à V de la chaîne respiratoire mitochondriale. (Nouette-Gaulain et al., 2016).

-Calcium mitochondrial

Le calcium cytosolique et le calcium réticulaire sont restés pendant longtemps sur le devant de la scène comme les acteurs majeurs de la signalisation calcique, laissant de côté la mitochondrie ; cependant l'apparition de nouvelles sondes spécifiques du calcium mitochondrial (comme le 4mtD3CPV) (Palmer et al., 2006) a remis en avant l'importance du calcium dans la fonction mitochondriale et à plus large échelle dans la fonction cellulaire. Les concentrations de calcium dans la mitochondrie sont de l'ordre de 100 nM soit 10 000 fois moins que dans le RE, cependant les modifications fines de ces concentrations jouent un rôle

primordial dans la fonction et la dysfonction mitochondriale. Il est maintenant accepté que le rôle de la mitochondrie est central dans le métabolisme cellulaire de par sa régulation des signaux calciques cytosoliques, de la phosphorylation oxydative, de la mort cellulaire et des mécanismes sécrétoires (Mammucari et al., 2018; Takeuchi et al., 2015).

Différents canaux calciques et transporteurs entrent en jeu dans la régulation du calcium mitochondrial, situés soit sur l'OMM soit sur l'IMM. La mitochondrie est capable de répondre rapidement à une augmentation de calcium cytosolique, elle a un rôle de tampon qui participe à la régulation de l'homéostasie calcique. Il est en effet facile pour le calcium de passer l'OMM de par la présence de porine mitochondriale VDAC ; néanmoins le passage du calcium au sein de la matrice est plus difficile de par l'imperméabilité de l'IMM et n'est permis que par quelques protéines clés.

VDAC existe sous 3 isoformes, VDAC1, VDAC2, VDAC3, mais les isoformes 2 et 3 ont suscité à ce jour peu d'intérêt et leur fonction cellulaire est encore mal comprise, d'autant plus que VDAC1 est l'isoforme la plus exprimée (10 fois plus que l'isoforme 2 et 100 fois plus que la 3 dans les cellules HeLa) (De Pinto et al., 2010). Toutefois, il n'est pas à exclure qu'il existe une expression différentielle de ces différentes isoformes entre les tissus. VDAC1, en plus d'être un transporteur du calcium, permet aussi l'entrée de métabolites dans la mitochondrie tels que le pyruvate, l'ATP et le NADH (Gincel et al., 2000; Rostovtseva and Colombini, 1997; Shoshan-Barmatz et al., 2017). La sous-expression de VDAC1 a pu mettre en évidence son rôle dans la production d'ATP, mais également dans l'apoptose (Abu-Hamad et al., 2006; Tajeddine et al., 2008). D'autre part, VDAC1 interagit avec différentes protéines telles que l'hexokinase (Neumann et al., 2010), des protéines de la famille [Bcl-2 \(B cell protein 2\)](#) (Arbel and Shoshan-Barmatz, 2010) ou encore des protéines du cytosquelette (Carré et al., 2002). Une somme considérable d'avancées aussi bien structurelles que fonctionnelles ont été faites sur VDAC1 ces dernières années la plaçant comme un acteur central dans le métabolisme énergétique et dans le contrôle de l'apoptose.

Depuis 2011 seulement, un nouvel acteur du contrôle du calcium mitochondrial est apparu, le [MCU \(Mitochondrial Calcium Uniporter\)](#) (De Stefani et al., 2011). Le MCU est localisé dans l'IMM et permet de contrôler l'entrée du calcium au sein de la matrice mitochondriale. Son expression est ubiquitaire, cependant il est plus exprimé dans certains

tissus tels que le muscle, la thyroïde ou les poumons (De Stefani et al., 2016). Le MCU est composé de différentes sous-unités auxiliaires telles que MCUB, MICU1/2 (Mitochondrial Calcium Uptake 1/2), EMRE (Essential MCU Regulator) (Figure 10). Ces différentes sous-unités forment un complexe d'environ 480 kDa (Baughman et al., 2011). MICU1/2 régulent l'activité du MCU de par leurs capacités à fixer le calcium, MICU2 comme inhibiteur et MICU1 tantôt activateur ou inhibiteur selon les concentrations de calcium cytosolique (Logan et al., 2014). Le modèle d'inactivation du MCU (MCU KO) a révélé de manière surprenante des souris viables sans signe de mort cellulaire (Murphy et al., 2014), soulevant la présence d'un système compensatoire. Les regards se tournent actuellement sur un potentiel transporteur de calcium, *Letm1* (Leucin-Zipper EF Hand Containing Transmembrane protein 1), dont l'implication reste controversé (Austin et al., 2017). La sous-expression de MCU ou de ses partenaires est également à l'origine d'une altération de la sécrétion d'insuline, soulevant le rôle important du contrôle du calcium mitochondrial dans la fonctionnalité de la cellule β pancréatique (Mammucari et al., 2018; Wiederkehr et al., 2011).

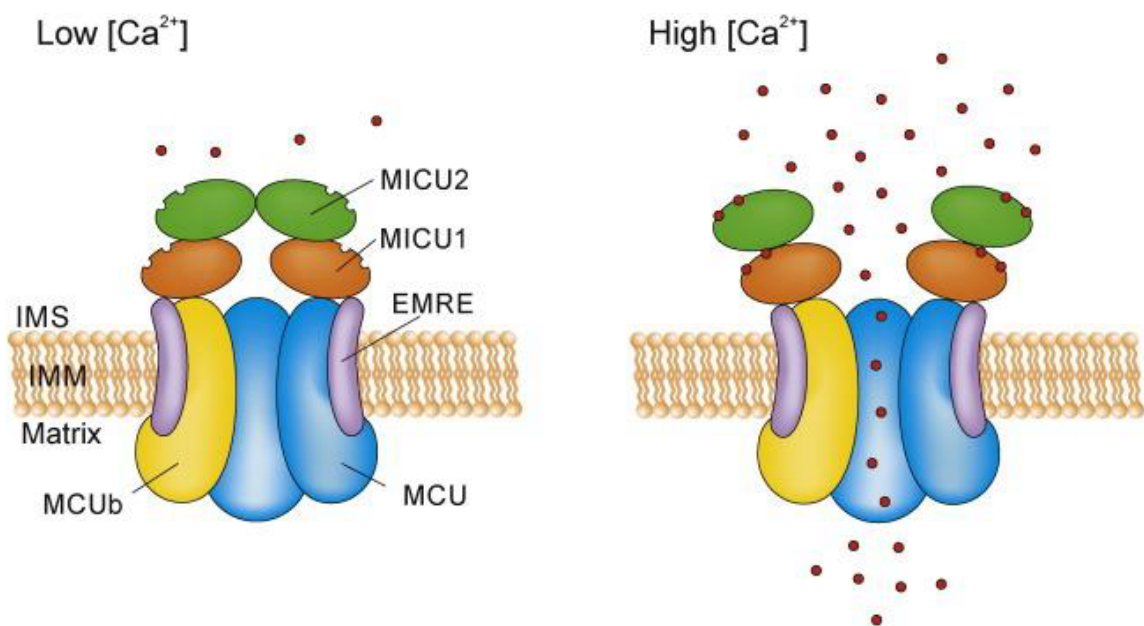


Figure 10 : Image représentant le complexe MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). Le complexe MCU est constitué du MCU, MICU1/2 (Mitochondrial Calcium Uptake 1/2), EMRE (Essential MCU Regulator) et MCUB (Mitochondrial Calcium Uniporter b). A faible concentration de calcium dans l'espace intermembranaire, le canal reste fermé. Alors qu'en présence de fortes quantités de calcium, le canal s'ouvre (Mammucari et al., 2016).

Il existe également 2 voies majeures de sortie du calcium de la matrice assurées par les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}$ Exchangers (NCLX) et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchangers (HCX). Ils sont activés pour éviter un effet délétère de l'accumulation du calcium dans la mitochondrie (Palty et al., 2010). Nita et ses collaborateurs ont pu démontrer la contribution de NCLX dans la fonction β pancréatique. La sous-expression de NCLX par siRNA (Small interfering Ribo Nucleic Acid) entraîne une accumulation du calcium dans la mitochondrie mais un reflux lent, faisant apparaître un délai dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, démontrant le rôle critique de la régulation calcique mitochondriale dans la fonction β .

Les conséquences de l'accumulation de calcium dans la mitochondrie ont été décrites pour la première fois en 1961 (Deluca and Engstrom, 1961) reliant le calcium mitochondrial à la production d'ATP. Depuis, plusieurs études se sont intéressées au rôle du calcium dans la fonctionnalité mitochondriale avec un intérêt croissant ces dernières années dû au développement de sondes permettant le suivi indirect ou direct des concentrations de calcium mitochondrial. L'augmentation du calcium dans la mitochondrie active plusieurs déshydrogénases du cycle de Krebs dans la matrice telles que l'oxoglutarate déshydrogénase, la pyruvate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase. Cette activation entraîne une augmentation du ratio NADH/NAD et ainsi favorise la production d'ATP par phosphorylation oxydative (Satrústegui et al., 2007) (**Figure 11**). Rutter et ses collaborateurs ont aussi démontré l'importance de l'augmentation du calcium mitochondrial dans la synthèse d'ATP au sein de la cellule β , celle-ci étant dépendante de l'activité du MCU (Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter) permettant le passage du calcium au niveau de la matrice mitochondriale (Rutter et al., 2006). L'importance de l'accumulation du calcium dans la mitochondrie dans la fonctionnalité de la cellule β a été démontrée de manière élégante par l'utilisation de la protéine S100G qui tamponne le calcium de la matrice mitochondriale et réduit la production d'ATP et par conséquent la production d'insuline (Wiederkehr et al., 2011), résultats retrouvés par d'autres par la suite (Alam et al., 2012; Quan et al., 2015; Tarasov et al., 2013).

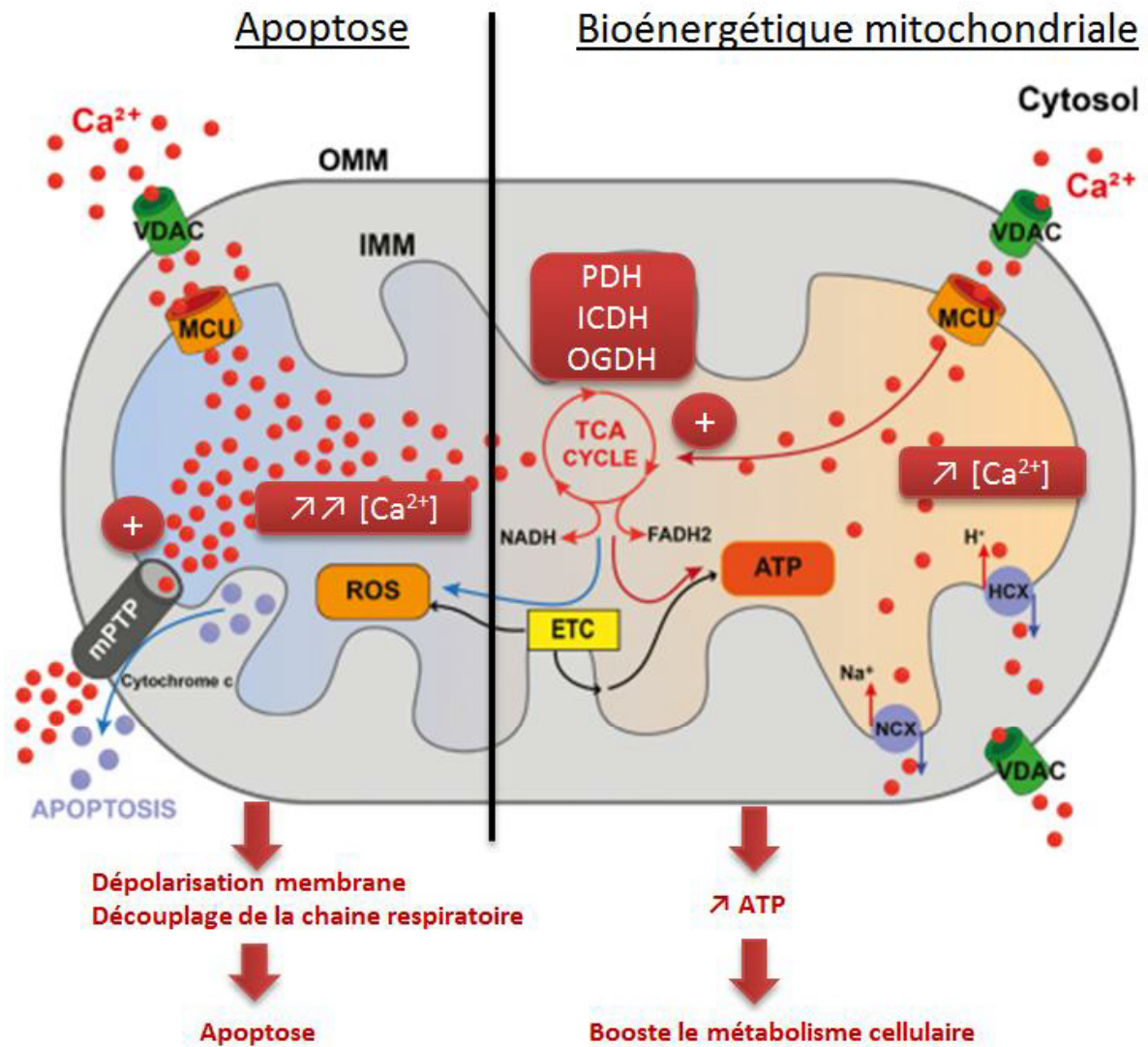


Figure 11 : Régulation des fonctions mitochondriales par le calcium. « Le calcium mitochondrial active différentes déshydrogénases du cycle de Krebs (ou TCA) présentes dans la matrice, comme la PDH (Pyruvate Déshydrogénase), l'oxoglutarate déshydrogénase (ODGH) et l'isocitrate déshydrogénase (ICDH). Ces processus favorisent la production d'ATP par le cycle TCA (Tricarboxylic Acid) mais une trop forte accumulation de calcium dans la mitochondrie va aussi entraîner l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore), le relargage du cytochrome C et mener à l'apoptose. La production de ROS (Reactive Oxygen Species) est également favorisée par l'augmentation du calcium mitochondrial, possiblement via la production de NADH ». ETC : Electron Transport Chain (Mammucari et al., 2018; Takeuchi et al., 2015).

Les points d'entrée du calcium dans la mitochondrie peuvent être multiples. Les contacts étroits entre le réticulum endoplasmique (stock calcique de la cellule) et la mitochondrie favorisent les échanges calciques de par la création de microdomaines (Csordás et al., 2006).

L'augmentation des concentrations de calcium dans la mitochondrie peuvent aussi être à l'origine d'effets délétères, comme la production d'**espèces réactives à l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species)** (Satrústegui et al., 2007). Une induction prolongée de l'accumulation de calcium dans la mitochondrie peut entraîner l'ouverture du **PTP (Permability Transition Pore)**. Son ouverture provoque une dépolarisation de l'IMM entraînant un découplage de la chaîne respiratoire, mais aussi la sortie du **cytochrome C (Cyt C)** à l'origine d'une induction d'apoptose (**Figure 11**) (Bernardi et al., 2006). De la même manière, l'augmentation de l'expression de VDAC1 induit une oligomérisation entre plusieurs VDAC1 provoquant le relargage du Cyt C et par conséquent l'apoptose de la cellule (Zalk et al., 2005). De manière intéressante, la **cyclophiline D (CypD)** localisée dans la matrice mitochondriale semble jouer un rôle sur l'ouverture du PTP, son ablation (KO CypD) double le seuil de calcium requis à l'ouverture de celui-ci ; d'autre part la surexpression de CypD désensibilise la cellule à l'apoptose (Basso et al., 2005).

-ADN mitochondrial (ADNmt)

Au cours de l'évolution, la taille du chromosome mitochondrial n'a cessé de diminuer. Néanmoins, la mitochondrie a gardé des caractéristiques de ses ancêtres telles que la double membrane et la production d'ATP. De par sa symbiose avec son hôte, la mitochondrie a progressivement transféré son matériel génétique au génome nucléaire (Gabaldón and Huynen, 2004). Le génome mitochondrial humain code pour 13 protéines, toutes présentes au sein des complexes de la chaîne respiratoire I à IV encastés dans l'IMM. Il code aussi pour 22 **ARN de transfert (ARNt)** et 2 ribosomes mitochondriaux. Les mutations de l'ADNmt sont délétères pour la fonction mitochondriale et apparaissent dans diverses maladies telles que le cancer, les maladies mitochondriales ou encore des pathologies neurodégénératives (Bannwarth et al., 2013; Jakupciak et al., 2008; Lax et al., 2011). L'ADNmt est visible dans la mitochondrie sous forme de nucléoides dans la matrice mitochondriale (Friedman and Nunnari, 2014). La quantité de celui-ci relativement au génome nucléaire peut être étudiée par **qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction)** par la quantification de l'expression de **COX1 ou COX2 (Cytochrome C oxydase 1 ou 2, ARNm issues de l'ADNmt)** et **PPiA (Peptidylpropyl Isomerase A, ARNm issu de l'ADN génomique)**, mais aussi par d'autres techniques.

-Transfert de mitochondries

Un nouveau concept a émergé très récemment, celui du transfert intercellulaire de mitochondries. Ce transfert d'organites entre cellules a été démontré dans différents modèles tels que les glandes surrénales (Rustom et al., 2004) ou l'épithélium alvéolaire pulmonaire (Islam et al., 2012). L'hypothèse actuelle vise à démontrer que ce processus est bénéfique pour la cellule receveuse. Néanmoins ce mécanisme pourrait aussi être un processus adaptatif pour éliminer les mitochondries ayant accumulé des erreurs. Ces mécanismes n'ont pour l'instant cependant pas été étudiés dans la cellule β pancréatique.

2.2.3) Dynamique mitochondriale

Beaucoup d'études indiquent que la morphologie des mitochondries est cruciale pour la physiologie de la cellule (Picard and Turnbull, 2013). Ces changements morphologiques permettent ainsi à la cellule de s'adapter à la demande énergétique. Les mitochondries constituent une population dynamique d'organites tantôt individuels (fissionnés, fragmentés, ou ponctiformes), tantôt sous forme de réseau interconnecté (fusionnés/tubulaires), possible de par la plasticité de cet organite. D'autre part, la morphologie des mitochondries varie aussi selon le type cellulaire (Kuznetsov et al., 2009).

-Fusion : Mfn1, Mfn2, OPA1 (Figure 12)

Les principales protéines à l'origine de la régulation de la fusion de l'OMM sont **Mfn1 (Mitofusin 1)** et **Mfn2 (Mitofusin 2)**, membres de la famille des « dynamin-related GTPases ». Malgré leurs homologies, ces 2 isoformes ont des rôles différents. Mfn1/2 sont encastrés dans l'OMM et forment entre elles des ponts entre les mitochondries de par la génération d'hétéro-oligomères. Mfn1 a une expression ubiquitaire (Ishihara et al., 2004), tandis que Mfn2 a une expression différentielle selon les tissus (Bertholet et al., 2016). Mfn1 favorise les contacts entre les mitochondries et dépend de l'hydrolyse du GTP. Néanmoins, les contacts mitochondrie-mitochondrie par interaction homotypique de Mfn1 sont 100 fois plus forts que ceux induits par Mfn2. Mfn2 a une faible activité GTPase et semble intervenir de manière plus tardive dans la fusion mitochondriale ; d'autre part la perte de Mfn2 entraîne la formation de mitochondries fragmentées plus grosses que pour Mfn1 (Ishihara et al., 2004). Bien que le rôle de Mfn2 soit encore sujet à débat à ce jour, les 2 isoformes sont

essentielles à la fusion mitochondriale, leur sous-expression est en faveur de la fission. Mfn2 joue également un rôle dans les contacts inter-organites (de Brito and Scorrano, 2008) décrits plus précisément en partie 3.

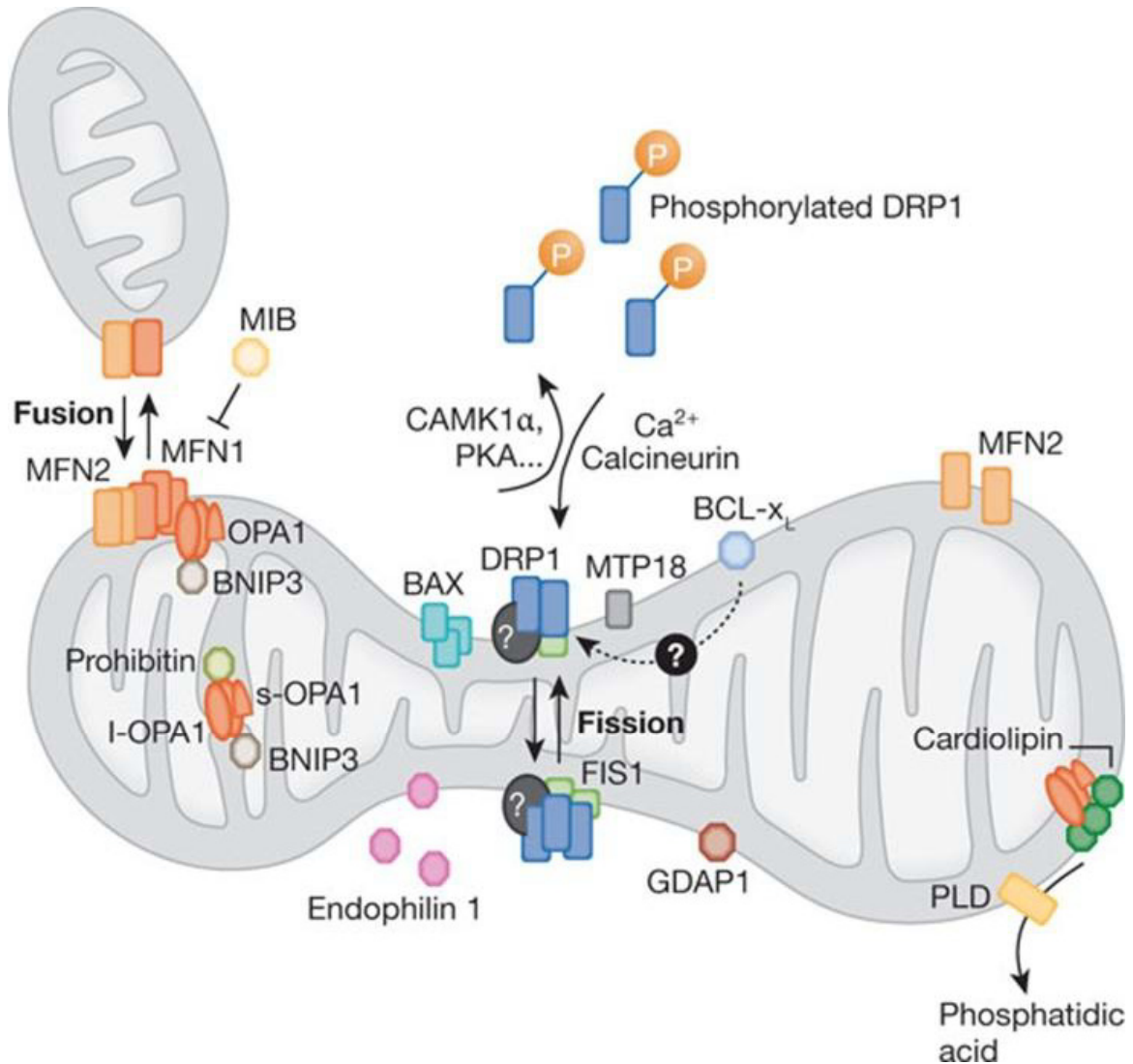


Figure 12 : Dynamique mitochondriale des événements impliqués dans la fusion ou la fission. Quand Drp1 est déphosphorylée, elle est recrutée à la membrane externe de la mitochondrie par Fis1 et d'autres protéines encore inconnues. L'oligomérisation de Drp1 est suivie par une constriction de la membrane mitochondriale et la fission. Les molécules pro-fusion (Mfn1/2 au niveau de la membrane externe et Opa1 au niveau de la membrane interne) s'oligomérisent pour induire la fusion des mitochondries. D'autres acteurs sont également présentés ici (Campello and Scorrano, 2010).

La fusion de l'IMM est permise par la GTPase OPA1 (Optic Atrophy 1). L'implication de la dysfonction d'OPA1 dans l'atrophie optique n'est plus à démontrer. Sa perte initie une déstructuration de la dynamique mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la

susceptibilité à l'apoptose (Meeusen et al., 2006). A l'inverse, sa surexpression est protectrice contre l'apoptose (Cipolat et al., 2006). Son expression est ubiquitaire, elle est localisée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial et est ancré à l'IMM (Olichon et al., 2002). OPA1 a 2 sites de clivage qui génèrent 2 formes distinctes : une forme courte et une forme longue dont découle la dualité fonctionnelle de cette protéine. En effet, la génération de la forme courte initie la fragmentation mitochondriale, alors que la forme longue favorise la fusion (Anand et al., 2014). La métalloprotéase **OMA1 (Overlapping activities with m-AAA protease)** est l'une des enzymes protéolytiques impliquées dans le clivage d'OPA1 vers la forme courte. Curieusement, les souris OMA1 KO présentent une plus forte sensibilité aux stress métaboliques tels qu'un régime riche en graisses, soulignant l'importance de l'équilibre fusion-fission dans l'homéostasie du métabolisme (Quirós et al., 2012). Quant à YME1L1 (i-AAA protease), elle clive OPA1 pour générer la forme longue favorisant la fusion mitochondriale. La délétion d'YME1L1 induit l'accumulation de formes courtes d'OPA1 menant à la fission mitochondriale (Anand et al., 2014).

D'autres nouveaux acteurs ont été décrits tels que LETM1 (Dimmer et al., 2008), la prohibitin (Merkwirth et al., 2008) ou encore la **phospholipase D mitochondriale (MitoPLD)** (Choi et al., 2006) qui semblent contrôler la fusion mitochondriale, mais leurs rôles restent encore peu clairs à ce jour.

La fusion totale ou « hyperfusion » a lieu en conditions de jeun prolongé ou de restriction calorique, elle permet aux mitochondries de maximiser l'efficacité mitochondriale (Mittra et al., 2009). La fusion mitochondriale pourrait également permettre la complémentarité entre plusieurs ADN mitochondriaux et la protection contre les mutations mitochondriales qui précèdent la dysfonction de la chaîne respiratoire (Chen et al., 2005).

-Fission : Drp1, Mff, Fis1 (Figure12)

Drp1 (Dynamamin-Related Protein 1) est l'une des protéines les plus étudiées pour son implication dans la fission mitochondriale. Cette GTPase s'associe à l'OMM par l'intermédiaire de **Fis1 (Fission protein 1)** considérée comme le « récepteur » de Drp1 ; néanmoins cette question reste encore controversée d'autant que le KO Fis1 engendre un défaut modéré de la fission (Losón et al., 2013). L'implication de Fis1 pourrait être spécifique à des conditions de stress plutôt qu'en conditions physiologiques telles que l'apoptose ou la

mitophagie (Rojansky et al., 2016). Le recrutement de DRP1 au site d'initiation de la fission mitochondriale est dépendant également de modifications post-traductionnelles que DRP1 peut porter, telles que la phosphorylation, la sumoylation, la S-nitrosylation ou encore la O-GlcNAcylation (Pagliuso et al., 2018). Fis1 n'est pas le seul récepteur décrit, il existe aussi **Mff (Mitochondrial fission factor)** et **MiD49/51 (Mitochondrial Division 49/51)**. Mff est situé sur l'OMM et facilite l'amorçage de Drp1 sur la mitochondrie, sa surexpression favorise le recrutement de Drp1 et initie la fission mitochondriale (Otera et al., 2010). L'abondance de différents récepteurs de Drp1 (Mff, Fis1, MiD49/51) suggère qu'ils doivent jouer des rôles à la fois redondants ou individuels dans le recrutement de Drp1. Ils pourraient permettre également au réticulum endoplasmique d'intervenir dans l'induction de la fission mitochondriale (voir partie 3). Ces études placent Drp1 comme acteur central de la fission, cependant des études ont pu montrer l'existence d'une fission indépendante de Drp1 (Stavru et al., 2013; Yamashita et al., 2016).

De plus, lorsque les régions **HR1 (Heptad-Repeat regions)** et HR2 de Mfn2 interagissent, le changement de conformation de Mfn2 assure le recrutement de DRP1 et mène à la fission mitochondriale (Huang et al., 2011). Ce qui soulève la question du double rôle des protéines de la dynamique mitochondriale dans la fusion ou la fission et l'importance de leurs interactions réciproques.

-Dynamique mitochondriale et bioénergétique/dysfonction

Le rôle physiologique des changements morphologiques de la mitochondrie commence à être élucidé mais l'équation est complexe et doit prendre en compte la compartimentalisation des mitochondries, leur forme et l'état global de la cellule. La relation entre la dynamique mitochondriale et la bioénergétique pourrait être bidirectionnelle, c'est-à-dire que la fonction mitochondriale influe sur sa morphologie et inversement (Benard et al., 2007) mais cette idée est encore débattue à ce jour. Quelques arguments viennent corroborer cette hypothèse. Notamment dans des contextes pathologiques les mitochondries qui dysfonctionnent peuvent apparaître gonflées et arrondies ou « swollen » (Masini et al., 2017). Les protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale peuvent aussi affecter la fonction mitochondriale. Par exemple OPA1 contrôle la disponibilité du cytochrome C avant son relargage, contrôlant ainsi l'apoptose (Cipolat et al., 2006).

Beaucoup d'études sont quand même en accord avec le fait que la fission est également un moyen pour la cellule d'éliminer les mitochondries qui dysfonctionnent par autophagie (Picard and Turnbull, 2013; Rovira-Llopis et al., 2017; Youle and Narendra, 2011), un mécanisme appelé maintenant mitophagie. Ces dernières années, des études ont aussi montré que la fission mitochondriale est dépendante de l'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale (Cho et al., 2017). Or la concentration de calcium dans la mitochondrie assure la régulation de différentes enzymes du cycle de Krebs et favorise la production de NADH et de FADH₂ (comme décrit précédemment). Il n'est donc pas impossible qu'indépendamment des mécanismes de mitophagie, la fission mitochondriale soit un moyen pour la cellule de favoriser sa production d'énergie, si celle-ci est transitoire et finement régulée.

-Rôle de la dynamique mitochondriale dans la sécrétion d'insuline par la cellule β

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose, requiert la production mitochondriale d'ATP à l'origine de la dépolarisation membranaire induisant l'exocytose des vésicules d'insuline. La sécrétion d'insuline est donc le reflet de la fonction mitochondriale. Peu d'études ont évalué l'implication de la dynamique mitochondriale en réponse à une stimulation aiguë au glucose. Jhun et ses collaborateurs (Jhun et al., 2013) ont suivi l'évolution de la dynamique mitochondriale en réponse à une stimulation de 60 min avec 20 mM de glucose sur la lignée INS1-E, cellules β de rat. Ils observent tout d'abord qu'avant la stimulation, le pourcentage de cellules en état de fusion, c'est à dire associées à des mitochondries de forme tubulaire, est majoritaire. Néanmoins dès l'ajout du glucose après seulement 5 min et avec un pic à 15 min, les mitochondries fissionnent ponctuellement pour retourner après 1h à leur état initial tubulaire. L'inhibition de la fission mitochondriale par l'intermédiaire d'un adénovirus DRP1 tronqué bloque la fission ponctuelle induite par le glucose mais bloque également la sécrétion d'insuline, corrélée à une diminution de la production d'ATP, du potentiel de membrane ainsi qu'un blocage de la respiration (Jhun et al., 2013). Cette étude met en avant le rôle important de la dynamique mitochondriale dans la fonctionnalité mitochondriale qu'est la respiration et ainsi dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette étude est à ma connaissance la seule traitant ce sujet. Le rôle précis de la dynamique mitochondriale dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose reste à être élucidé.

Partie 2 : Dysfonction de la cellule β et diabète de type 2

1) Généralités sur le diabète de type 2

Le terme diabète découle du grec διαβήτης qui signifie « couler à travers » qui rappelle les principaux symptômes historiquement connus du diabète, la soif et la nécessité d'uriner fréquemment, des symptômes décrits dès l'antiquité, ce qui fait du diabète l'une des pathologies les plus anciennes reconnues. De nos jours, cette pathologie touche dans le monde plus de 8% de la population en 2016, soit 422-552 millions d'adultes diabétiques dans le monde. D'ici 2030 le diabète pourrait devenir la 7^{ème} cause de décès dans le monde (OMS, consulté le 03/10/18) (Whiting et al., 2011)

La destruction de l'îlot de Langerhans a été pour la première fois corrélée au diabète en 1901 par Eugene L. Opie (Opie, 1901). C'est aussi grâce aux expériences d'Oskar Minkowski et Josef Von Mering montrant qu'un diabète sucré se développe chez le chien après ablation du pancréas que le rôle du pancréas dans le développement du diabète a été démontré. C'est ensuite en 1920 que Frederick Grant Banting apporte une avancée majeure, il tente d'extraire le contenu pancréatique pour le tester comme traitement antidiabétique. C'est en 1922 que la première injection d'insuline à l'homme sauve un jeune garçon diabétique (Fédération Française des diabétiques, consulté le 20/10/18). Depuis de nombreuses avancées utilisées comme traitements palliatifs ont été développées allant des pompes à insuline, jusqu'à la transplantation d'îlots et récemment l'encapsulation d'îlots dans des « pancréas bioartificiels » (Kieffer et al., 2017)

Le diabète de type 2 correspond à environ 80-90% des cas de diabète, en comparaison avec le diabète de type 1 auto-immunitaire, les diabètes monogéniques ou encore le diabète gestationnel (Rorsman and Braun, 2013). Les causes exactes du diabète de type 2 et les mécanismes moléculaires précis mis en jeu restent à être élucidées. Il est néanmoins reconnu qu'une alimentation riche en sucre et en graisse ainsi qu'une faible activité physique sont 2 facteurs clés du développement du diabète de type 2 ; il est aussi reconnu qu'il existe une certaine susceptibilité génétique qui entrent en compte dans le développement du diabète de type 2.

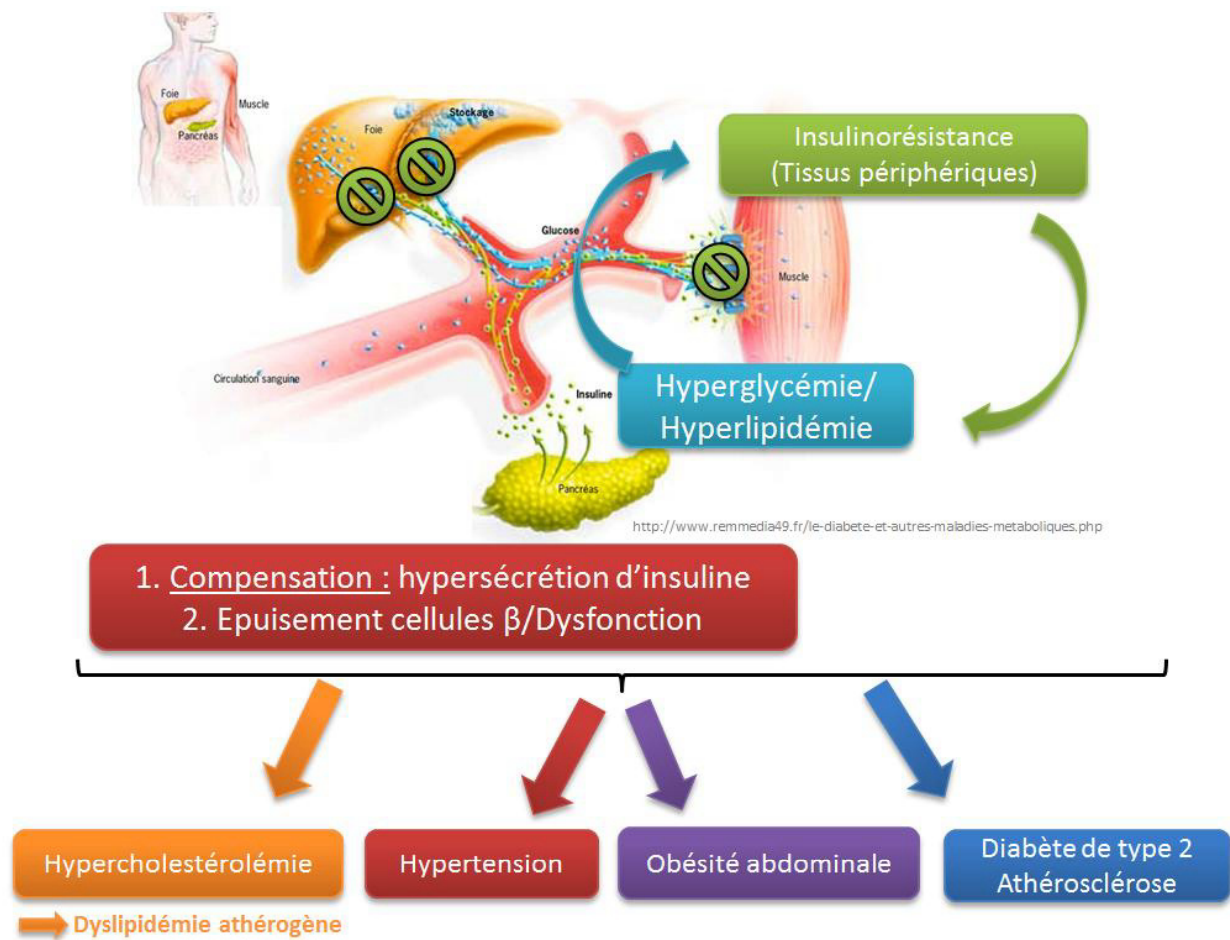


Figure 13 : Dysfonctions associées au diabète de type 2. L'hyperglycémie et l'hyperlipidémie favorisent le développement de l'insulino-résistance, qui est dans un premier temps compensée par une hypersécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique, mais qui à terme provoque l'épuisement et la dysfonction des cellules β . Ceci favorise l'hyperglycémie et donc l'insulino-résistance. Ces processus favorisent le développement du diabète de type 2, de l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'obésité et l'athérosclérose

Une des caractéristiques du diabète de type 2 est l'insulino-résistance des tissus périphériques tels que le muscle squelettique, le foie ou encore le tissu adipeux, pouvant être expliquée essentiellement par un défaut de transduction du signal découlant du RI. Cette incapacité des tissus périphériques à répondre à l'insuline provoque une glycémie élevée à jeun et en post-prandial due à l'incapacité des tissus périphériques à capter le glucose sanguin (**Figure 13**). Pour compenser cette hyperglycémie, les cellules β pancréatiques sécrètent plus d'insuline mais à terme s'épuisent et meurent en majorité avec une perte de 25-60% de la masse β pancréatique lors d'un diabète avancé (Butler et al.,

2003; Rahier et al., 2008). De plus, les cellules β pancréatiques restantes présentent des anomalies fonctionnelles.

Le diabète de type 2 appartient à la catégorie des maladies métaboliques associées à diverses complications notamment cardio-vasculaires, telles que la thrombose ou l'hypertension, mais aussi des maladies rénales, la stéatose hépatique, la dyslipidémie, l'obésité ou encore la rétinopathie... (Goyal and Jialal, 2018)

2) Dysfonction β pancréatique, une caractéristique du diabète de type 2

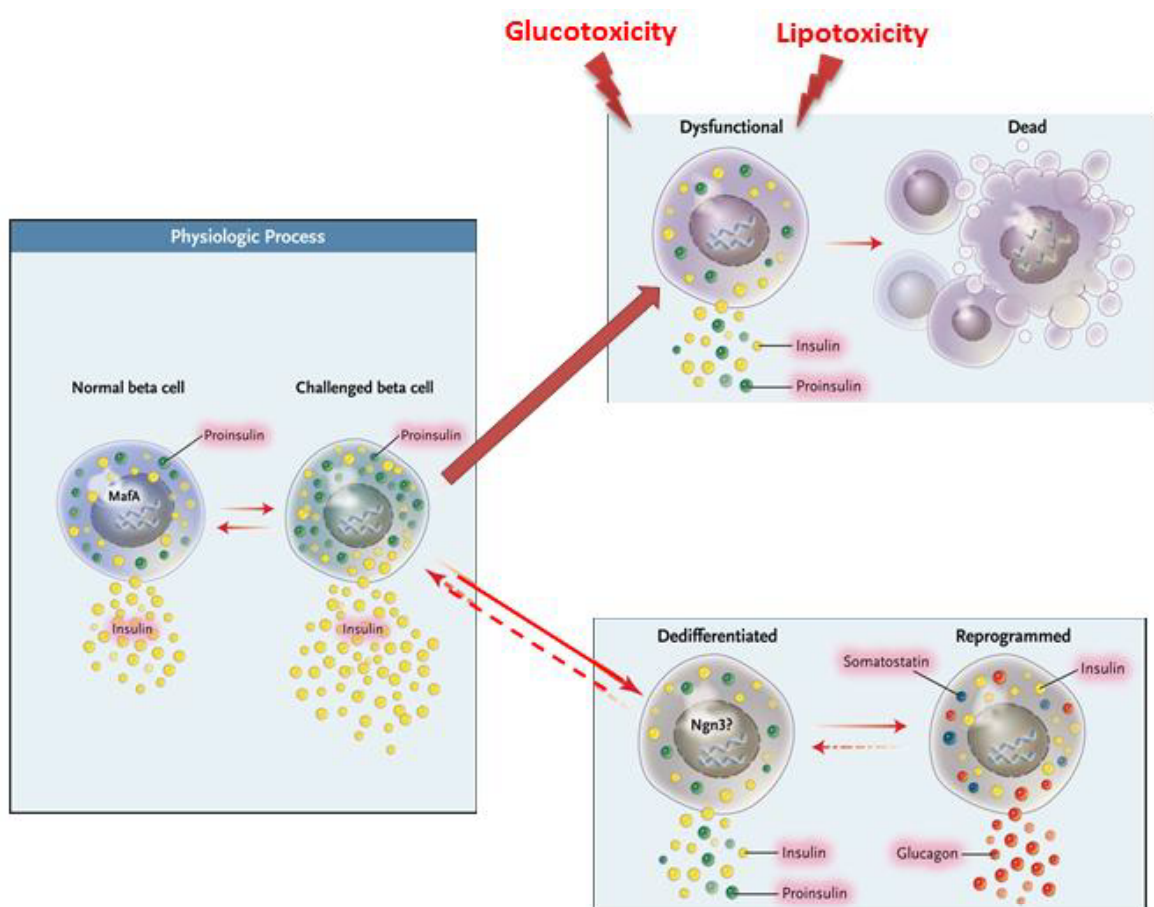


Figure 14 : Hypothèses actuelles permettant d'expliquer la diminution de la masse β pancréatique au cours du développement du diabète de type 2. La première hypothèse décrit que la dysfonction β pancréatique est due à la glucolipotoxicité et mène à l'apoptose des cellules. La seconde hypothèse suggère qu'en réponse aux signaux de la glucolipotoxicité, les cellules adaptent un mécanisme de protection et se différencient en cellules non insulino-sécrétrices (Dor and Glaser, 2013).

La dysfonction et l'apoptose des cellules β pancréatiques sont des caractéristiques d'un diabète de type 2 avancé. Plusieurs hypothèses existent pour justifier la perte et la dysfonction de la masse β pancréatique (**Figure 14**). Les plus reconnues à ce jour montrent que la dysfonction β pancréatique pourrait être due à la glucolipotoxicité (toxicité des fortes concentrations de glucides et de lipides) inhérente à la suralimentation. Cette glucolipotoxicité à terme provoquerait l'apoptose des cellules β . Cette hypothèse fait récemment face à l'idée que les cellules β pourraient se différencier et perdre leur capacité à sécréter l'insuline. Je décris ci-dessous ces 3 axes (**Lipotoxicité, Glucotoxicité et Dédifférenciation**).

2.1) Lipotoxicité

2.1.1) Métabolisme lipidique

Les lipides sont des substrats énergétiques apportés essentiellement par la viande, les produits laitiers et le poisson. Les **triglycérides (TG)** (Glycérol estérifié par 3 acides gras) sont la forme majoritaire apportée par l'alimentation, ils peuvent être présents également sous forme de phospholipides ou de cholestérol. Les **acides gras (AG)** peuvent être sous forme saturés ou insaturés mais ils peuvent aussi être classés selon la taille de leur chaîne carbonée : on discrimine les AG à chaînes courtes (< 6 carbones), moyennes (6-12 carbones) et longues (>12 carbones). Les lipides peuvent circuler sous forme de TG véhiculés via les chylomicrons ou les **VLDL (Very Low Density Lipoprotein)**, sous forme d'AG libres ou de corps cétoniques. Les AG sont utilisés par la mitochondrie pour assurer la β -oxydation. Les lipides sont majoritairement stockés sous forme de TG dans le tissu adipeux, le muscle squelettique ou le foie. Le glucose sous l'action positive de l'insuline peut également être transformé en TG via la lipogénèse de novo, principalement dans le foie (Widmaier et al., 2013)

2.1.2) Difficultés du modèle de lipotoxicité

La lipotoxicité, ou exposition chronique à des fortes concentrations d'AG est une notion difficile à appréhender. Il n'existe pas de consensus quant à la durée ou la quantité d'AG à utiliser pour induire une lipotoxicité.

De plus, l'effet d'un AG libre dépend de sa quantité, de son état de saturation ainsi que de la taille de sa chaîne carbonée. Par exemple le palmitate (C16 :0) a des effets

délétères sur la sécrétion d'insuline (c'est le plus utilisé pour induire la lipotoxicité), alors que le laurate ou le myristate (respectivement C12:0 et C14 :0) sont moins délétères pour la cellule β (Oh et al., 2018). De la même manière, l'acide arachidonique (C20 :4) stimule la prolifération cellulaire et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Keane et al., 2011). L'Oléate (C18 :1), lui est un AG qui stimule la prolifération cellulaire. De plus il a la faculté de protéger la cellule β contre les effets délétères du palmitate (Brelje et al., 2008; Sommerweiss et al., 2013). De plus les AG doivent être conjugués à la BSA pour favoriser leur solubilité et minimiser leurs effets détergents. Dans ce contexte le ratio AG/BSA et l'origine de la BSA sont des facteurs à maîtriser. En outre, l'effet d'un AG peut aussi dépendre de sa translocation dans la cellule ou de l'activation de récepteurs membranaires aux AG (Noushmehr et al., 2005).

2.1.3) Dysfonction β pancréatique et lipotoxicité

La cellule β pancréatique est sujette à la lipotoxicité, il faut néanmoins dissocier les effets aigus des effets chronique des AG libres (Sharma and Alonso, 2014). La lipotoxicité provoque dans la cellule β différents effets incluant le stress cellulaire menant à l'altération de la sécrétion d'insuline, la modification de la masse β et la mort par apoptose.

-Mécanismes d'action des AG

Il existe 2 sortes de mécanisme d'action des AG, via des protéines de transports d'AG comme le CD36, connu aussi sous le nom de **FAT (Fatty Acid Translocase)**, ou via des récepteurs membranaires comme les **GPRs (G Protein coupled Receptors)** (Noushmehr et al., 2005). Le CD36 permet à certains AG de passer la membrane plasmique par transport actif. Dans la cellule β , il est exprimé à la fois à la membrane plasmique et dans les granules de sécrétion d'insuline (Noushmehr et al., 2005). Le CD36 facilite le transport des AG au sein de la cellule β et réduit la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation aigue au palmitate ou à l'oléate (Wallin et al., 2010).

Il existe 4 types de GPCRs exprimés dans la cellule β , GPR40, GPR41, GPR43, GPR120. Les récepteurs GPR40 et GPR120 sont actuellement les plus décrits en ce qui concerne l'effet de la lipotoxicité sur les cellules β . GPR40 est exprimé de manière très abondante dans le pancréas et spécifiquement plus exprimé dans l'îlot. GPR40 est activé préférentiellement par

les AG à chaînes carbonées moyennes ou longues. En réponse à une stimulation aigue aux AG (palmitate), GPR40 permet d'assurer la potentialisation de la sécrétion d'insuline (Itoh et al., 2003; Nagasumi et al., 2009). A l'inverse, lors d'une stimulation prolongée de palmitate, GPR40 joue un rôle délétère sur la sécrétion d'insuline, mais ces effets délétères sont partiellement réduits par l'utilisation d'antagonistes de GPR40 (Kristinsson et al., 2013). Ces études sont controversées et l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes ciblant GPR40 dans le cadre du traitement du diabète de type 2 reste encore à préciser (Li et al., 2018; Wagner et al., 2013). A ce jour, un agoniste a été utilisé en phase clinique III : [TAK-875 \(Fasiglifam\)](#), il présentait des facultés à restaurer la glycémie mais semblait présenter aussi des complications hépatiques (Leifke et al., 2012; Li et al., 2015). GPR120 reconnaît les AG insaturés et les AG saturés à longues chaînes carbonées (Hirasawa et al., 2005; Vangaveti et al., 2010). Il est exprimé dans de nombreux tissus tels que l'intestin ou les poumons mais est aussi exprimé dans la cellule β pancréatique (Dhayal et al., 2008; Kebede et al., 2009). Son activation par l'intermédiaire d'agoniste tel que l'[ALA \(\$\alpha\$ -Linolenic Acid\)](#), augmente la sécrétion d'insuline de manière dose dépendante (Moran et al., 2014). GPR120 pourrait de ce fait lui aussi être un candidat intéressant.

-Dysfonction des organites associés à la lipotoxicité

En considérant le rôle important du RE et de la mitochondrie dans la fonction β pancréatique, il n'est pas surprenant d'observer que l'exposition chronique aux AG saturés est inducteur d'un stress du RE et de dysfonctions mitochondriales (Biden et al., 2014; Supale et al., 2012). Ces aspects seront décrits plus loin.

-Lipotoxicité et masse β pancréatique

Des études se sont récemment intéressées à l'effet des lipides sur la prolifération de la masse β pancréatique, certaines études montrent un effet bénéfique de la lipotoxicité sur le développement de la masse β pancréatique (Brelje et al., 2008; Fontés et al., 2010; Steil et al., 2001), alors que d'autres articles relatent les faits inverses (Maedler et al., 2003; Pascoe et al., 2012). La pertinence de ces modèles *in vitro* chez l'homme n'a pour l'instant pas été démontrée et beaucoup de différences expérimentales pourraient justifier ces discordances. Ces résultats pourraient également marquer la différence entre les phases précoces du

diabète de type 2 où les cellules β pancréatiques tentent de compenser l'insulino-résistance et la phase tardive du diabète de type 2 et la mise en échec de la cellule β .

2.2) Glucotoxicité

2.2.1) Métabolisme glucidique

Les glucides sont avec les lipides et les protéines une source majeure d'énergie et constituent 50-60% d'un repas équilibré. On peut les trouver sous différentes formes : Amidon (polymère de glucose linéaire ou ramifié), saccharose (glucose-fructose) et lactose (glucose-galactose). Le glucose peut être apporté par l'alimentation, la dégradation du glycogène (glycogénolyse) ou encore la néoglucogenèse. Le glucose est utilisé par tous les tissus (notamment les tissus insulino-dépendants). Il sert à la production d'ATP lors du métabolisme oxydatif et peut être stocké sous forme de glycogène. La glycémie est régulée par la sécrétion d'insuline, en favorisant le métabolisme oxydatif et le stockage de glucose dans les tissus périphériques (Widmaier et al., 2013)

2.2.2) Difficultés du modèle de glucotoxicité

L'exposition prolongée à de fortes concentrations du glucose (supérieures à la normoglycémie de 1g/L) est définie sous le terme de glucotoxicité. Il n'existe à ce jour pas de réel consensus clair concernant la dose ou le temps d'exposition nécessaires pour définir la glucotoxicité. L'autre difficulté est de mettre en place des modèles *in vitro* dont la culture peut se faire en « low glucose » (1g/L) sans provoquer de modifications structurelles ou fonctionnelles des cellules (dont la culture se fait normalement à des concentrations de glucose plus élevées). Les concentrations définies comme « high glucose » sont essentiellement comprises entre 3g/L – 6g/L de D-glucose pour des expositions entre 24 et 96h. Ces concentrations et temps d'exposition dépendent également du modèle cellulaire utilisé. Chez un patient diabétique de type 2, la glycémie à jeun est au minimum de 1,26g/L et supérieure à 2g/L après un [OGTT \(Oral Glucose Tolerance Test\)](#) selon l'[ADA \(American Diabetes Association\)](#), consulté le 04/10/18).

2.2.3) Glucotoxicité et dysfonction β pancréatique

Il est maintenant bien défini que la mise en place du diabète de type 2 suit une évolution biphasique. Dans un premier temps, la cellule β tente de compenser

l'hyperglycémie chronique (Glucotoxicité) inhérente à l'insulino-résistance par une hypersécrétion d'insuline, associée à une augmentation de la masse β pancréatique. Mais dans un second temps la glucotoxicité provoque la dysfonction et l'apoptose de la cellule β , ce qui altère la sécrétion d'insuline. Différentes altérations et voies métaboliques sont associées à cette dysfonction β pancréatique notamment le stress du RE et la dysfonction mitochondriale sont prépondérants, ces points seront abordés plus loin. Mais la voie des hexosamines, les AGEs, la voie PKC et l'inflammation en sont aussi les acteurs et ils sont décrits ci-dessous (Bensellam et al., 2012) (**Figure 15**).

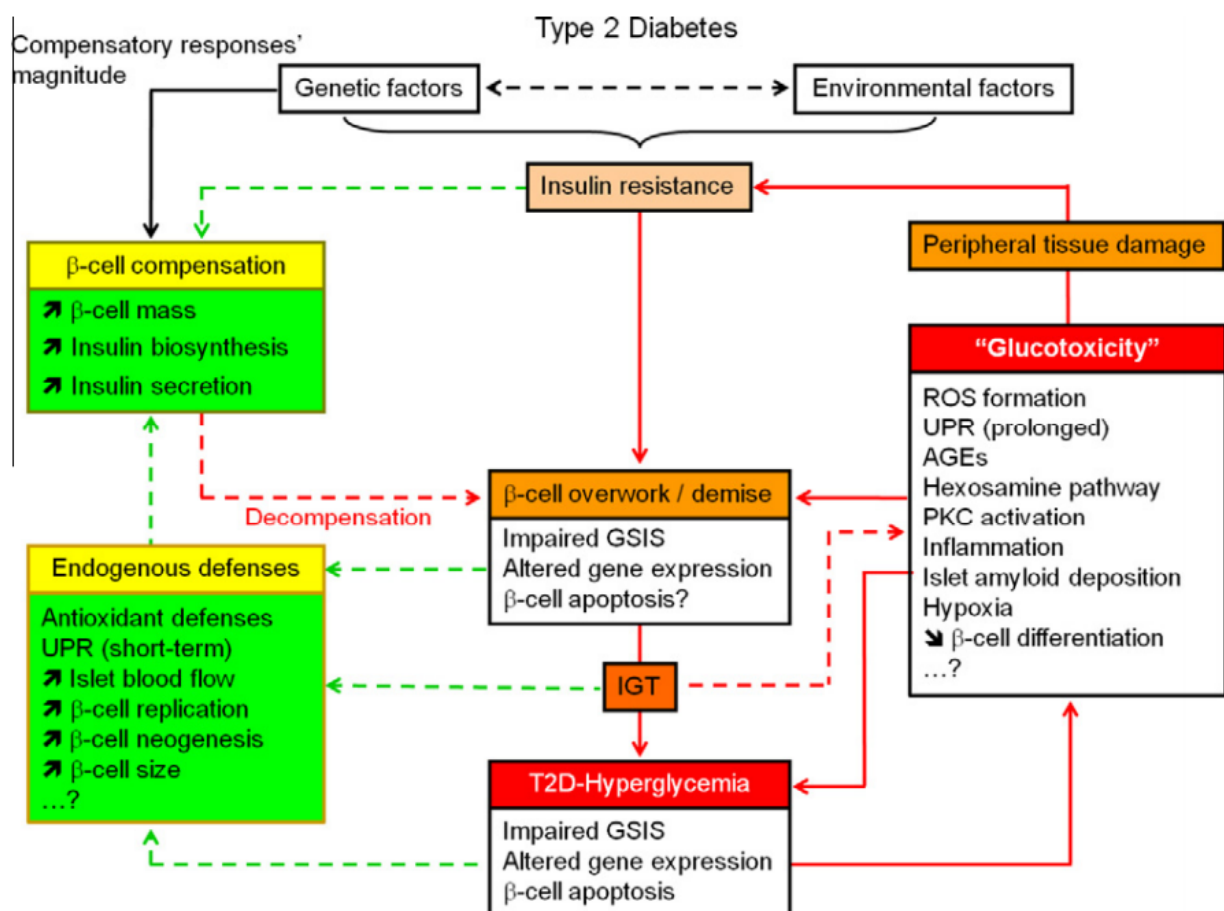


Figure 15 : Représentation schématique des différents mécanismes intervenant dans la pathophysiologie de la cellule β associée au diabète de type 2, qui précède et suit l'établissement de l'hyperglycémie ainsi que le rôle aggravant de la glucotoxicité (Bensellam et al., 2012).

-La voie des Hexosamines

La voie biosynthétique des hexosamines est une voie alternative que peut utiliser le glucose. Elle est utilisée par environ 5% du glucose qui entre dans la cellule. Lors d'une

suractivation de la glycolyse, le fructose-6-phosphate formé peut être converti en glucosamine-6-phosphate en présence de glutamine via la GFAT (Glutamine : Fructose-6-phosphate amidotransferase). Le glucosamine-6-phosphate sera ensuite métabolisé en **UDP-GlcNac (Uridine Diphosphate-N-Acetylglucosamine)**, c'est ce qu'on appelle la voie des hexosamines. L'UDP-GlcNac va servir de substrat pour une autre enzyme l'**OGT (Olinked β -N-acetylglucosamine Tranferase)**, qui favorise la O-GlcNacylation des protéines. Ainsi, les protéines O-GlcNacylées vont subir des modifications de perte ou de gain de fonction (Denzel and Antebi, 2015; Yanagida et al., 2014). L'O-GlcNacétylation des protéines favorise ainsi le développement du stress oxydatif, du stress du RE et sensibilise la cellule β à l'apoptose (D'Alessandris et al., 2004). La suractivation de la voie des hexosamines a été démontrée lors de la glucotoxicité. Elle induit l'inhibition de la sécrétion d'insuline et l'apoptose, par la diminution de l'expression de GLUT2 et de la glucokinase. D'autre part, la glucosamine à elle seule induit un stress du RE dans la cellule β (Lombardi et al., 2012; Yoshikawa et al., 2002), ce qui confirme l'implication de la voie des hexosamines dans les effets délétères de la glucotoxicité.

-Les AGEs (Advanced Glycation End Product)

L'hyperglycémie inhérente à la dérégulation de la sécrétion d'insuline va provoquer la glycation (fixation d'un sucre) des protéines et la formation des AGEs. De telles preuves ont déjà été observées dans des îlots de modèle murin (Pascal et al., 2010). Les AGEs formés en réponse à la glucotoxicité vont avoir des effets délétères sur la sécrétion d'insuline. Ces effets pourraient être dépendants de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Lin et al., 2012). Les **récepteurs aux AGEs (RAGE)** présents à la surface de la cellule, semblent jouer un rôle eux aussi dans les effets délétères des AGEs. Leur inhibition protège de l'apoptose induite par stimulation aux AGEs (Zhu et al., 2011). Enfin, une autre étude suggère que les AGEs altèrent la translocation du facteur de transcription **Pdx1 (Pancreatic and duodenal Homeobox 1)**, altérant ainsi l'expression du gène de l'insuline (Puddu et al., 2010). L'ensemble de ces résultats montre que les AGEs jouent un rôle important dans les effets délétères de la glucotoxicité de par la génération de ROS, mais aussi possiblement par une altération de la différenciation β pancréatique et des voies pro-apoptotiques.

-La PKC (Protéine Kinase C)

La PKC intervient dans de nombreux signaux de transduction et semble jouer un rôle dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Knutson and Hoenig, 1994; Wan et al., 2004). Néanmoins dans différents tissus de modèles de souris diabétiques, son activité semble intervenir dans le développement des complications liées au diabète (Koya et al., 1997). Une étude montre aussi que l'activité de la PKC est augmentée dans la cellule β en réponse à la glucotoxicité, celle-ci est suivie par une diminution de l'expression du gène codant pour l'insuline et pourrait participer à la dysfonction β pancréatique (Kaneto et al., 2002). D'autre part, la PKC est présente sous différentes isoformes qui pourraient contribuer à des effets différentiels sur la sécrétion d'insuline (Mellor and Parker, 1998; Schmitz-Peiffer et al., 2007).

-L'inflammation

L'obésité est caractérisée par la présence d'une inflammation dite « à bas bruit ». Or 30% des obèses présentent un diabète de type 2. Cette inflammation a lieu essentiellement au sein du tissu adipeux, des cellules du système immunitaire ou encore des cellules endothéliales et elle est la résultante de l'hyperglycémie. L'inflammation se traduit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines dans le sang (King, 2008). La présence de cellules inflammatoires (macrophages) et l'expression de cytokines inflammatoires ([Interleukine 1 beta : IL-1 \$\beta\$](#)) dans des coupes de pancréas diabétiques de type 2 ont déjà été montrées (Ehse et al., 2007). Mais également dans des modèles de souris diabétiques de type 2 (Homo-Delarche et al., 2006). Ces modèles présentent également une augmentation de l'expression de diverses cytokines et chimiokines dans les îlots (Ikeda, 1994). D'autre part, la glucotoxicité provoque la production d'IL-1 β et induit l'activation des voies pro-inflammatoires [NF \$\kappa\$ B \(Nuclear Factor kappa B\)](#) ainsi que l'apoptose des cellules β pancréatiques. De plus, l'utilisation d'un antagoniste de récepteur à l'IL-1 β protège des effets délétères de la glucotoxicité (Maedler et al., 2002). Ces résultats sont cependant controversés actuellement, une étude montre par exemple que l'inactivation de l'expression du récepteur à l'IL1 n'est pas protecteur contre la glucotoxicité (McKenzie et al., 2010).

2.3) Dédifférenciation β

La différenciation des cellules souches du pancréas en cellule β a lieu sous le contrôle de processus cellulaires complexes impliquant l'activation ou les répressions très fines de différents facteurs de transcription. En outre, cette différenciation en cellules β matures n'est pas définitive, de plus en plus d'études ont noté que sous certaines conditions les cellules β pouvaient perdre leur identité, voir régresser. On appelle ce processus la dédifférenciation (Weir et al., 2013). Ce mécanisme viendrait s'ajouter à l'apoptose comme un nouveau facteur contribuant à la diminution de la masse β pancréatique au cours du diabète de type 2.

La dédifférenciation se caractérise par la diminution de l'expression de gènes spécifiques de la cellule β mature tels que [Pdx1 \(Pancreatic and duodenal homeobox-1\)](#) (Gao et al., 2014; Lemaire et al., 2017). Des études relatent la présence de marqueurs de cellules progénitrices ou de cellules α dans des îlots dédifférenciés d'animaux diabétiques (Cinti et al., 2016; Kim-Muller et al., 2014). Le rôle de la glucotoxicité dans la dédifférenciation des cellules β commence seulement à être compris (Bensellam et al., 2012). Des études anciennes relient néanmoins la glucotoxicité à la diminution de l'expression de l'ARNm de l'insuline, des résultats confirmés chez l'homme (Briaud et al., 1999; Del Guerra et al., 2005). Cette diminution s'accompagne d'une diminution de l'expression de Pdx1 et de [MAFA \(V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A\)](#) essentiels au maintien de l'identité β (Guo et al., 2013; Pino et al., 2005). Ces altérations peuvent être restaurées par l'utilisation d'antioxydants, ce qui soulève l'implication du stress oxydant dans la mise en place de la dédifférenciation (Mahadevan et al., 2013). De nombreux gènes altérés par la glucotoxicité ont été à ce jour identifiés, comme ceux des facteurs de transcriptions ([Nkx6.1](#), [Hnf4 \$\alpha\$](#)), des gènes du métabolisme ([Glut2](#), [Gck](#),...), de la potentialisation du GSIS ([Glp1r](#), [Gpr40](#),...) ou encore de l'exocytose des granules ([SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor](#)) (Bensellam et al., 2018). Beaucoup de données convergent vers cette hypothèse et suggèrent que la dédifférenciation est un mécanisme adaptatif pour échapper à la mort cellulaire induite par le stress des organites (**Figure 16**).

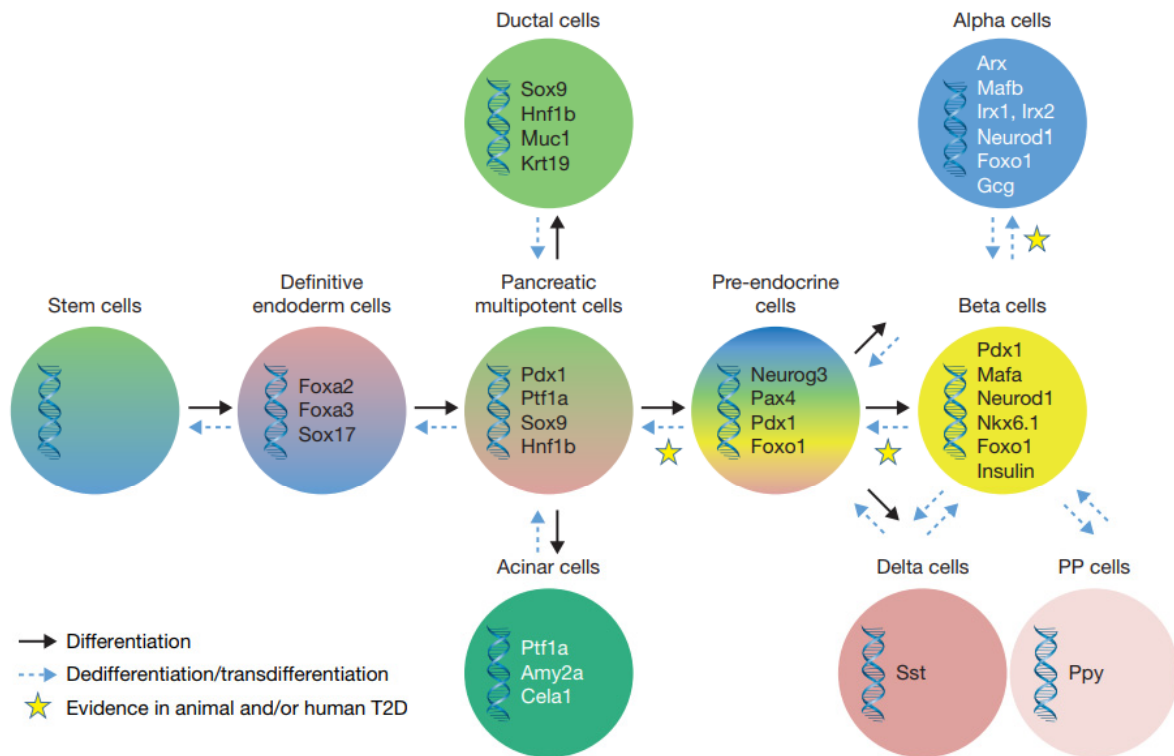


Figure 16 : Représentation schématique des processus de la différenciation des cellules β .

Ce processus implique un contrôle et une coordination très fine de l'activation ou la répression de facteurs de transcription spécifiques qui permet la transition de la cellule souche jusqu'à la cellule β mature pendant le développement de l'embryon et la période post-natale. Des études chez l'homme ou l'animal suggèrent que la cellule β mature pourrait régresser jusqu'à un stade de précurseur et/ou se transdifférencier dans d'autres types de cellules de l'îlot lors du développement du diabète de type 2 (Bensellam et al., 2018).

3) Rôle du RE et de la mitochondrie dans la dysfonction β pancréatique associée à la glucotoxicité/lipotoxicité et le diabète de type 2

3.1) Stress du RE : UPR

Le stress du réticulum endoplasmique ou réponse **UPR (Unfold Protein Response)** est un mécanisme qui se met en place lors d'une demande énergétique trop forte. L'incapacité du RE à conformer les protéines en réponse à cette surcharge va induire l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Cette réponse adaptative a pour objectif de booster la fonctionnalité du RE mais aussi le ralentissement de l'arrivée de protéines nouvellement synthétisées. Le stress du RE se caractérise par l'augmentation de la transcription de protéines chaperonnes, d'enzymes impliquées dans le repliement des protéines ainsi qu'une dilatation du RE (Cnop et al., 2017; Walter and Ron, 2011).

Le stress du RE se caractérise par l'activation de 3 voies de signalisation, la voie PERK (Protein Kinase RNA-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) ou IRE1 (Inositol-requiring protein 1). En condition d'homéostasie, PERK, IRE1 et ATF6 sont associés à la protéine chaperonne Grp78 (Glucose related protein 78) ce qui empêche leur activation. En cas d'accumulation de protéines mal conformées, Grp78 prend en charge ces protéines et va se dissocier de PERK, ATF6 et IRE1, ce qui induit leur activation.

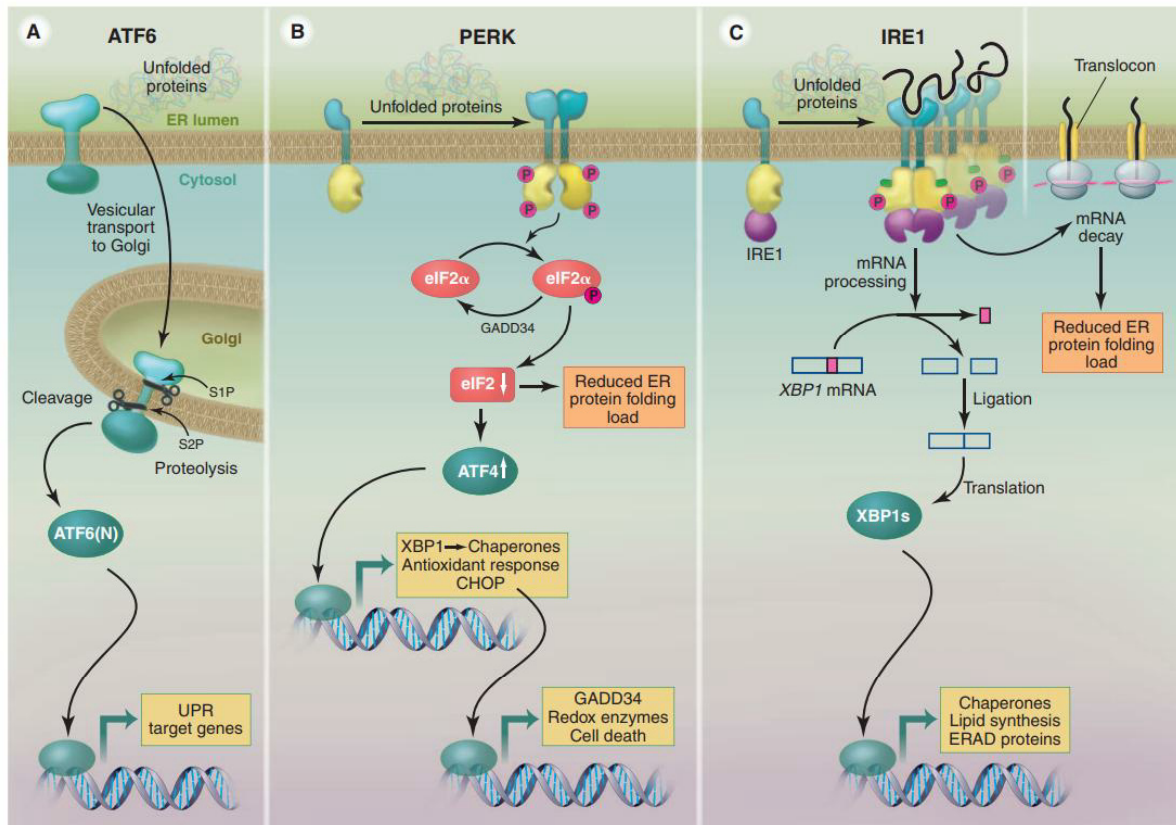


Figure 17 : Représentation des 3 branches de la voie UPR. A-C, « Les 3 familles voies dans la transduction du signal (ATF6, PERK, IRE1) via Grp78 sont sensibles à la présence de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Chaque branche de l'UPR utilise différents mécanismes de transduction du signal: ATF6 régule la protéolyse, PERK contrôle la traduction et IRE1 réduit la charge de protéines mal conformées en diminuant la traduction et en contrôlant la dégradation des ARNm liés au RE » (Walter and Ron, 2011).

3.1.1) La voie PERK-eIF2-ATF4

PERK est une kinase localisée dans la membrane du RE, sa dissociation de Grp78 permet son oligomérisation, entraînant d'une part une autophosphorylation mais également la phosphorylation d'eIF2 α (eucaryotic translation initiation factor 2), ce qui inactive indirectement eIF2 et réduit la charge de protéines mal conformées en contrôlant la

traduction et la dégradation des protéines. Ainsi P-eIF2 α augmente la traduction d'ATF4 (Activating Transcription Factor 4) qui va agir comme facteur de transcription pour favoriser la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein), d'autres chaperonnes ainsi que des composants du système ERAD. PERK permet ainsi de réduire le flux d'entrée protéique dans le RE pour compenser le stress du RE. ATF4 permet également la transcription de GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene 34), qui contre les effets de PERK en déphosphorylant eIF2 α via la formation d'un complexe GADD34-PP1 (Protéine Phosphatase 1). Il existe également d'autres inhibiteurs de la voie PERK tels que p58^{IPK} ou encore PKR (RNA-activated Protein Kinase) (Lee et al., 1994; van Huizen et al., 2003).

3.1.2) La voie IRE1-sXBP1

IRE1 est une protéine portant 2 fonctions, kinase et endoribonucléase. De la même manière que PERK, en présence de protéines mal conformées, IRE1 se dissocie de Grp78 et s'oligomérisse, ce qui mène à l'épissage de l'ARNm XBP1 (X-box Binding Protein 1), cette forme épissée (sXBP1 = spliced XBP1) va agir ensuite comme facteur de transcription et augmenter l'expression de chaperonnes et d'enzymes impliquées dans la mise en conformation des protéines. Cette voie permet aussi l'activation des voies pro-inflammatoires NF κ B (Nuclear Factor κ B). Mais l'activation de la voie IRE1 permet aussi la phosphorylation de JNK (c-Jun N-terminal Kinase) ce qui favorise la survie ou l'apoptose de la cellule (Darling and Cook, 2014; Walter and Ron, 2011).

3.1.3) La voie ATF6

ATF6 est un facteur de transcription ayant un domaine transmembranaire encastré dans la membrane du RE, il a une portion plus large au niveau de la lumière du RE. En condition de stress du RE, ATF6 se dissocie de Grp78 et passe du RE à l'appareil de Golgi où elle est clivée par des protéases S1P et S2P (Site 1/2 Protéases) qui enlèvent le domaine luminal d'ATF6. La forme clivée d'ATF6 va ensuite agir comme facteur de transcription à son tour et augmenter l'expression de chaperonnes du RE tel que Grp78 et ainsi favoriser la capacité de mise en conformation des protéines (Darling and Cook, 2014; Walter and Ron, 2011).

Ces différentes voies sont représentées sur la **figure 17**

3.1.4) Stress du RE – dysfonction cellule β -Diabète monogénique

Beaucoup de preuves relient maintenant la dysfonction de la cellule β au stress du RE. Notamment de par la présence de certaines mutations rares de gènes spécifiques de l'UPR qui sont associés au développement du diabète comme le **syndrome de Wolfram** (mutation **Wfs1**) ou encore celui de Wolcott-Rallison (Mutation **EIF2AK3 : Eukaryotic translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3 = PERK**) (Delépine et al., 2000; Inoue et al., 1998). Wfs1 est une protéine transmembranaire localisée dans le RE qui contrôle l'accumulation du calcium dans le RE, sa sous-expression diminue les quantités de calcium réticulaire, alors que sa surexpression l'augmente (Takei et al., 2006). Cette régulation se fait via une interaction SERCA-Wfs1 sous la dépendance du stress du RE. En effet Wfs1 est régulé par IRE1 et PERK, néanmoins son rôle précis sur la régulation du canal SERCA reste peu clair à ce jour (Zatyka et al., 2015). L'une des formes monogéniques de diabète les plus connues est la mutation Akita de l'insuline décrit tout d'abord chez la souris (Wang et al., 1999), puis chez l'homme (Støy et al., 2007). Lors de cette mutation, la proinsuline se retrouve mal conformée et induit un stress du RE qui altère la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Ces formes mono-géniques rares montrent le rôle prééminent de la réponse UPR dans la sensibilité de la cellule β . Beaucoup de formes de diabète monogénique existent à ce jour, ce sujet n'a pas été traité de manière exhaustive dans le cadre de cette introduction.

3.1.5) Stress du RE – dysfonction cellule β -Gluco/Lipotoxicité

La fonction première de la cellule β est la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Lors d'une stimulation au glucose, la synthèse d'insuline représente environ 50% des protéines totales synthétisées. Il est estimé que, dans un contexte d'hyperglycémie, environ 1 millions de molécules de pro-insuline par minute sont produites (Schuit et al., 1988). De plus, la proinsuline nécessite la formation de 3 ponts disulfures dans le RE. Il n'est pas surprenant qu'une telle demande bioénergétique active les voies UPR, activation qui devient délétère pour la cellule lorsque cette activation est chronique.

Il est maintenant clairement établi que la glucotoxicité et la lipotoxicité sont des facteurs inducteurs de stress du RE dans la cellule β pancréatique (Kaufman et al., 2010). Il est également admis que la glucotoxicité peut amplifier le stress du RE induit par la lipotoxicité (Bachar et al., 2009). Les oxydoréductases **PDI (Protéine Disulfide Isomerase)** et **Ero1 (ER oxidoreductin 1)**, sont abondantes dans le RE et facilitent le repliement oxydatif de la proinsuline. La surexpression d'Ero1 α dans des cellules exprimant une forme mutée de la pro-insuline entraîne dans ces cellules un stress du RE moindre (Wright et al., 2013). Le stress du RE prolongé engendré par l'exposition chronique à des fortes concentrations de glucose provoque l'apoptose des cellules β via l'activation de CHOP, **JNK** et de la caspase 12. La surexpression de CHOP stoppe la croissance cellulaire et induit l'apoptose (Matsumoto et al., 1996). CHOP, connu aussi sous le nom de **GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene 153)**, est un facteur de transcription régulant des gènes associés à la survie ou à la mort cellulaire. Il régule par exemple les gènes **Bcl2 (B-cell lymphoma 2)**, **TRB3 (tribbles-related protein3)**, **GADD34**, **DOCS (Down-stream of CHOP)** (Li et al., 2014; Liew et al., 2010). L'expression de CHOP semble également être sous la dépendance d'autres acteurs tel qu'**ERK1/2**, une protéine dont l'expression est le reflet de la demande sécrétoire dans la cellule β (Lawrence et al., 2008). On note aussi que la glucotoxicité ou la lipotoxicité altèrent également tous deux l'homéostasie calcique réticulaire. C'est par l'intermédiaire de la diminution d'expression de SERCA2b que les stocks calciques du RE sont réduits en conséquence (Hara et al., 2014), mais aussi via les fuites de calcium présentes au niveau du translocon (Cassel et al., 2016).

Les îlots de diabétiques de type 2 expriment eux aussi des marqueurs de stress du RE, avec une augmentation de l'expression de p53, CHOP, **ATF3 (Activating Transcription Factor 3)** et Grp78 (Cnop et al., 2017). D'autre part, Engin et ses collaborateurs montrent la diminution de l'expression d'ATF6, d'XBP1s et de P-eIF2 α dans des îlots de diabétiques de type 2 ce qui pourrait suggérer un défaut fonctionnel des voies UPR après un diabète avancé (Engin et al., 2014). A l'inverse, dans les îlots de souris obèse Ob/Ob ou **HFD (High Fat Diet)**, la phosphorylation d'eIF2 α est augmentée, ainsi qu'une diminution de l'expression d'ATF6 (Engin et al., 2014). La structure du RE se trouve également altérée en contexte de diabète de type 2 dans lequel une dilatation nette du réticulum endoplasmique est observée (Masini et al., 2017).

Ensemble, ces résultats démontrent l'implication primordial du RE dans les altérations fonctionnelles associées à la glucolipotoxicité et au diabète de type 2.

3.2) Stress mitochondrial

De par son rôle important dans la fonction de la cellule β , la mitochondrie est un acteur majeur de la dysfonction β pancréatique inhérente à la glucolipotoxicité. Le stress mitochondrial fait intervenir des altérations structurelles, de la dynamique et de la fonction mitochondriale aussi bien dans des modèles *in vitro*, qu'*in vivo*, chez l'homme ou l'animal. Ces différentes altérations sont décrites ci-dessous (Ma et al., 2012).

3.2.1) Structure/Dynamique mitochondriale dans la cellule β

Il existe un lien proche entre la structure et la fonction mitochondriales. Il apparaît de plus en plus que les conditions énergétiques de la cellule influencent la dynamique des organites, les **GTPases (Guanosine TriPhosphatases)** de la superfamille des dynamines régulant les mécanismes de fission/fusion. Plusieurs études (Anello et al., 2005; Masini et al., 2017), mettent en évidence une altération de la morphologie des mitochondries dans les îlots pancréatiques de patients atteints de diabète de type 2, exhibant des mitochondries dites « swollen » c'est à dire gonflées et élargies.

-Altération de la dynamique mitochondriale dans la cellule β

De manière intéressante, beaucoup d'études se sont focalisées sur le rôle de Drp1 dans le contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Drp1 ou Dynamin related protein 1 est une protéine clé entrant en jeu dans l'induction de la fission par constriction des mitochondries. Son invalidation par sh ou siRNA induit un blocage de la fission et a été incriminée comme inducteur d'altération de la fonction mitochondriale et de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Kabra et al., 2017; Reinhardt et al., 2016). A l'inverse, une exposition prolongée à de fortes quantités de glucose (24h-96h, 20-30 mM glucose), (glucotoxicité) ou au palmitate (lipotoxicité) induit une fission mitochondriale et une apoptose Drp1 dépendante, associée à une augmentation de l'expression de Drp1 (Men et al., 2009; Molina et al., 2009).

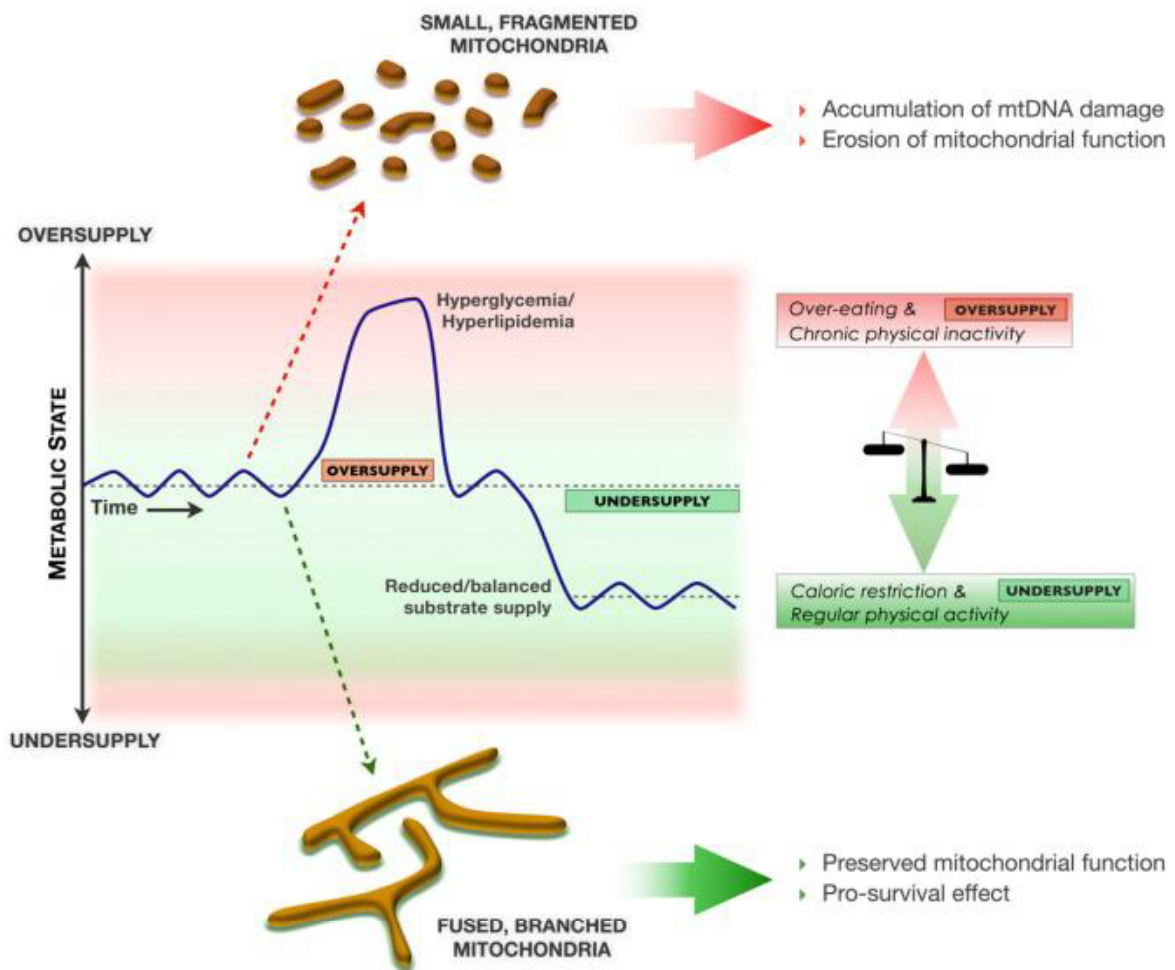


Figure 18 : Modèle reliant les fluctuations du statut métabolique, la morphologie mitochondriale et l'intégrité de l'ADN mitochondrial. « Les modulations normales du statut métabolique lors de courtes périodes de surcharge énergétique ou de carence énergétique participent à la santé mitochondriale. Des épisodes chroniques de surcharge énergétique induiraient une fragmentation du réseau mitochondrial, une dysfonction mitochondriale et l'accumulation de dommages à l'ADN. A l'opposé, des épisodes chroniques de carence énergétique favorisent la fusion mitochondriale pour tenter de préserver l'intégrité mitochondriale et optimiser sa fonction » (Picard and Turnbull, 2013).

Il existe une certaine dichotomie entre la nécessité d'une fission ponctuelle qui est bénéfique lors de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Cf partie 1) et la persistance de la fission en condition de glucotoxicité. Mon hypothèse est que la surcharge énergétique chronique de la glucotoxicité altère ces mécanismes transitoires et détourne la machinerie cellulaire pour pouvoir éliminer les mitochondries altérées par mitophagie. Le blocage de la dynamique mitochondriale de fusion/fission joue donc un rôle central dans l'altération de la fonctionnalité mitochondriale et donc dans la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique. La dynamique mitochondriale exerce ainsi un contrôle important sur la

bioénergétique cellulaire et donc influence l'activité mitochondriale ayant un rôle clé dans la sécrétion d'insuline. Les mécanismes de fissions transitoires au cours du GSIS pourraient par exemple permettre la redistribution de l'ATP en périphérie de la cellule à proximité des canaux potassiques ATP dépendants (**Figure 18**).

Les AGEs sont également capables d'induire une fission mitochondriale associée à une dysfonction des cellules β pancréatiques et une activation de l'autophagie (Lo et al., 2015). D'autre part, une étude récente implique l'augmentation des espèces réactives à l'oxygène dans l'induction de la fission mitochondriale par un mécanisme dépendant de l'augmentation du Zinc dans la mitochondrie. Celle-ci aurait lieu suite à l'activation des canaux mitochondriaux **TRPM2 (Transient Receptor Potential cation channel subfamily M, member 2)** et aurait pour conséquences un recrutement de Drp1 et à terme conduirait à l'apoptose de la cellule (F. Li et al., 2017). D'autres acteurs originaux tels que la chromogranine A ou la kératine semblent réguler aussi la dynamique mitochondriale (Silvander et al., 2017; Wollam et al., 2017) mais restent peu étudiés.

3.2.2) Dysfonction mitochondriale-Glucotoxicité/Lipotoxicité-Diabète de type 2

La dysfonction mitochondriale est elle aussi une des caractéristiques du diabète de type 2 dans les îlots. En effet, les îlots de patients diabétiques de type 2 présentent en plus d'une altération de la sécrétion d'insuline, une réduction du ratio ATP/ADP et une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale. Ces modifications s'accompagnent aussi d'une augmentation d'expression d'UCP2 et du complexe I et V de la chaîne respiratoire. Ces données suggèrent la présence d'une altération fonctionnelle de la chaîne respiratoire mitochondriale. De la même manière la glucotoxicité et la lipotoxicité ont toutes deux été associées à l'altération de la respiration mitochondriale (Cassel et al., 2016; Madec et al., 2013). Celle-ci pourrait s'accompagner d'un découplage de la chaîne respiratoire comme le suggère l'augmentation de l'expression d'UCP2, bien que le rôle découplant d'UCP2 soit à ce jour débattu et ses propriétés anti-oxydantes sont de plus en plus décrites (N. Li et al., 2017). De plus des études rapportent une augmentation de l'expression d'UCP2 dans les modèles **HFD (High Fat Diet)** ou dans les îlots traités aux AG libres (Barlow et al., 2014; Chan et al., 2001). Cependant l'implication d'UCP2 dans l'effet du palmitate reste encore lui aussi controversé... (Hirschberg Jensen and Affourtit, 2015; Pi et al., 2009). Récemment une

nouvelle propriété d'UCP2 a été découverte, sa capacité à transporter des métabolites (Voza et al., 2014). Ainsi l'export de métabolites du cycle de Krebs pourrait contribuer à la dysfonction mitochondriale et confirmer les effets délétères d'UCP2. Dans ce même ordre d'idée, la glucotoxicité est associée à l'augmentation de l'expression de différents transporteurs de métabolites à la mitochondrie, ce qui pourrait perturber le cycle TCA (Tricarboxylic Acid) et justifier la dysfonction mitochondriale (Brun and Maechler, 2016). Le palmitate a aussi la capacité de réduire l'expression de gènes impliqués dans la production d'ATP, comme la citrate synthase ou l'ATP synthase (Brun and Maechler, 2016).

Ces effets délétères peuvent se justifier aussi par la capacité des îlots à accumuler des quantités excessives de glycogène lors d'hyperglycémie, un facteur qui favorise l'apoptose des cellules β (Brereton et al., 2016). L'acétylation apparait comme un régulateur de la fonction mitochondriale. La surcharge nutritionnelle a récemment été associée à l'accumulation d'intermédiaires mitochondriaux tels que l'acetyl-CoA, à l'origine de l'acétylation des protéines (Pougovkina et al., 2014). Dernièrement une étude a montré que la lipotoxicité augmente l'acétylation de différentes protéines dans la cellule β , celles-ci pourraient ainsi participer à l'apoptose induite par le palmitate (Ciregia et al., 2017). Adam et ses collaborateurs rapportent aussi que les îlots de diabétiques de type 2 accumulent du fumarate. Cet intermédiaire du cycle TCA permet la succination des protéines, cette modification post-traductionnelle est associée à une perte de la fonction protéique qui pourrait expliquer la dysfonction mitochondriale (Adam et al., 2017).

3.2.3) Stress Oxydant : ROS

-Origine/devenir des ROS

Les ROS ou espèces réactives à l'oxygène sont des espèces intermédiaires produites lorsque la réduction de l'oxygène est incomplète. Elles sont générées au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, du RE, du péroxisome ou encore à partir de certaines voies métaboliques (**Figure 19**) (Lenzen, 2017). Il existe plusieurs types de ROS, Elles sont présentes sous forme de radicaux libres comme $O_2^{\cdot -}$ (Anions Superoxide), HO^{\cdot} (Radicaux hydroxyl) ou non radicalaire comme H_2O_2 (Peroxide d'hydrogène) (Circu and Aw, 2010). Lors de la respiration mitochondriale, 1-2% de l' O_2 finit converti en $O_2^{\cdot -}$, majoritairement au sein du complexe I et III de la chaîne respiratoire (Turrens, 2003), mais il existe de multiples

sources de ROS dans la mitochondrie autres que la chaîne respiratoire comme le cycle de Krebs par exemple (Andreyev et al., 2015). Le statut rédox de la cellule est défini par l'équilibre entre la quantité de ROS et la quantité/activité des enzymes antioxydantes cellulaires. Par exemple, une production excessive chronique de ROS par la cellule va entraîner un stress oxydatif si les enzymes antioxydantes n'arrivent pas à réduire leurs quantités. Les conséquences d'un tel stress peuvent être multiples, comme la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines ou encore les dommages oxydants à l'ADN (Lenzen, 2017). La propagation des ROS dans les différents compartiments cellulaires est facilitée par la capacité de certaines ROS, comme l' H_2O_2 à diffuser à travers les membranes. L' H_2O_2 passe ainsi les membranes par diffusion facilitée via les aquaporines présentes sur la membrane plasmique ou celles des organites, comme le RE ou la mitochondrie. D'autres ROS sont restreintes au compartiment d'origine, comme $\text{O}_2^{\cdot-}$ et $\text{OH}\cdot$. Les ROS n'agissent cependant pas toujours comme des « toxines », elles peuvent agir comme des molécules de signalisation selon leurs concentrations, comme H_2O_2 (Pi et al., 2007).

La source majeure d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et par conséquent indirectement de l' H_2O_2 dans le cytosol est la **NOX (NADPH oxidase)**. La NOX catalyse l'oxydation de NADPH en présence d' O_2 , celle-ci génère la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$, qui va ensuite être réduit en H_2O_2 . Les cellules β pancréatiques expriment les isoformes NOX1/4 et NOX2. Il n'est pas à exclure que chaque isoforme génère des sortes différentes de ROS. Les NOX sont attachées à la membrane plasmique ou à des membranes d'organites (Newsholme et al., 2009).

Le réticulum endoplasmique est également le siège de la production de ROS. Le repliement oxydatif des protéines dans le RE, permet la formation des **ponts disulfures (S-S)** sur les cystéines de certaines protéines, comme par exemple la pro-insuline dans la cellule β (nécessite 3 ponts S-S). Au sein du RE, l' O_2 est utilisé par l'enzyme **ERo1 α (ER oxydoreductase 1 α)**, elle catalyse l'oxydation de **PDI (Protein Disulfide Isomerase)** qui va permettre l'isomérisation des ponts S-S et conformer ainsi correctement les protéines (Benham et al., 2013). L' O_2 utilisé par ERo1 α forme néanmoins de l' H_2O_2 , qui est la source principale de ROS dans le RE.

La **superoxide dismutase (SOD)** peut également intervenir dans la formation de l' H_2O_2 . La famille de la SOD comprend la MnSOD localisée dans la matrice mitochondriale et

la Cu/ZnSOD localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, le cytosol et l'espace extracellulaire (Miriyala et al., 2012). La SOD est retrouvée dans le cytosol et dans la mitochondrie où elle réduit l' O_2^- en H_2O_2 . Même si la forme H_2O_2 est moins réactive que l' O_2^- , l' H_2O_2 reste néanmoins toxique pour les cellules qui n'ont pas les défenses anti-oxydantes nécessaires pour s'en débarrasser. On pourrait donc considérer la SOD comme une enzyme pro-oxydante (Lenzen, 2017).

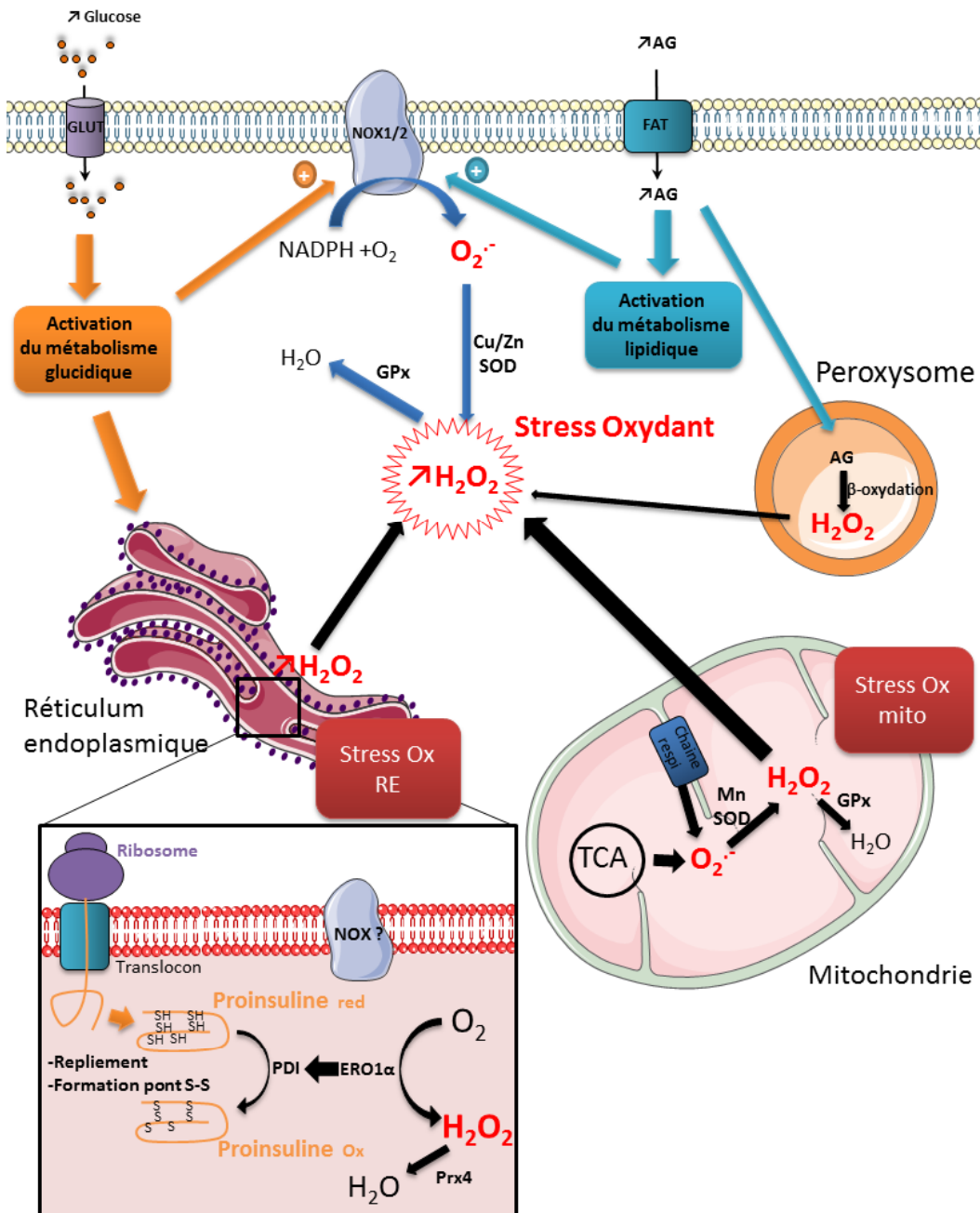


Figure 19 : Génération de ROS par les différents compartiments subcellulaires de la cellule β pancréatique.

La cellule est équipée de défenses anti-oxydantes, comprenant différentes enzymes anti-oxydantes, des tampons redox ou encore des chélateurs de ROS. La **glutathione (GSH)** et la **thioredoxine (Trx)** sont les principales protéines impliquées dans le statut redox de la cellule. La **glutathione peroxidase (GPx)** permet la réduction notamment de l' H_2O_2 en H_2O aux dépens de la GSH qui est oxydée en **GSSG (Glutathione Disulfide)**, le rapport GSH/GSSG est ainsi un bon indicateur du statut redox de la cellule. Il existe des pools redox de GSH/GSSG et de GPx dans différents compartiments cellulaires comme la mitochondrie, le RE et le cytosol. La glutathione réductase permet le retour de la GSSG en GSH. La Trx est un partenaire clé de GSH/GSSG, dans ce cadre elle prend part à la régulation du statut redox de la cellule (Foyer, 2018; Santos et al., 2009). La Trx est cytosolique, mais en réponse à une stimulation, elle peut aussi être transloquée au noyau pour réguler des gènes du statut redox (Hirota et al., 1997). La **peroxiredoxine 4 (Prx 4)** est une enzyme antioxydante présente au sein du RE qui, comme la GPx, assure la réduction de l' H_2O_2 en H_2O . Cette enzyme antioxydante est la seule exprimée dans le RE des cellules β pancréatiques. Sa surexpression permet une plus grande métabolisation de l' H_2O_2 présent et ainsi d'améliorer la sécrétion d'insuline (Mehmeti et al., 2014).

-Glucotoxicité/Lipotoxocité et ROS dans la cellule β

La cellule β possède une faible quantité de défenses antioxydantes, de ce fait elle est très sensible au stress oxydatif (Lenzen, 2008). De plus, l'insuline est constituée de 3 ponts disulfures et demande une capacité de repliement plus grande que d'autres protéines comme le glucagon et la somatostatine qui n'ont pas de ponts S-S. A l'inverse, les cellules non- β constituant l'îlot pancréatique, sont munies d'un équipement enzymatique plus important que la cellule β (Lenzen, 2017). Ces données laissent donc à penser que la cellule β est plus sensible au stress oxydant associé à la glucotoxicité que les autres cellules constituant l'îlot.

La production de ROS est augmentée en condition de glucotoxicité. Par ailleurs, la production de ROS est aussi induite par une exposition prolongée au palmitate, où elle est associée à un découplage partiel de la chaîne respiratoire (Carlsson et al., 1999). Elle peut être déclenchée par un stress aigu, par des voies de signalisation de stress spécifiques telles

que l'UPR ou l'hypoxie. Mais aussi par des voies de signalisation de stress non spécifiques comme l'arrêt de la synthèse protéique, les changements métaboliques et la dégradation protéique. En outre, l'ensemble de ces mécanismes peut être influencé par les ROS elles-mêmes (Lenzen, 2017; Santos et al., 2009). D'autre part, l'induction d'un stress oxydatif par la glucotoxicité dans la cellule β n'induit pas une augmentation d'expression des différentes enzymes anti-oxydantes (Tiedge et al., 1997). Plusieurs voies sont modulées par les ROS et conduisent à l'altération de la fonction β pancréatique comme par exemple l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale (Li et al., 2009), l'altération du potentiel membranaire mitochondrial et l'apoptose en réponse à la glucotoxicité ou la lipotoxicité. A l'inverse, il a été montré que l' H_2O_2 peut agir à faible concentration comme une molécule de signalisation. L' H_2O_2 dérivant du métabolisme glucidique pourrait ainsi agir comme l'un des signaux métaboliques nécessaires à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007).

3.2.4) UPR mitochondrial

Un récent concept a émergé, celui de l'existence d'une réponse **UPR mitochondriale (UPR^{mt})**. 99% des protéines mitochondriales sont codées par le noyau et sont ensuite transportées vers la mitochondrie. Une machinerie complexe permet l'influx des précurseurs protéiques au sein de la mitochondrie où ils mûrissent (Wasilewski et al., 2017). Le mauvais transport ou l'accumulation de ces précurseurs peut générer un stress protéique qui pourrait être délétère pour la cellule (Topf et al., 2016). Deux voies régulent ces transports, la voie UPR^{mt} et la voie **UPR^{am} (Unfold Protein response activated by mistargeting of proteins)**. Brièvement, les protéines mal conformées au sein de la mitochondrie sont clivées par la protéase **CLPP (ATP dependent CLP protease proteolytic subunit)**, ce clivage initie l'activation de l'UPR^{mt} qui par des mécanismes encore inconnus à ce jour active la phosphorylation de JNK par l'intermédiaire de **MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling protein)** (Callegari and Dennerlein, 2018). Par exemple, des défauts d'assemblage d'**OXPHOS (Oxydative Phosphorylation complexe)** provoquent la formation de ROS et la perte du potentiel de membrane mitochondrial (Benard et al., 2007).

3.3) Perturbation de l'homéostasie calcique

Le calcium est un messager secondaire universel qui joue un rôle dans de multiples fonctions comprenant la sécrétion, la différenciation, la croissance, l'apoptose etc... Les signaux calciques découlant d'un stimulus peuvent varier en localisation, fréquence, amplitude ou durée. Il existe dans la cellule différentes sources de calcium, la plus grande étant le RE ($0.5-1\text{mM Ca}^{2+}$), par comparaison au calcium cytosolique (100 nM Ca^{2+}), mais on peut également en trouver dans la mitochondrie (100 nM Ca^{2+}), l'appareil de golgi ($100-300\text{ }\mu\text{M Ca}^{2+}$), les endosomes ($2\text{ }\mu\text{M Ca}^{2+}$), le noyau (100 nM) ou encore dans les vésicules de sécrétion ($100\text{ }\mu\text{M}$). En outre ces concentrations peuvent radicalement changer en réponse à différents stimuli (**Figure 20**) (Suzuki et al., 2016). Ces flux calciques sont régulés par la présence de différents canaux calciques. Le calcium issu des stocks intracellulaires est mobilisé par l'intermédiaire des canaux IP3R, RyR dans le RE et sont recaptés à l'aide de la pompe **SERCA (Sarcoplasmic reticulum ATPase)** dans le réticulum, **VDAC** dans la mitochondrie ou encore **hsPCA1 (human secretory Pathway Ca^{2+} ATPase 1)** dans l'appareil de golgi. La cellule est aussi capable de faire entrer du calcium depuis l'extérieur via des canaux calciques voltage dépendants ou indépendants. La mobilisation des pools calciques intracellulaires peut se faire soit par l'intermédiaire de l'IP3 comme par exemple lors de l'activation de GPCR, ce qui va activer l'ouverture des canaux IP3R, soit par la réaction **CiCR (Calcium Induce Calcium Release)**. Le CiCR est un signal d'amplification de la charge calcique intracellulaire. Il est initié par une entrée massive de calcium dans la cellule (via les canaux calciques voltages dépendants de type L par exemple). Cette entrée massive de calcium active les canaux RyR ou IP3R et induisent une cascade en chaine d'activations des canaux calciques à proximité (Berridge et al., 2000).

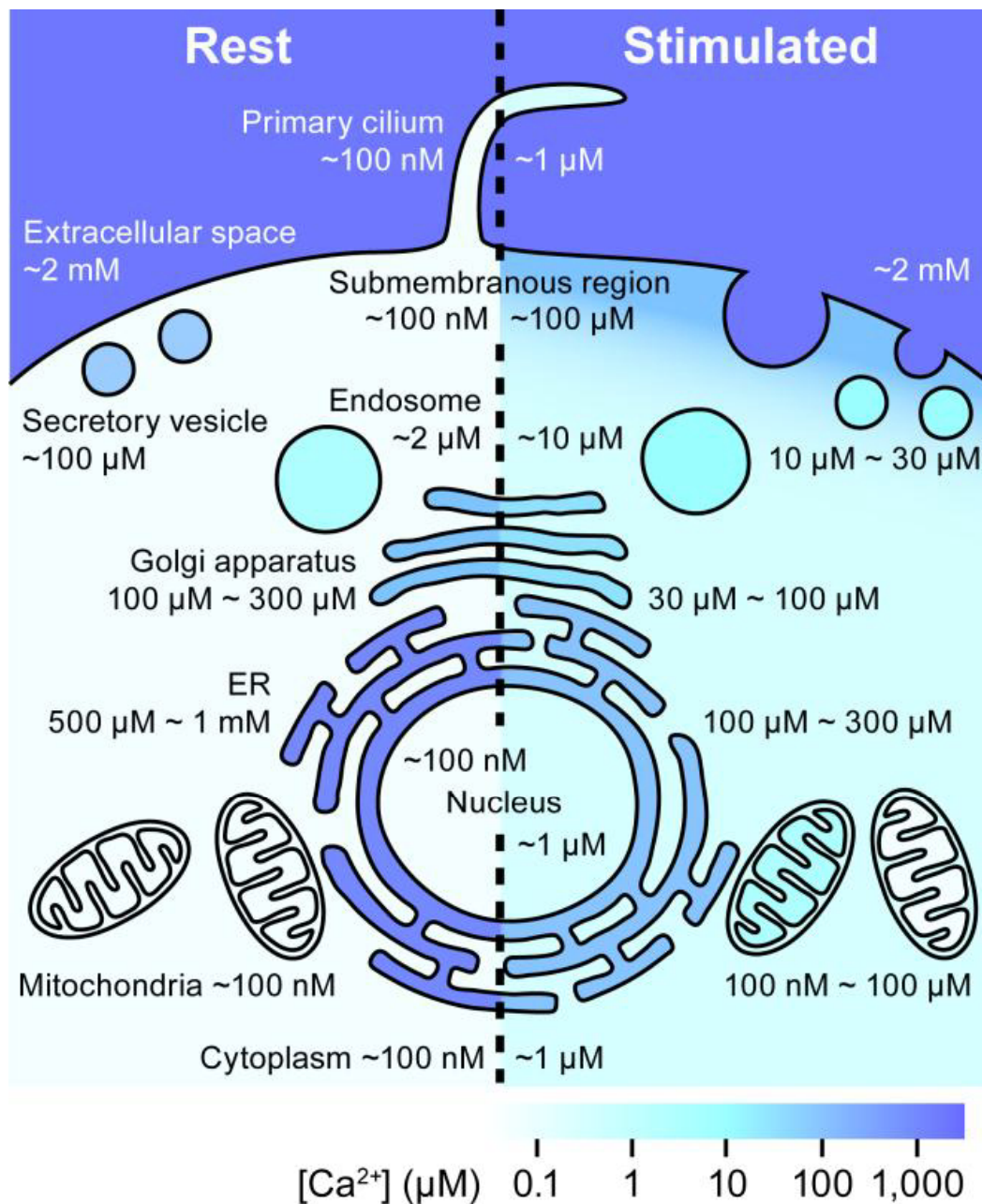


Figure 20 : Concentrations calciques des compartiments subcellulaires. En condition basale (Rest, à gauche) et stimulée (Stimulated, à droite) (Suzuki et al., 2016).

Les signaux calciques sont importants dans l'activation de différentes voies de signalisation mais aussi dans l'induction de l'apoptose, comme décrit précédemment une surcharge calcique mitochondriale provoque la formation du PTP, qui favorise la sortie du cytochrome C, qui à son tour active les caspases et provoque l'apoptose.

3.3.1) IP3R

L'IP3R (Inositol 4,4,5-triphosphate receptor) est un canal calcique qui contrôle beaucoup de processus cellulaires, de par son rôle dans le contrôle des stocks calciques réticulaires. L'IP3R est un canal tétramérique formé de 4 sous-unités encastrées dans la membrane du RE et dans l'enveloppe nucléaire. Il existe 3 isoformes : IP3R1, IP3R2, IP3R3, qui partagent une forte homologie structurale mais ont différentes fonctions et expressions selon les tissus (Berridge, 2016). Il existe un très grand nombre de modulateurs de l'activité du récepteur à l'IP3, les 2 principaux activateurs/modulateurs sont l'IP3 et le calcium. La fixation de l'IP3 sur son récepteur induit un changement de conformation qui permet l'ouverture du canal. L'effet du calcium peut être double, à faible quantité il permet son ouverture, à trop forte quantité par contre il a un rôle inhibiteur (Foskett et al., 2007). Le statut redox de la cellule joue aussi un rôle dans la sensibilité de l'IP3R, les ROS produites par les enzymes du RE ou de la mitochondrie favorisent le relargage du calcium en réponse à la production d'IP3 (Bánsághi et al., 2014).

Très peu d'études se sont intéressées à l'expression et au rôle des différents isoformes dans la cellule β pancréatique. Leur expression semble différente selon l'espèce pour un même tissu. Par exemple dans des îlots de rat, l'isoforme IP3R3 semble la plus exprimée en comparaison aux isoformes IP3R1/2. Alors que dans les îlots de souris c'est l'isoforme IP3R1 qui semble la plus exprimée (Lee et al., 1999; Lee and Laychock, 2001). Leur expression chez l'homme n'a cependant pas été vérifiée. Il est à noter que la culture d'îlots de rat pendant 4 jours avec 11mM (2g/L) de glucose augmente l'expression d'IP3R2, diminue l'expression d'IP3R3 sans moduler l'expression d'IP3R1 (Lee and Laychock, 2000). Certaines études supposent la présence d'IP3R à la surface des vésicules de sécrétion, mais ces résultats sont très controversés et pourraient n'être que des artéfacts liés à une aspécificité des anticorps (Vermassen et al., 2004).

L'IP3R est capable également de relarguer de manière transitoire du calcium, il génère ainsi des oscillations calciques (Berridge, 2007). Il semblerait que les oscillations calciques soient concomitantes avec des oscillations des niveaux d'IP3 (Politi et al., 2006).

3.3.2) Oscillations calciques dans l'îlot de Langerhans

Dans le cytosol, le RE et la mitochondrie de la cellule β , il existe en permanence des oscillations calciques (Voir partie 1) (Hraha et al., 2014; Rutter et al., 2006). Ces oscillations peuvent être de l'ordre de la seconde ou de la minute (Henquin, 2009). La structure en îlots joue un rôle important dans la régulation du calcium cytosolique. En effet, les cellules dispersées présentent plus d'augmentation spontanée du calcium cytosolique que les cellules en îlots et une sécrétion d'insuline en réponse au glucose moindre (Jaques et al., 2008).

L'étude de l'organisation tridimensionnelle de l'îlot de Langerhans, a fait émerger la présence de sous-catégories de cellules β pancréatiques. Des cellules β spécialisées existeraient en tant que cellules « **pacemakers** » qui correspondraient à 1-10% des cellules β au sein de l'îlot (Benninger et al., 2014). Ces cellules sont transcriptionnellement « immatures » mais métaboliquement très actives. Ces cellules « pacemakers » sont requises pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et elles coordonnent la sécrétion d'insuline dans les cellules dites « **followers** » par l'intermédiaire d'oscillations calciques cytosoliques. La glucotoxicité altère le nombre de ces cellules pacemakers ou « hubs » et ainsi le réseau oscillatoire (Johnston et al., 2016) (**Figure 21**). La lipotoxicité a aussi la faculté de réduire la connectivité entre les cellules β (Hodson et al., 2013). Il reste néanmoins difficile de déterminer les mécanismes précis impliqués dans les échanges entre les cellules pacemakers et followers. Les jonctions gap entre les cellules sont pour l'instant les candidats de choix pouvant expliquer la formation de ce réseau (Benninger et al., 2014, 2008; Hraha et al., 2014).

Dans l'ensemble, ces données démontrent le rôle important du RE et de la mitochondrie dans la dysfonction β pancréatique lors du développement du diabète de type 2. De plus ces organites ne sont pas indépendants dans la cellule et forment des contacts structurels et fonctionnels.

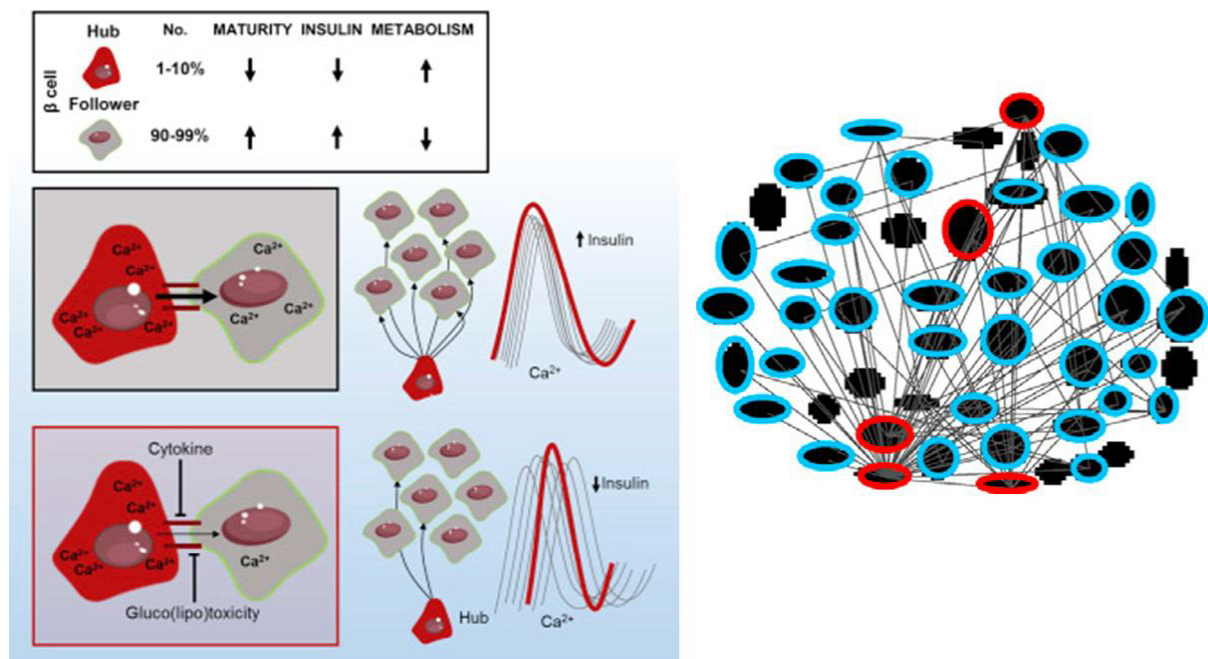


Figure 21 : Représentation schématique de l'arrangement des cellules β au sein de l'îlot de Langerhans. Cette représentation montre en rouge les cellules dites « pacemakers » (1-10% des cellules β) présentant un fort métabolisme, mais une faible capacité sécrétoire et en bleu ou gris les cellules β dites « followers » à forte capacités sécrétoires. Les cellules « pacemakers » par le biais de leurs oscillations calciques cytosoliques communiquent avec les cellules « followers » et synchronisent la sécrétion d'insuline. Cette synchronisation est perturbée en réponse à des signaux pro-inflammatoire ou de glucolipotoxicité (Johnston et al., 2016).

Partie 3 : MAMs : Mitochondria-Associated ER Membranes

La notion de contacts inter-organites est apparue dans les années 1970 et ils sont maintenant nommés **MCS (Membrane Contact Sites)**. A ce jour, de nombreux MCS ont été découverts, le réticulum endoplasmique est l'un des acteurs majeurs au centre de ces contacts de par son occupation de plus de 50% du cytoplasme. Les MCS majeurs sont les contacts RE-mitochondrie, RE-membrane plasmique, RE-Appareil de golgi, RE-Lysosome, RE-Gouttelette lipidique, RE-Endosome, Mitochondrie-Peroxisome, Lysosome-Gouttelette lipidique, Peroxisome-Gouttelette lipidique et Lysosome-Endosome. Ces zones de contacts sont le siège d'échanges ioniques et lipidiques entre les organites (Tagaya, 2017).

1) Découverte des MAMs

La première étude prouvant l'existence des contacts entre le RE et la mitochondrie est celle de Bernhard en 1952 dans le foie (Bernhard et al., 1952). Liée à l'évolution des outils d'imagerie, cette observation a été confirmée par d'autres (Mannella et al., 1998; Meier et al., 1981; Perkins et al., 1997), jusqu'au développement de protocole d'isolation de ces contacts RE-mitochondrie (Vance, 1990), qui sont classiquement appelés maintenant « Mitochondria-Associated ER Membranes » ou MAMs.

2) Ultrastructure des MAMs

Les contacts entre le RE et la mitochondrie se définissent comme la proximité entre ces deux organites comprise entre 0-50 nm (**Figure 22A-B**). Ils résultent d'une apposition membranaire entre ces 2 organites, mais ne sont en aucun cas une fusion (Csordás et al., 2006). Ces contacts se font sur environ 20% de la surface mitochondriale, néanmoins la fréquence et la proximité de ces contacts dépendent des conditions cellulaires et du type cellulaire (Bravo et al., 2011). Dans la levure, on comptabilise environ 100 points de contacts (<30 nm)/cellule (Achleitner et al., 1999). Ces points de contact peuvent se former aussi bien avec le RER que le SER (Giacomello and Pellegrini, 2016). Les distances les plus fréquemment retrouvées sont celles comprises entre 10-15 nm et 25-30 nm. On peut quantifier les MAMs de différentes manières, selon la surface de la mitochondrie, selon le nombre de mitochondries ayant des points de contact, ou la distance et la longueur de ces contacts, ce qui complexifie l'analyse de ces points de contact. L'unité de base généralement choisie est

la mitochondrie, on exprime donc généralement les points de contact en pourcentage de surface des mitochondries du fait de la facilité à délimiter les mitochondries en comparaison au RE dont le réseau en **microscopie électronique (ME)** est plus difficile à appréhender. De plus, une mitochondrie peut avoir plusieurs points de contact et un même tubule du RE peut être associé à plusieurs mitochondries, ce qui rend l'analyse encore plus complexe. D'autres techniques existent néanmoins pour appréhender ces points de contact (ci-dessous). Ces interactions RE-mitochondrie sont des interactions dynamiques qui évoluent par exemple selon le statut métabolique ou encore l'état de stress de la cellule. Mais également ce sont des interactions fonctionnelles qui permettent à la fois des échanges calciques et lipidiques.

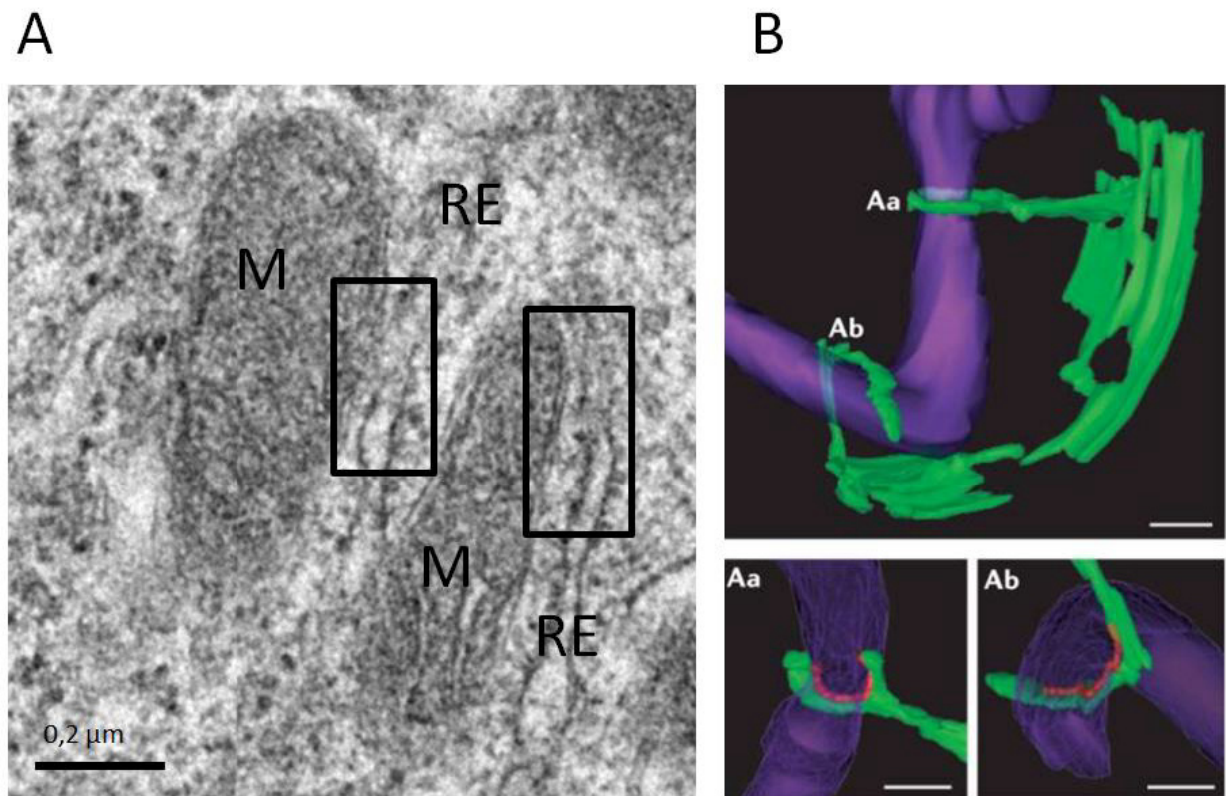


Figure 22 : Ultrastructure des MAMs. « A, Image de microscopie électronique montrant les contacts entre le RE (Réticulum Endoplasmique) et la mitochondrie (M) (U1060, CarMeN). B, Reconstruction tridimensionnelle à partir de tomographie par microscopie électronique révélant les contacts entre le RE et la mitochondrie (Aa et Ab), la mitochondrie apparaît en violet et le RE en vert dans une cellule de Levure. En Aa et Ab on peut voir la constriction de la mitochondrie par le RE. Cette zone de contact, signalée en rouge, représente la zone où les membranes sont apposées dans une gamme de distance de 30 nm. » (Rowland and Voeltz, 2012).

3) Structure/Fonctions des MAMs

Le maintien des contacts entre le RE et la mitochondrie est assuré par la présence de nombreuses protéines présentes à la surface du RE ou de la membrane externe des mitochondries (**Figure 23**). Certaines de ces protéines permettent la stabilisation des contacts entre les 2 organites (tethers), mais beaucoup ont des fonctions multiples. Ainsi les MAMs sont le siège d'échanges calciques, de biosynthèse lipidique, d'une plateforme de signalisation métabolique, d'autophagie mais permettent également la régulation de la dynamique mitochondriale et du stress des organites.

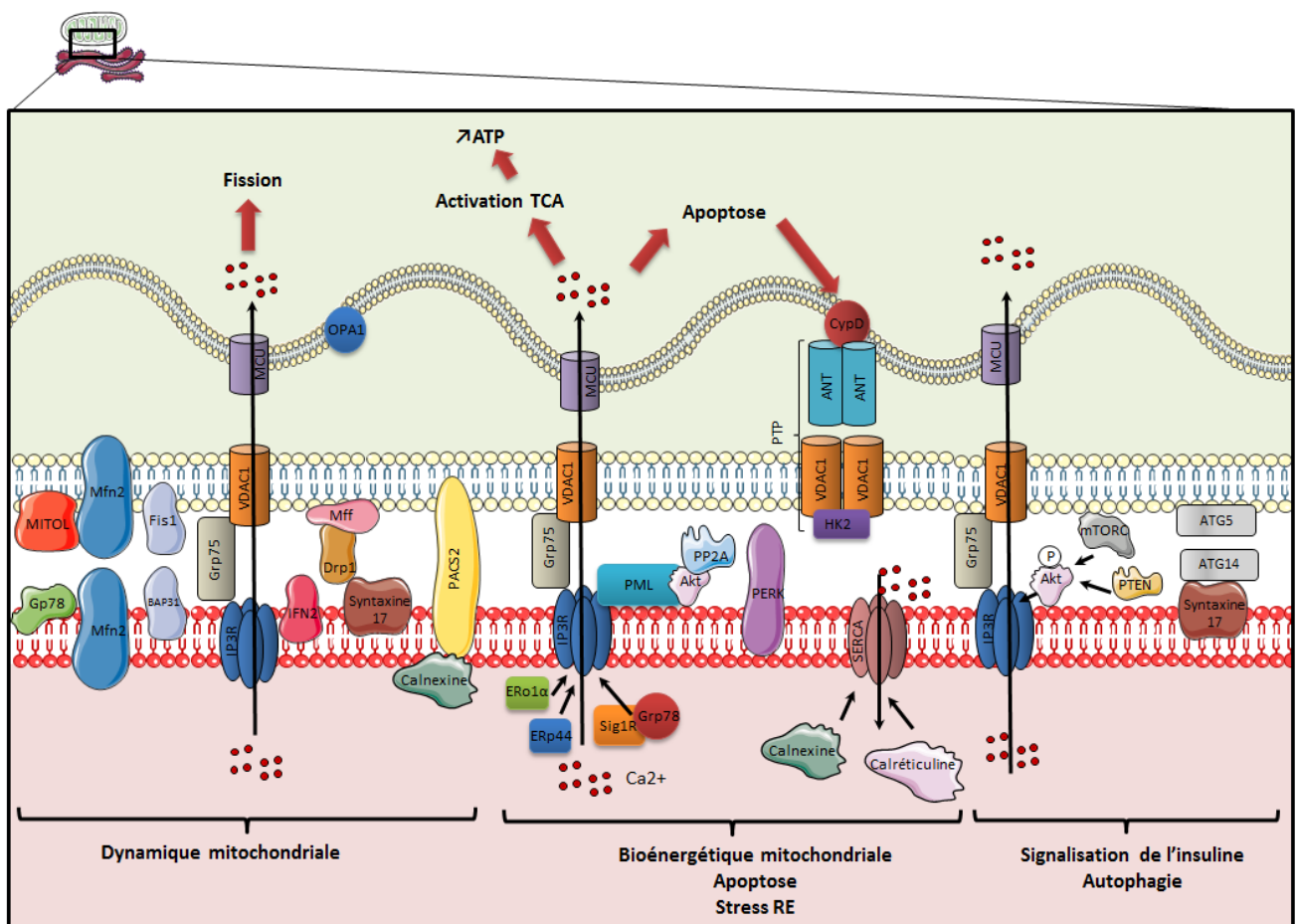


Figure 23 : Représentation schématique des complexes protéiques aux MAMs, ainsi que les principales fonctions régulées par les MAMs.

3.1) Biosynthèse lipidique

3.1.1) Les MAMs, une zone d'échange et de biosynthèse des lipides

Les MAMs ont une structure proche de celle des radeaux lipidiques (Annunziata et al., 2018) et l'une de leurs caractéristiques est leur enrichissement en enzymes associées à la biosynthèse lipidique. Ces enzymes sont similaires à celles trouvées dans le réticulum endoplasmique, elles sont liées à la synthèse de phospholipides, de triacylglycérol, de cholestéryl-esters et du cholestérol (Rusiñol et al., 1994). En effet, l'activité des enzymes de la biosynthèse lipidique est dépendante de la proximité entre le RE et la mitochondrie. Ces enzymes se retrouvent à la fois dans la membrane du RE mais aussi dans l'OMM mitochondriale (Voelker, 1989). Ainsi, la formation de la [phosphatidylcholine \(PC\)](#) à partir de l'acide phosphatidique nécessite une cascade de réactions ayant lieu aussi bien dans le RE que dans la mitochondrie. Tout d'abord, le [PA \(Phosphatidic acid\)](#) est converti en [phosphatidylsérine \(PS\)](#) par la [PS synthase \(PSS\)](#) au sein du RE, sa conversion en [phosphatidylethanolamine \(PE\)](#) est dépendante d'enzymes mitochondriales ([PS Decarboxylase, PSD](#)), la PS doit passer dans l'OMM puis dans l'IMM pour qu'elle soit convertie en PE (Ardail et al., 1991), la PE retourne enfin au RE pour sa conversion en PC (**Figure 24**). De par la présence de la PC dans l'OMM, on peut suspecter des mécanismes impliqués dans le transport de celle-ci du RE jusqu'à la mitochondrie après sa biosynthèse (Stone and Vance, 2000; van Meer et al., 2008; Voelker, 2000). La synthèse mitochondriale de PE est indispensable à la fonction mitochondriale et à plus large échelle à la survie cellulaire (Tasseva et al., 2013). En outre, les PE et PC ainsi produites sont exportées ensuite aux autres organites (Membrane plasmique, RE, ...). L'invalidation de la PSD est à l'origine de dysfonction mitochondriale et de mortalité de l'embryon chez la souris (Steenbergen et al., 2005; Tasseva et al., 2013). Il est intéressant de noter que cette dysfonction mitochondriale est associée à une fission des mitochondries. Enfin, le transport lipidique entre l'OMM et l'IMM est permis par la présence du complexe [MICOS \(Mitochondrial Contact sites and cristae Organizing System\)](#) et le complexe [Ups2-mdm35 \(Mitochondrial distribution and morphology protein 5 ; Ups2 : Universal proteomics standard-2\)](#) (Aaltonen et al., 2016).

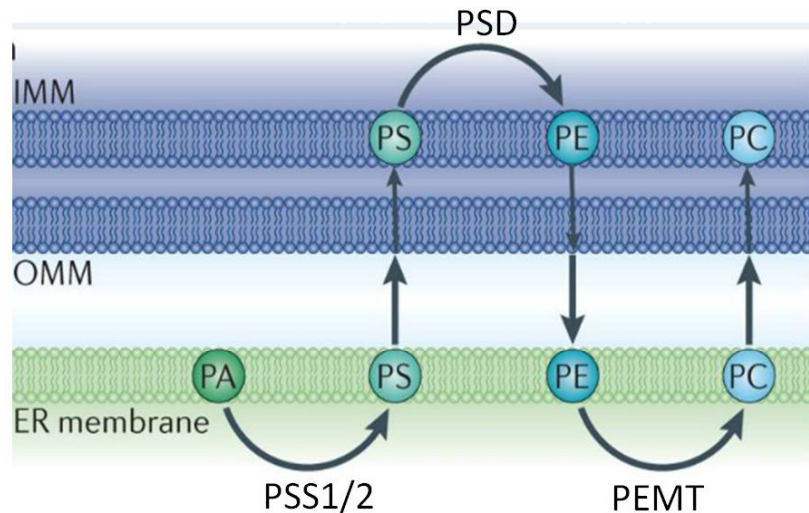


Figure 24 : Biosynthèse lipidique aux MAMs. La biosynthèse lipidique dans les MAMs génère la phosphatidylcholine (PC) à partir de l'acide phosphatidique (PA), elle requiert une série d'étapes entre le RE et la mitochondrie. Les enzymes qui convertissent le PA en phosphatidylsérine (PS) sont les enzymes PSS1/2 (PS Synthase 1/2) présentes dans le réticulum, alors que la PSD (PS Décarboxylase) essentielle à la conversion du PS en phosphatidylethanolamine (PE) est située dans la mitochondrie (Rowland and Voeltz, 2012).

3.1.2) Les complexes impliqués dans les échanges lipidiques RE-mitochondries

-Le complexe ERMES (Levure)

Les mécanismes exacts et les acteurs impliqués dans le transport des lipides entre les 2 organites restent encore peu clairs à ce jour. Néanmoins, la découverte du complexe **ERMES (ER-Mitochondria Encounter Structure)** a permis de comprendre un peu mieux les mécanismes sous-jacents des échanges lipidiques aux MAMs chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kornmann and Walter, 2010). ERMES a été découvert via le screening de différents mutants protéiques. C'est un complexe multiprotéique composé de **Mdm34 (Mitochondrial distribution and morphology protein 34)** et de **Mdm10 (Mitochondrial distribution and morphology protein 10)** encastrés dans l'OMM qui font face aux protéines **Mmm12 (Maintenance of mitochondrial morphology protein 12)** cytosolique et **Mmm1 (Maintenance of mitochondrial morphology protein 1)** réticulaire. Ce complexe forme un pont entre le RE et la mitochondrie et stabilise leur interaction (**Figure 25**). ERMES est impliqué à la fois dans les échanges lipidiques, la dynamique mitochondriale et la mitophagie (Lang et al., 2015). Les protéines formant le complexe ERMES portent des domaines **SMP (Synaptotagmin-like mitochondrial-lipid binding protein)** qui leur confèrent une forte affinité pour les lipides et

pourrait entrer en jeu dans les échanges lipidiques inter-organites (Lang et al., 2015) ; de plus les protéines contenant des domaines SMP sont enrichies dans les MAMs (Kopeck et al., 2010; Toulmay and Prinz, 2012). La génération de mutants au sein des membres du complexe ERMES induit des défauts dans la biosynthèse lipidique (diminution du ratio PS/PC) (Kornmann et al., 2009), ce qui confirme l'implication d'ERMES, bien que ces résultats soient controversés depuis (Nguyen et al., 2012). Une étude intéressante montre également que la surexpression de *Mcp1/2* (*Mdm10 Complementing Protein 1/2*) dans des cellules déficientes en *mdm10* restaure les niveaux mitochondriaux de phospholipides (Tan et al., 2013). Les mécanismes qui régulent la formation d'ERMES restent flous, récemment une étude montre que ce complexe peut être régulé par la GTPase *Arf1* (*ADP-ribosylation factor 1*) de manière [ROS]-dépendante (Zhang et al., 2018). D'autre part, les transports du PS ou PE entre la mitochondrie et le RE dépendent également de la composition en groupements acyls de ceux-ci (Kainu et al., 2013). Enfin la déplétion d'ATP provoque une accumulation de PS dans la fraction MAMs, suggérant un rôle de l'ATP dans les transferts de la PS vers la mitochondrie (Shiao et al., 1995).

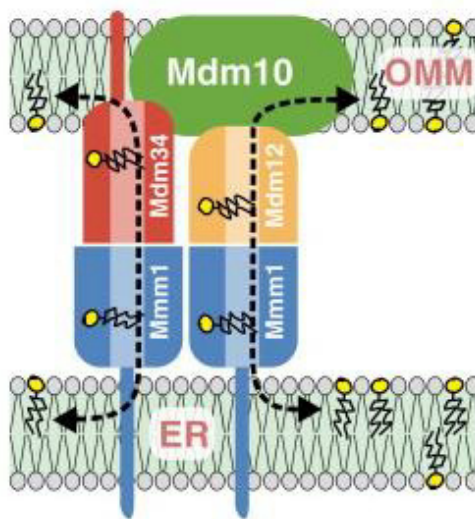


Figure 25 : Modèle possible d'organisation des domaines SMP du complexe ERMES pour permettre les échanges lipidiques entre le RE et la mitochondrie. Ce modèle pourrait expliquer pourquoi l'utilisation de linker artificiel pourrait restaurer les échanges lipidiques perdus dans les modèles *Mdm12* et *mdm34* KO, de par la redondance des domaines SMP de *Mdm12* et *Mdm34* (Lang et al., 2015).

-Le complexe EMC (Levure)

Le complexe EMC (ER Membrane protein Complex) pourrait lui aussi être impliqué dans des échanges lipidiques dans la levure. La génération de mutants pour EMC engendre une diminution des contacts RE-mitochondrie suggérant un rôle stabilisateur des MAMs, mais ces souches présentent également une diminution du transfert de la PS du RE à la mitochondrie (Lahiri et al., 2014). Ce complexe est formé de 6 protéines Emc1-6 et l'EMC interagit avec une protéine mitochondriale située sur l'OMM : TOM-5 (Translocase of the Outer Membrane 5). Cette interaction est nécessaire au transfert de la PS entre le RE et la mitochondrie. A noter que le complexe EMC semble également jouer un rôle dans la réponse au stress du RE (Jonikas et al., 2009) ce qui pourrait aider à mieux appréhender l'importance de ces contacts RE-mitochondrie dans des conditions de stress prolongés comme la glucotoxicité.

-Les échanges lipidiques chez les mammifères

Dans les modèles animaux, aucun homologue des complexes EMC et ERMES n'a été identifié à ce jour. Néanmoins, de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse des phospholipides ont été identifiées au niveau des MAMs chez les mammifères, comme la PSS1/2, la PSD et la PEMT. De plus, on ne peut pas exclure la présence de transporteurs solubles assurant la navette entre le RE et la mitochondrie au niveau des MAMs.

3.2) Les échanges calciques

-Le calcium, une porte vers la fonctionnalité ou l'apoptose

Le réticulum endoplasmique est la source majeure du calcium dans la cellule, son relargage a lieu au niveau des contacts entre le RE et la mitochondrie par l'intermédiaire de canaux calciques comme IP3R (Inositol 3-Phosphate Receptor) côté RE et de VDAC1 (Voltage Dependent Anion-selective Channel 1) sur l'OMM (Rizzuto et al., 1998). Ces transferts calciques permettent physiologiquement de réguler la fonction mitochondriale mais peuvent également être pro-apoptotiques. Ces contacts RE-mitochondrie sont définis comme des micro-domaines, sièges d'influx calciques vers la mitochondrie. La proximité entre IP3R et VDAC1 est permise par la présence de la protéine chaperonne Grp75 (Glucose Related Protein 75) qui s'associe à la fois à VDAC1 et IP3R (**Figure 26**). Le complexe VDAC-IP3R-Grp75

assure le passage du calcium jusqu'à l'espace inter-membranaire, le passage vers la matrice mitochondriale est moins aisé, car il dépendant de MCU, celui-ci doit faire face au canal VDAC1 pour que le transfert soit effectué (Rizzuto et al., 2012).

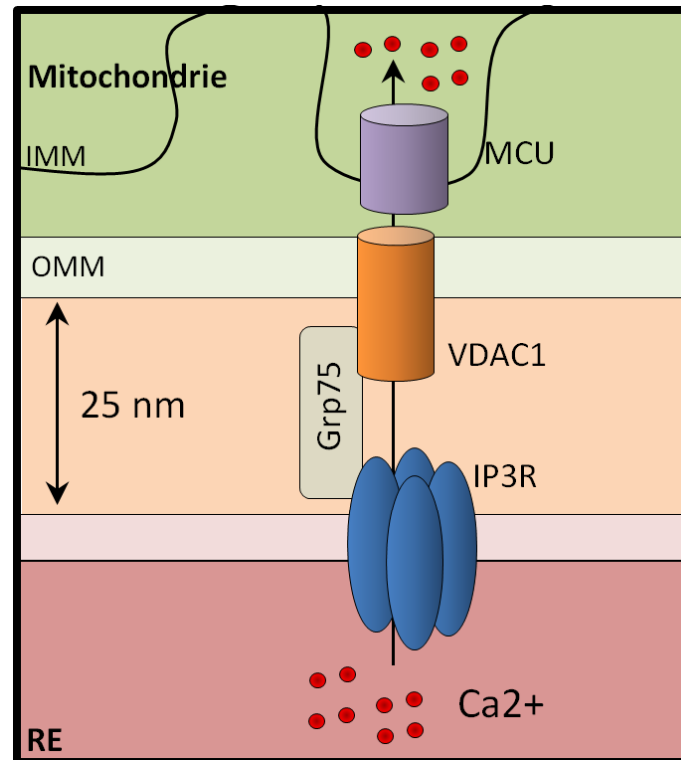


Figure 26 : Schéma du complexe IP3R-VDAC-Grp75 permettant le transfert de calcium depuis le RE vers la mitochondrie. Le MCU assure le passage de l'espace inter-membranaire à la matrice mitochondriale.

Le relargage du calcium réticulaire vers la mitochondrie peut avoir différentes fonctions :

(1) Activer la signalisation calcique au sein de la mitochondrie

(2) Activer la fission mitochondriale

(3) Induire de l'apoptose

(1) Comme décrit dans la partie 1, l'accumulation du calcium dans la mitochondrie permet d'activer la fonction de certaines enzymes mitochondriales et favorise la phosphorylation oxydative et donc la production d'ATP (Satrústegui et al., 2007). Notamment principalement via l'activation de trois déshydrogénase du cycle de Krebs, la PDH (Pyruvate Déshydrogénase), l'ODGH et l'ICDH. Les faibles quantités de calcium du

cytosol ne peuvent pas permettre une augmentation de calcium aussi grande que celle issue du transfert direct entre les 2 organites. Ainsi la présence de ces micro-domaines en contact avec le RE est essentielle pour induire des processus calcium-dépendants. En conditions physiologiques, les contacts RE-mitochondrie favorisent ces transferts calciques vers la mitochondrie et coordonnent la production d'ATP, mais des contacts trop proches ou trop prolongés sensibilisent la mitochondrie à la surcharge calcique et à terme à l'apoptose par ouverture du pore de perméabilisation PTP (Csordás et al., 2006).

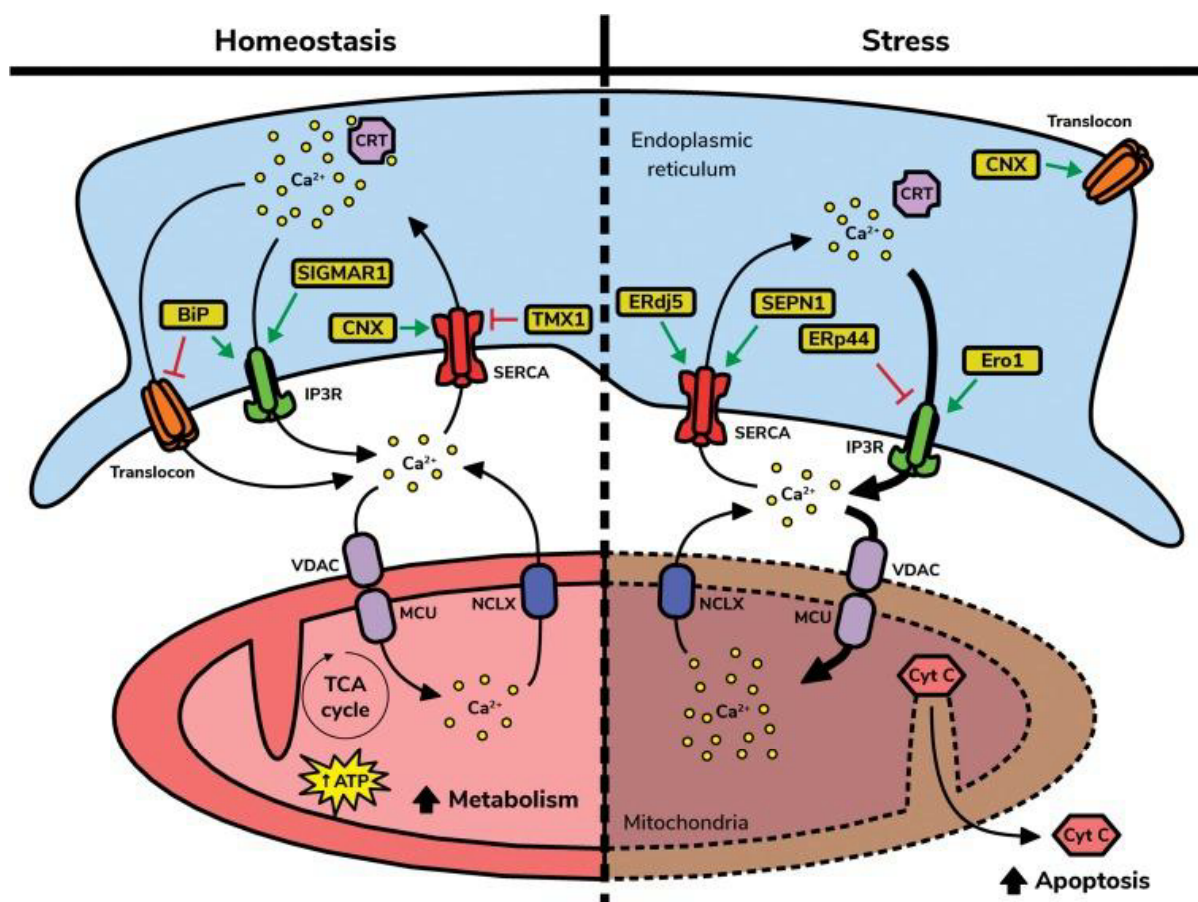


Figure 27 : Rôle des chaperonnes du RE aux MAMs. Cette localisation peut intervenir dans des conditions d'homéostasies (gauche) ou dans des situations de stress (droite), résultant à gauche dans des échanges calciques et à droite dans un transfert unidirectionnel de calcium. Ces protéines régulent les échanges calciques en intervenant avec les différents canaux en charge des échanges calciques ou en déterminant la concentration de calcium dans le RE. Ici, ces protéines déterminent soit la production d'ATP (gauche), soit la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome C lié à l'apoptose (Gutiérrez and Simmen, 2018).

Bien que la logique voudrait que les chaperonnes soient retrouvées uniquement à proximité du translocon pour assurer le repliement des protéines en formation dans le RE, celle-ci sont dispersées tout le long du RE. Beaucoup de ces protéines chaperonnes assurent néanmoins beaucoup de fonctions différentes mis à part le repliement et la prise en charge des protéines mal conformées. Il n'est donc pas surprenant de les retrouver aux MAMs (**Figure 27**) (Gutiérrez and Simmen, 2018). Ces nombreuses chaperonnes sont capables notamment de réguler les flux calciques soit directement en régulant l'activité du canal IP3R, soit indirectement en contrôlant la disponibilité ou la quantité de calcium au sein du RE.

La calnexine est l'une de ces chaperonnes, quand elle est palmitoylée, elle interagit avec la pompe de recapture calcique SERCA2b et favorise la recapture du calcium et donc préserve l'équilibre des stocks calciques réticulaires en limitant les transferts. A l'inverse, lors du stress du RE, la calnexine devient moins palmitoylée et sa fonction passe de la régulation calcique à la fonction de chaperonne. De plus, lors d'un stress du RE, elle est moins présente aux MAMs, alors qu'en condition basale la calnexine y est enrichie (Lynes et al., 2013). La localisation de la calnexine au sein de microdomaines spécifiques dans le RE pourrait se faire notamment par l'intermédiaire d'un « tether » aux MAMs comme PACS-2 (Thomas et al., 2017). Cette localisation aux MAMs est possible par la présence d'un domaine transmembranaire en plus du domaine cytosolique dans sa structure, lui permettant ainsi d'être membranaire. En outre, l'état de palmitoylation de la calnexine peut conditionner son interaction avec le translocon.

Grp78 joue un rôle important également dans le contrôle des flux calciques RE-mitochondrie, en effet Grp78 est capable de lier le calcium mais aussi le canal IP3R (Lièvrement et al., 1997). Sa liaison avec le canal IP3R permet de réguler son assemblage sous forme de tétramère et donc de réguler positivement son activité. Cette interaction est rompue sous l'influence du stress du RE, car Grp78 prend en charge les protéines mal conformées (Higo et al., 2010). Cependant, d'autres études montrent que Grp78 diminue l'activité du canal IP3R, les effets de Grp78 pourraient cependant être tissu-spécifiques (Ouyang et al., 2011; Suyama et al., 2011). La capacité de Grp78 à lier le calcium pourrait être importante dans les phases précoces de développement du stress du RE. En effet, le stress du RE s'accompagne généralement d'une augmentation de l'expression de Grp78 et d'un transfert calcique plus important entre les 2 organites. Grp78 pourrait ainsi promouvoir

une plus grande disponibilité de calcium pour le transfert. De plus, Grp78 régule les stocks calciques de par son interaction avec le translocon en empêchant les fuites calciques (Schäuble et al., 2012).

Sig1R (Sigma 1 receptor) est une protéine chaperonne qui forme un complexe avec Grp78/BiP aux MAMs. La déplétion calcique du RE (provoquée par un stress du RE) induit sa dissociation avec Grp78 et entraîne un transfert calcique prolongé vers la mitochondrie par l'intermédiaire du canal IP3R (Hayashi and Su, 2007). La génération d'une forme tronquée de Sig1R, incapable d'interagir avec IP3R a mis en avant le rôle crucial de Sig1R dans la régulation positive des flux calciques entre le RE et la mitochondrie et la production d'ATP. La forme tronquée de Sig1R à l'inverse diminue la production d'ATP et favorise l'apoptose (Shioda et al., 2012).

D'autres protéines moins décrites ont aussi un rôle dans le contrôle des flux calciques :

Les chaperonnes **ERp44 (Endoplasmic reticulum protein 44)** et **Ero1 α (Endoplasmic reticulum oxidoreductine 1)** régulent également l'activité du canal IP3R1 et contrôlent les flux calciques entre le RE et la mitochondrie (Anelli et al., 2012; Higo et al., 2005). ERp44 est un régulateur négatif de l'activité du canal IP3R et d'autre part sa surexpression réduit l'apoptose (Higo et al., 2005). A l'inverse Ero1 α est un régulateur positif de l'activité de l'IP3R en favorisant son oxydation. Ainsi il favorise les transferts calciques durant le stress du RE, favorisant ainsi l'apoptose. Ces 2 chaperonnes sont retrouvées aux MAMs et entrent de ce fait en jeu dans la régulation des transferts calciques.

La calréticuline permet, avec la calnexine, la prise en charge des protéines non totalement repliées dans le réticulum (Wang et al., 2012). Par l'intermédiaire de SERCA elle peut également jouer un rôle dans les flux calciques. De par sa faculté à lier le calcium, sa surexpression augmente les stocks calciques réticulaires et diminue les flux calciques vers la mitochondrie ainsi que les contacts entre le RE et la mitochondrie (Arnaudeau et al., 2002).

La **PML (Promyelocytic Leukemia)** est une protéine membranaire du RE impliquée dans la suppression tumorale. Elle a récemment été retrouvée aux MAMs (Giorgi et al., 2010). PML interagit physiquement avec IP3R3 pour moduler son état de phosphorylation. Les modèles de cellules PML $^{-/-}$ provoquent l'hyperphosphorylation d'IP3R3. PML favoriserait la

déphosphorylation de l'IP3R3 par le recrutement de la protéine phosphatase **PP2A (Protéine Phosphatase 2A)**. A l'inverse, l'hyperphosphorylation de l'IP3R par la forme active d'Akt (Phospho-Akt) bloque les transferts calciques (Szado et al., 2008). PML permettrait ainsi la formation d'un complexe multiprotéique Akt/PML/PP2A qui contrôle l'activité du canal IP3R3.

(2) Les évènements précis qui entrent en jeu dans la fission mitochondriale restent peu clairs, cependant 2 études récentes montrent que la constriction de l'IMM a lieu par des mécanismes calcium-dépendants au niveau des MAMs (Chakrabarti et al., 2018; Cho et al., 2017). Cette notion a été pour la première fois décrite brièvement par Hom et ses collaborateurs (Hom et al., 2007), où ils montrent le rôle important du calcium dans la fission mitochondriale induite par la thapsigargine, un inhibiteur des pompes SERCA inducteur de stress du RE. Cho et ses collaborateurs définissent le rôle important des MAMs dans la constriction de l'IMM qui précède le recrutement de Drp1 (nécessaire à la constriction de l'OMM). La constriction de l'IMM s'effectue au niveau des zones de contact entre le RE et la mitochondrie. Les flux intra-mitochondriaux de calcium générés par ces contacts potentialisent ainsi la constriction de l'IMM, en provoquant l'entrée de K^+ dans la matrice mitochondriale, la dépolarisation de l'IMM, l'activation d'**OMA1 (Overlapping with the M-AAA protease 1 homolog)** qui assure le clivage d'OPA1 en S-OPA1 et neutralise l'attachement de l'OMM à l'IMM par la rupture du complexe MICOS (**Figure 28**). De plus, ce phénomène est aboli par la perte du MCU, qui induit une élongation des mitochondries. Ce modèle pourrait de plus être dépendant de la polymérisation des filaments d'actine par **IFN2 (Inverted formin 2)**, protéine du RE (Chakrabarti et al., 2018). IFN2 favorise la formation des contacts entre le RE et la mitochondrie et le transfert de calcium vers la mitochondrie. Ainsi, le modèle KO IFN2 abolit la formation de ces contacts et les transferts calciques (Chakrabarti et al., 2018). Mais le rôle précis de la polymérisation des filaments d'actine dans la fission mitochondriale reste à éclaircir.

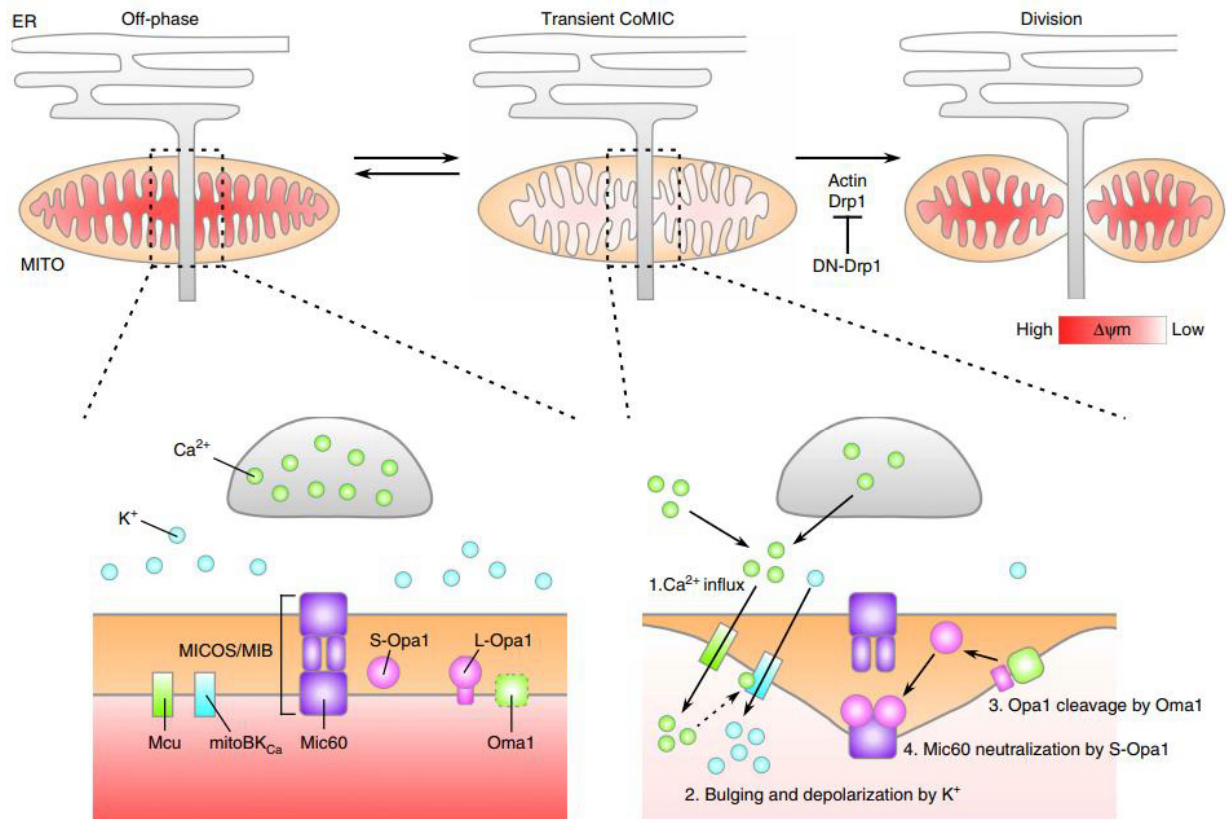


Figure 28 : Modèle schématique montrant le rôle des transferts calciques au niveau des MAMs dans la fission mitochondriale (Cho et al., 2017).

(3) Le rôle de l'accumulation prolongée du calcium dans l'apoptose a été décrit dans la partie 1. Brièvement, l'accumulation de calcium dans la mitochondrie favorise l'ouverture du PTP et le relargage du cytochrome C qui active les voies pro-apoptotiques. De nombreux modèles existent pour expliquer la voie de relargage du cytochrome C par la mitochondrie. L'un d'eux propose que les protéines VDAC, [ANT \(Adenine-Nucleotide Translocator\)](#), [HK2 \(Hexokinase 2\)](#) et [CypD \(Cyclophilin D\)](#) constituent le PTP. Lorsque VDAC (dans l'OMM) fait face à ANT (IMM), ils forment le PTP et permettent la sortie du cytochrome C et l'induction de l'apoptose (Kumarswamy and Chandna, 2009) (**Figure 29**). D'autres modèles proposent la rupture de l'OMM, mais cette question reste encore débattue. Dans notre équipe, nous avons pu montrer la présence de la CypD dans les fractions MAMs, ainsi que son rôle dans le contrôle des interactions et des échanges de calcium entre le RE et la mitochondrie dans le coeur (Paillard et al., 2013) et dans le foie (Rieusset et al., 2016; Tubbs et al., 2014). Cependant son rôle précis dans cette régulation reste à être élucidé.

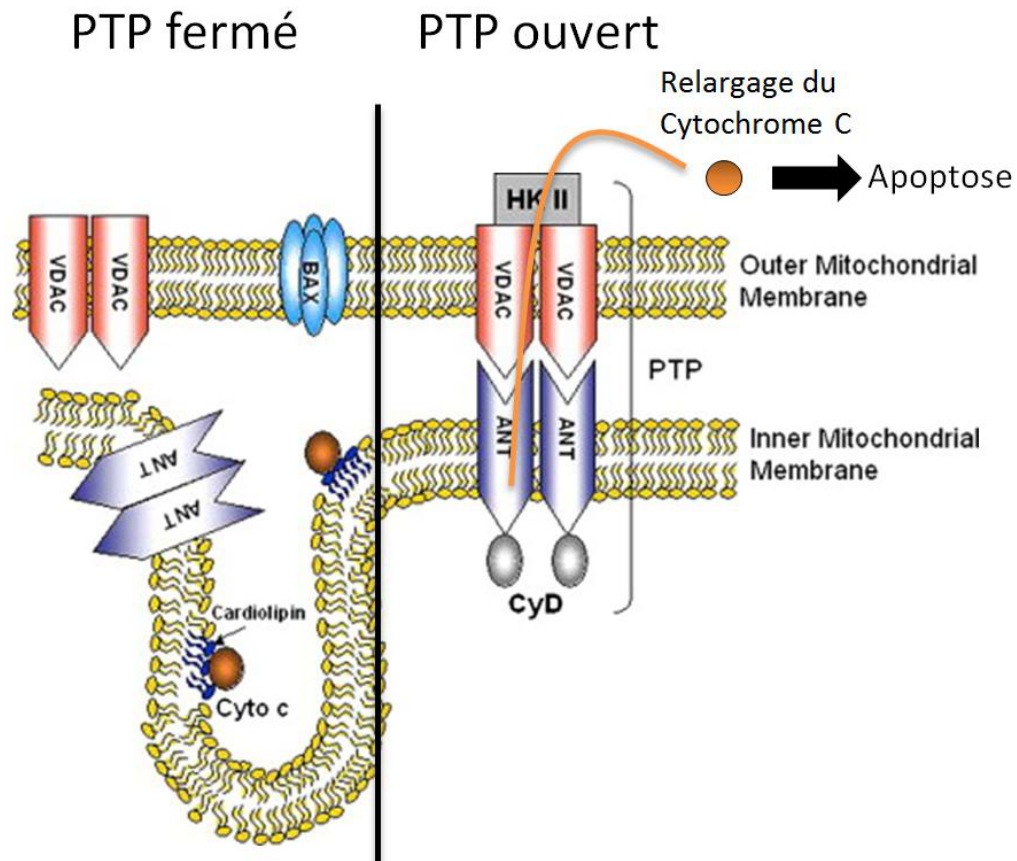


Figure 29 : Composition du pore PTP en position ouverte ou fermée (Kumarswamy and Chandna, 2009).

3.3) Dynamique mitochondriale

3.3.1) Rôle des MAMs dans la dynamique mitochondriale

Il existe un lien très étroit entre la dynamique mitochondriale et la dynamique réticulaire. La fission mitochondriale est dépendante de nombreuses protéines telles que Drp1, Mff ou Fis1 (cf Partie 1). Peu de choses sont néanmoins connues quant aux sites exacts de fission sur la mitochondrie. Celle-ci a lieu à un endroit où les tubules du RE s'enroulent autour de la mitochondrie et applique une constriction persistante tout le long de la fission mitochondriale (**Figure 30A**). Le recrutement du RE à la mitochondrie au site de la fission a lieu indépendamment du recrutement de Drp1 et de Mff (Friedman et al., 2011), mais les mécanismes sous-jacents au rapprochement du RE qui précèdent le recrutement de ces 2 protéines restent vagues. Il est important de noter que le diamètre de la mitochondrie est réduit au niveau de la zone de contact avec le RE. Secondairement, la zone de contact entre le RE et la mitochondrie est également le siège du recrutement de Drp1. Drp1 semble

néanmoins jouer un rôle dans le maintien structural de la mitochondrie et du RE, comme démontré par la génération de mutants de Drp1 où les mitochondries ont un aspect gonflé ou tubulaire et une proximité plus forte avec le noyau (Pitts et al., 1999) (**Figure 30B**).

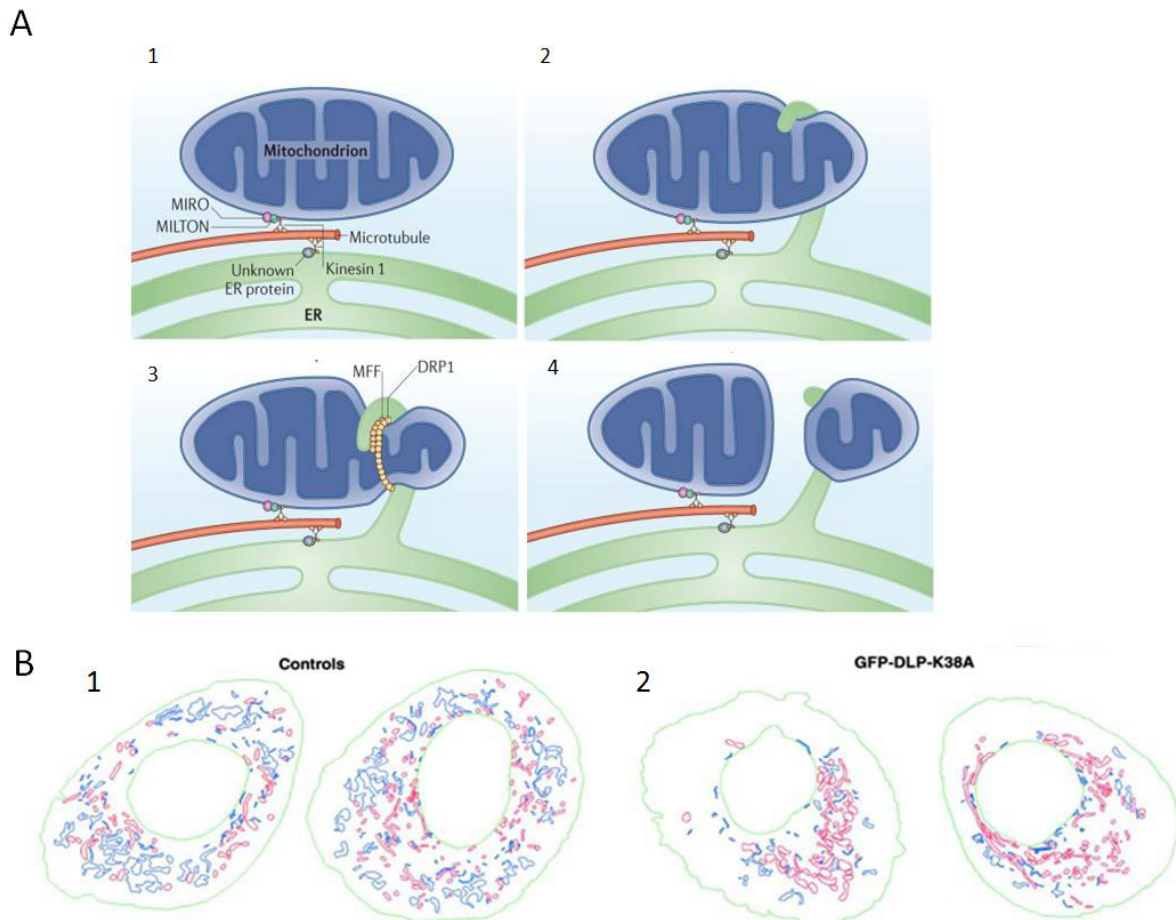


Figure 30 : Rôle des MAMs dans la fission mitochondriale. « A, Modèle de régulation de la fission par les contacts RE-mitochondrie. La mitochondrie et le RE sont tous les 2 reliés aux microtubules par des facteurs associés à la kinésine 1. La constriction mitochondriale médiée par Drp1 prend place au niveau des zones de contact entre le RE et la mitochondrie. Une hypothèse est que les contacts RE-mitochondries pourraient induire une préconstriction avant le recrutement de Drp1. La fission est induite par Drp1 et son cofacteur MFF » (Rowland and Voeltz, 2012). B, Analyse spatiale du profil du RE et de la mitochondrie dans des cellules contrôles vs des cellules exprimant une forme mutée de DLP1 (GFP-DLP1-K38A), B1, profil du RE (bleu) et des mitochondries (rouge) des cellules contrôles. B2, réduction de la quantité de RE, les mitochondries apparaissent gonflées ou tubulaires avec une proximité plus forte avec le noyau dans les cellules mutées » (Pitts et al., 1999).

En outre, ces 2 organites restent également liés quand ils bougent le long des microtubules. Les déplacements du RE sont plus fréquents que ceux de la mitochondrie et il semblerait que le RE « trouve » la mitochondrie pour former les MAMs et non l'inverse. De plus, le RE se déplace le long des microtubules préférentiellement au niveau des microtubules acétylés (Friedman et al., 2011).

3.3.2) Les protéines aux MAMs intervenant dans la dynamique mitochondriale

-Le rôle controversé de la Mfn2 : Linker ou spacer ?

De nombreux candidats pourraient être choisis parmi les protéines composant les MAMs. Mon attention s'est portée sur la Mfn2, de par son implication connue dans la régulation des mécanismes de fusion/fission. Elle est localisée à la fois sur le RE et sur la mitochondrie. Plusieurs études montrent que la Mfn2 par oligomérisation homologue (Mfn2-Mfn2) ou hétérologue (Mfn2-Mfn1) forme des ponts entre le RE et la mitochondrie (**Figure 31A**) et donc son invalidation déstabilise les interactions RE-mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008; Naon et al., 2016). D'autres études montrent que la sous-expression ou le KO de Mfn2 induit une augmentation des contacts RE-mitochondries associée à une induction des transferts calciques vers la mitochondrie (Filadi et al., 2015; Wang et al., 2015) (**Figure 31B**). Ces résultats contradictoires révèlent la complexité du rôle de Mfn2 dans la formation des contacts entre la mitochondrie et le RE et le débat reste ouvert (Filadi et al., 2017a). D'autre part, de nombreuses protéines régulent ou sont régulées par Mfn2, telles que Drp1, MITOL (Mitochondrial E3 ubiquitin-protein ligase MARCH 5), OPA1 ou Gp78 (Glycoprotein 78) (Huang et al., 2011; Sood et al., 2014; Sugiura et al., 2013; Wang et al., 2015), ce qui pourrait entrer en jeu dans des régulations différentielles de Mfn2. De plus, Mfn2 est un acteur connu dans la régulation de la dynamique mitochondriale, mais il joue également un rôle dans le contrôle du stress des organites et la formation de l'autophagosome (Filadi et al., 2018b). Il n'est pas à exclure que la sous-expression de Mfn2 pourrait engendrer des mécanismes compensatoires de surexpression protéique ou de relocalisation protéique aux MAMs qui expliquerait ces résultats contradictoires. Enfin, la redondance fonctionnelle partielle entre les 2 isoformes Mfn1/Mfn2 pourrait justifier cette hypothèse. Récemment, une explication potentielle à cette controverse a été proposée suggérant que la Mfn2 pourrait être impliquée dans différents contacts entre le RE et la

mitochondrie, des contacts étroits et des contacts plus larges aux rôles différents (Cieri et al., 2018).

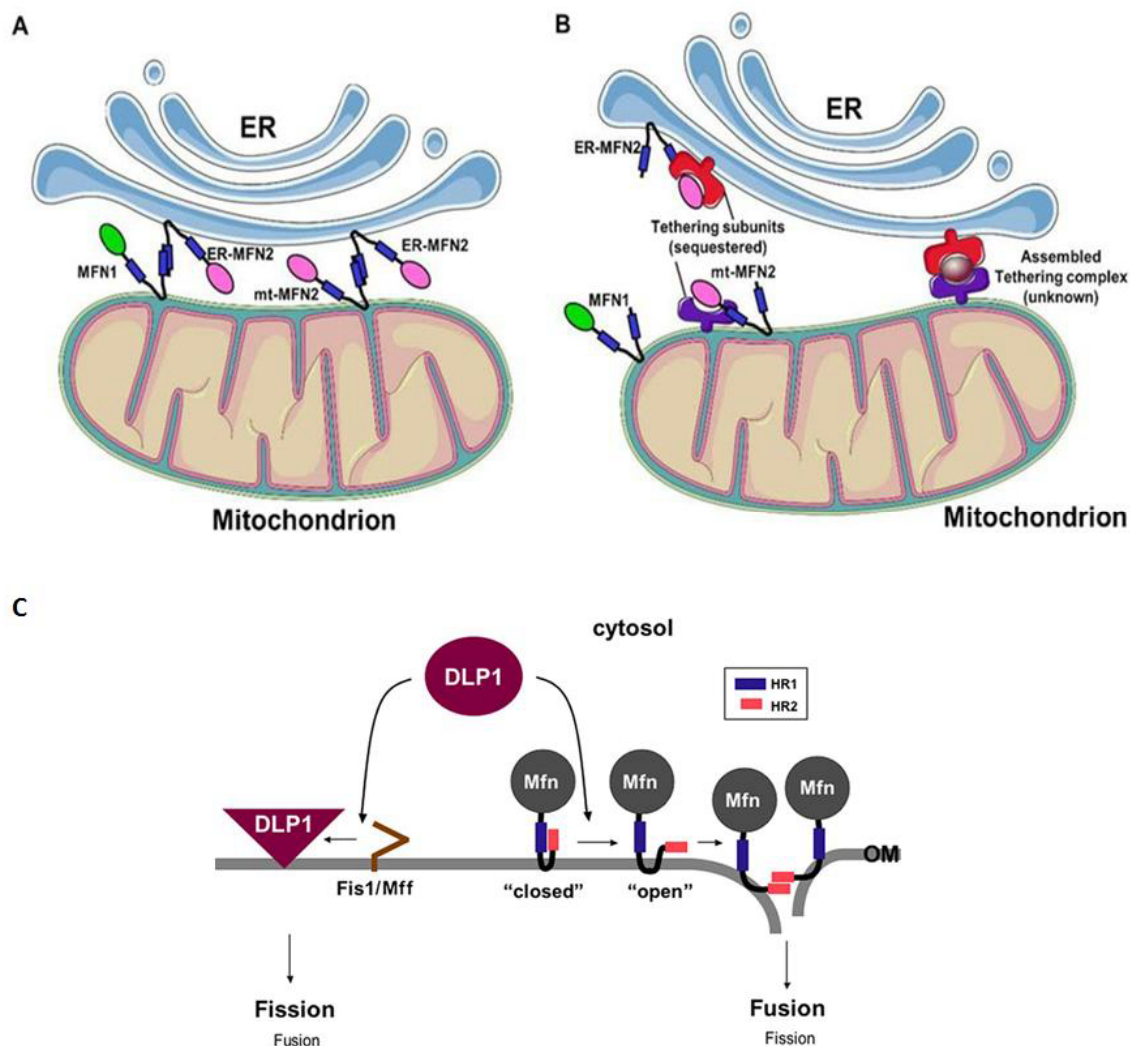


Figure 31 : La Mfn2, un tether ou un spacer. A, « Schéma du rôle classique de Mfn2 comme modulateur positif des interactions mitochondrie-RE. Dans ce modèle, la Mfn2 du RE forme des ponts avec la Mfn1/2 mitochondriale. B, Schéma représentant la Mfn2 comme un modulateur négatif des contacts RE-mitochondries. Dans ce modèle, la Mfn2 pourrait interagir avec des « séquestreurs » encore inconnus, empêchant les contacts entre les 2 « séquestreurs » mitochondriaux et réticulaires (Filadi et al., 2018b). C, Modèle de la fonction de DLP1 dans la régulation de la fusion ou la fission mitochondriale. L'interaction entre les domaines HR1/HR2 de la Mfn2 dans une conformation « fermée » empêche les interactions Mfn2/Mfn2 essentielles à la fusion mitochondriale. DLP1 pourrait déplacer des domaines et générer une forme « ouverte » de la Mfn2 qui permettrait son oligomérisation et rendrait DLP1 inaccessible pour Fis1 » (Huang et al., 2011).

Les travaux de Huang P. et ses collaborateurs, décrivent une nouvelle fonction de Mfn2 dans la régulation de la dynamique mitochondriale. Ils ont découvert que 2 régions de la Mfn2, HR1 et HR2 (Heptad-Repeat Regions) pourraient interagir, cette modification de la conformation de la Mfn2 favoriserait son interaction avec Drp1 entraînant ainsi son recrutement et l'induction de la fission mitochondriale (Huang et al., 2011) (**Figure 31C**). Une fois la fission initiée, le RE reste attaché à la mitochondrie fissionnée peut-être pour assurer des échanges fonctionnels lipidiques ou calciques ou pour conduire la mitochondrie vers l'autophagie.

-Rôle de MITOL

MITOL (Mitochondrial E3 Ubiquitin-protein ligase/March5) est une ubiquitine ligase mitochondriale qui contrôle la dynamique mitochondriale par l'intermédiaire de Drp1, mais elle est impliquée dans le contrôle qualité de la mitochondrie ainsi que dans la protection contre le stress oxydatif (Nagashima et al., 2014). MITOL est localisée aux MAMs et peut interagir avec Mfn1/2 avec laquelle elle semble réguler la formation des MAMs via Mfn2 (**Figure 32**). L'invalidation de MITOL provoque la délocalisation de la Mfn2 et diminue les contacts RE-mitochondries. MITOL régule l'oligomérisation de Mfn2 par polyubiquitination, de plus celle-ci a lieu sans dégradation au protéasome de Mfn2. Il est intéressant de noter que MITOL interagit seulement avec la Mfn2 mitochondriale mais pas avec celle du RE (Sugiura et al., 2013).

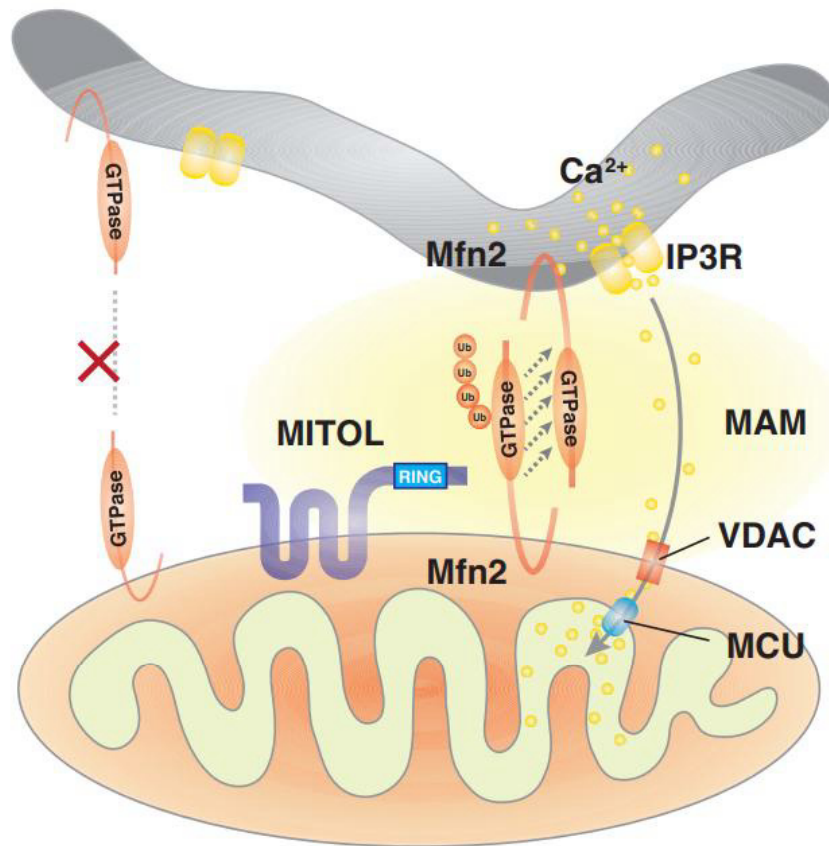


Figure 32 : Modèle par lequel MITOL pourrait contrôler les interactions entre le RE et la mitochondrie. MITOL ubiquitine la Mfn2 mitochondriale, ce qui l’active. Cette forme active de Mfn2 va ensuite fixer la forme Mfn2 présente sur la membrane du RE, provoquant l’oligomérisation de la Mfn2 et donc l’interaction entre le RE et la mitochondrie (Nagashima et al., 2014)

-Autres protéines aux MAMs régulant la dynamique mitochondriale

D’autres protéines telles que la syntaxine 17 interviennent dans la régulation de la fission mitochondriale MAMs-dépendante. Elle se trouve aux MAMs côté RE sur des structures « type radeau lipidique ». Elle promeut la fission mitochondriale par le contrôle de la localisation et l’activité de Drp1. De manière intéressante, elle est elle-même régulée par l’état nutritionnel de la cellule (Arasaki et al., 2015). En condition de jeun, la syntaxine 17 se dissocie de Drp1 et elle est redistribuée toujours aux MAMs mais pour faciliter la formation des autophagosomes via le recrutement d’ATG14L (Autophagie related gene 14).

Bap31 (B-cell receptor associated protein 31) est une protéine présente dans la membrane externe du RE, dont la fonction serait d’être un cargo pour les protéines transmembranaires. L’interaction entre Bap31 (RE) et Fis1 (Mitochondrial) forme une

plateforme pour le recrutement de la procaspase-8 durant les phases précoces de l'apoptose. Cette plateforme ainsi formée favoriserait les transferts calciques vers la mitochondrie, induisant ainsi la fission mitochondriale puis à terme l'apoptose de la cellule (Iwasawa et al., 2011; Wang et al., 2011).

PACS2 (Phosphofurin Acid Cluster Sorting protein 2) est une protéine retrouvée à la fois dans le RE et la mitochondrie. Les transcrits de PACS-2 sont plus exprimés dans le cerveau, le pancréas, les testicules, le cœur et plus abondamment dans les muscles squelettiques. PACS-2 contrôle les contacts RE-mitochondries de par son rôle de « tether ». En effet, le KO de PACS-2 réduit les échanges calciques et l'initiation de l'apoptose mais également induit la fragmentation mitochondriale (Simmen et al., 2005). D'autre part, la délétion de PACS-2 induit l'activation des voies UPR. Ce qui soulève un rôle central de cette protéine dans le contrôle du destin cellulaire.

Dans la levure, le défaut d'expression des membres du complexe ERMES induit lui aussi la fission mitochondriale comme le suggéraient leurs noms Mdm (Mitochondrial distribution and morphology protein) et Mmm (Maintenance of mitochondrial) (Sogo and Yaffe, 1994). Cependant, déterminer le rôle direct ou indirect de ces protéines reste difficile.

3.4) Stress RE et MAMs

L'induction pharmacologique du stress du RE par la tunicamycine ou la thapsigargine augmente les contacts entre le RE et la mitochondrie, cependant les mécanismes sous-jacents à cette augmentation restent encore mal compris (Arruda et al., 2014; Bravo et al., 2011). La réponse adaptative UPR est un facteur clé du stress du RE, elle découle d'une accumulation de protéines mal conformées qui induit l'activation de différentes voies adaptatives telles que la voie PERK-ATF4. La sous-expression de PERK diminue les contacts RE-mitochondrie, diminution restaurée par la réexpression de PERK dans les cellules PERK -/- . Ces résultats montrent l'importance de PERK dans la formation des contacts entre le RE et la mitochondrie lors du stress du RE. PERK a plusieurs fonctions, elle contribue à l'induction de l'apoptose par le maintien de l'expression du facteur pro-apoptotique CHOP mais également en facilitant le transfert de calcium vers la mitochondrie, de plus elle favorise la propagation des ROS entre le RE et la mitochondrie (Verfaillie et al., 2012).

De la même manière, les modèles murins ou *in vitro* de l'ablation de Mfn2 génèrent l'apparition du stress du RE via l'activation de PERK, XBP1 et ATF6 (Ngho et al., 2012; Sebastián et al., 2012). D'autre part celle-ci s'accompagne d'une dilatation du RE. Mfn2 interagit structurellement avec PERK et semble réguler la dynamique mitochondriale, d'autre part la Mfn2 régule ainsi négativement l'activité de PERK (Muñoz et al., 2013). La Mfn2 quant à elle est régulée par Gp78, cette ubiquitine ligase est un composant du système ERAD. Elle dégrade la Mfn2 et favorise les interactions RE-mitochondries, mais les mécanismes sous-jacents restent encore complexes. En outre, il existe un lien de causalité fort et réciproque entre le stress du RE et les MAMs qui nécessiterait de plus amples études.

Parkin est connu comme un facteur cytoprotecteur dont l'expression est augmentée en condition de stress, telle que le stress du RE (Bouman et al., 2011). Sa surexpression est associée à une augmentation des contacts entre le RE et la mitochondrie en favorisant le transfert calcique entre les 2 organites ainsi que la production d'ATP (Cali et al., 2013). Ces données soulignent la dichotomie de l'impact des contacts RE-mitochondries sur la fonction ou la dysfonction mitochondriale. Ces mécanismes pourraient permettre lors des phases précoces du stress du RE de maintenir la fonctionnalité cellulaire avant d'entrer dans une phase pro-apoptotique (Bravo et al., 2011).

En outre, il n'est pas à exclure qu'il existe une régulation biphasique des MAMs lors du stress du RE qui dépend de l'intensité du stress et de la durée de celui-ci.

3.5) Autophagie/Mitophagie et MAMs

L'autophagie est un processus qui permet la dégradation et le recyclage de composants cellulaires. Un prolongement membranaire se forme autour du composé cellulaire à dégrader et forme un autophagosome, celui-ci va ensuite fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome et dégrader ainsi une fraction cytosolique ou un organelle entier. Une étude montre que l'autophagosome se forme au site des contacts RE-mitochondrie. Après restriction alimentaire, les marqueurs [ATG5 \(Autophagie related gene 5\)](#) et ATG14 se localisent au MAMs. La présence au RE de la syntaxine 17 permet aussi le recrutement d'ATG14 au niveau des MAMs (Hamasaki et al., 2013). La sous-expression de protéines de MAMs tel que PACS2 ou Mfn2 réduit le nombre d'autophagosomes, ce qui renforce l'implication des MAMs dans l'autophagie (Naon and Scorrano, 2014).

3.6) Lien distance des contacts/fonctions

Les avancées techniques actuelles nous permettent maintenant de déterminer avec précision la proximité exacte entre le RE et la mitochondrie au sein même des MAMs, faisant émerger de nouvelles interrogations : Existe-il différents types de MAMs ? La proximité a-t-elle une importance dans la composition protéique et fonctionnelle des contacts RE-mitochondrie ? Cette revue récente propose l'hypothèse élégante que chaque distance de MAMs pourrait être associée à des fonctionnalités différentes : reliant les distances entre 0-10 nm aux échanges lipidiques, celles aux alentours de 20 nm aux échanges calciques et celles proches de 30 nm à la fission mitochondriale, catégorisant ces interactions entre MAMs-lipides, MAMs-Ca²⁺, MAMs-fission (Giacomello and Pellegrini, 2016) (**Figure 33**). Ce modèle a été en partie étudié grâce à l'utilisation de *linkers* de différentes tailles permettant de créer artificiellement des contacts RE-mitochondrie. Cette étude a montré que des contacts trop proches, incompatibles avec la taille du canal IP3R, bloquent les transferts calciques inter-organites, impliquant directement l'importance de la proximité entre le RE et la mitochondrie (Csordás et al., 2010).

Le type de RE, lisse ou rugueux, pourrait également entrer en jeu dans la détermination du type de MAMs, comme l'a montré l'article de Wang P. et al, avec un effet différentiel de la sous-expression de Gp78 (Glycoprotein 78) sur les contacts RER-mitochondrie et SER-mitochondrie (Wang et al., 2015). Il n'est cependant pas à exclure qu'il puisse y avoir un profil de MAMs qui soit spécifique du type cellulaire.

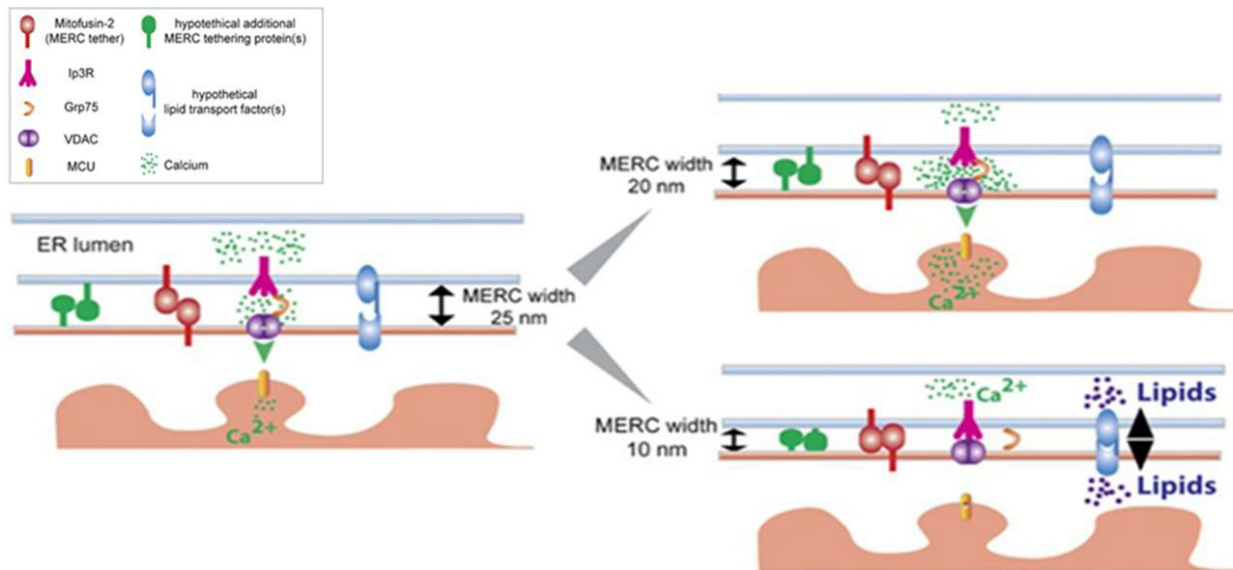


Figure 33 : Rôle de la distance entre les 2 organites dans la fonctionnalité des MAMs.

« Modèle représentant l'importance de la distance séparant le RE de la mitochondrie dans la régulation des fonctions des MAMs. Les MAMs sont des structures dynamiques, la distance entre les 2 organites dépend du statut métabolique de la cellule. Ce modèle montre comment une distance trop grande ou trop proche influe sur l'assemblage des complexes protéiques qui dirige les échanges calciques ou lipidiques. Une distance entre 20-30 nm dans ce modèle correspondrait à des MAMs fonctionnels. Une distance de 10 nm par contre pourrait altérer ce processus de par l'encombrement stérique des protéines qui forment le complexe régulant les transferts calciques entre le RE et la mitochondrie. Cependant, une telle distance pourrait favoriser les échanges lipidiques. » Issu de (Giacomello and Pellegrini, 2016).

4) Techniques d'étude des MAMs

De par la complexité des contacts RE-mitochondrie, autant structurellement que fonctionnellement, de nombreuses techniques ont été élaborées pour leur étude (**Figure 34**), techniques que je décris ci-dessous brièvement.

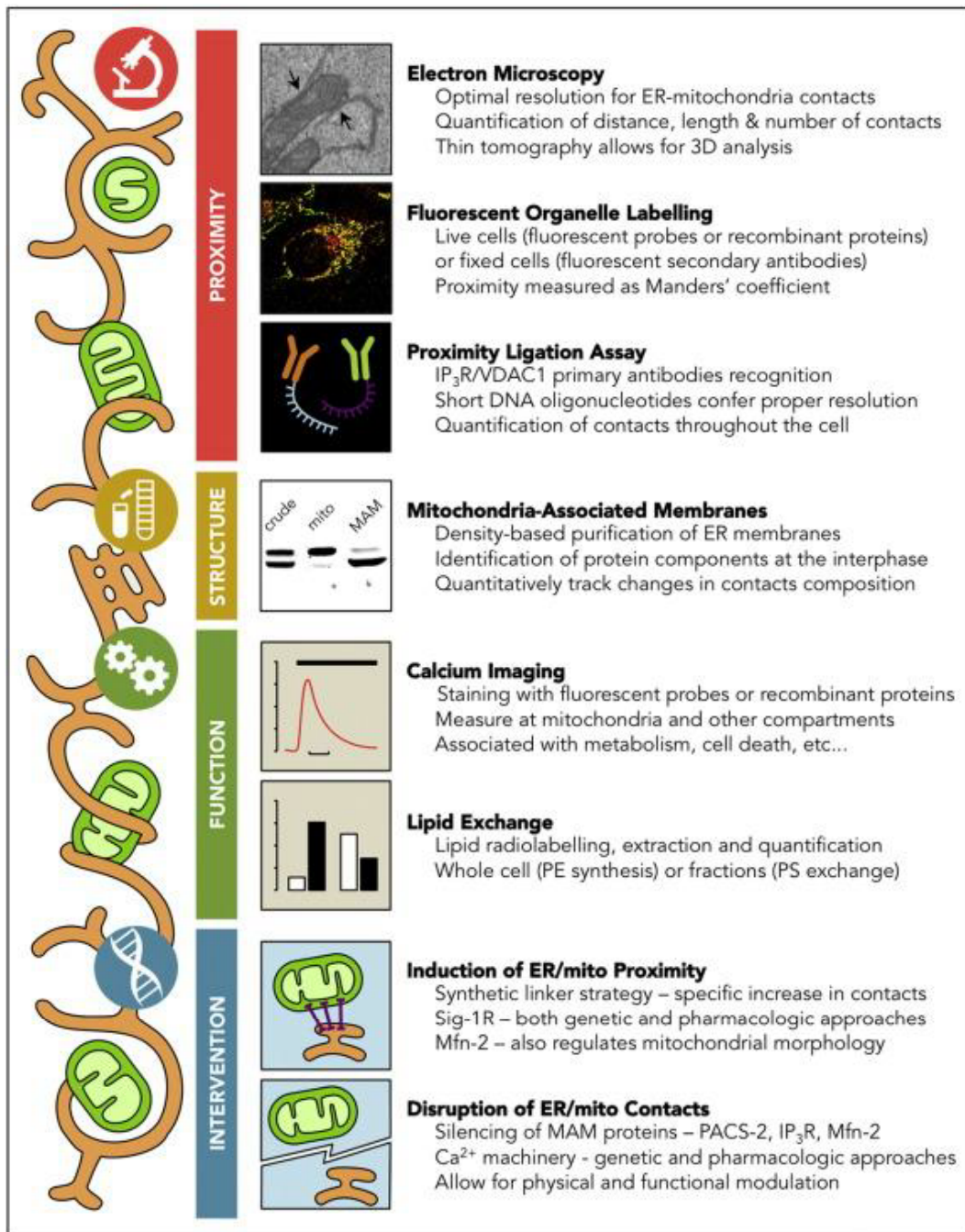


Figure 34 : Schéma représentant les différentes stratégies d'étude des communications entre les organites. « L'étude de la proximité des MAMs peut se faire via différentes techniques, comme la microscopie électronique, la microscopie à fluorescence ou le [proximity ligation assay \(PLA\)](#). La composition des MAMs peut être déterminée par fractionnement cellulaire des mitochondries, du RE et des MAMs. L'analyse fonctionnelle peut se faire en étudiant les échanges lipidiques ou les transferts calciques. Enfin, il existe des outils génétiques et pharmacologiques qui permettent de rompre ou de favoriser les interactions entre le RE et la mitochondrie, permettant d'étudier leur importance dans des processus physiologiques ou pathologiques » (López-Crisosto et al., 2015).

4.1) Etude Ultra-structurale des MAMs

4.1.1) Microscopie Electronique (ME)

La ME utilise un faisceau d'électrons et permet des analyses en haute en résolution à 0.2 nm. Cette technique est très adaptée à l'étude de la juxtaposition RE-mitochondrie car elle permet d'accumuler une énorme quantité d'informations : telles que le périmètre et la surface des mitochondries et du RE, la surface totale d'interaction entre le RE et la mitochondrie, la distance exacte entre les 2 organites, le nombre de contacts/mitochondrie ainsi que la nature du RE, à savoir RER ou SER. Il existe différents types de ME, la TEM (Transmission Electron Microscopy) permet des analyses en 2D, tandis que l'ET (Electron Tomography), la SEM (Scanning Electron Microscopy), la FIB-SEM (Focused Ion Beam SEM) et la SBF-SEM (Serial Block Face-SEM) permettent des analyses en 3D essentiellement de surface. Certaines de ces techniques sont déjà utilisées pour la quantification des contacts RE-mitochondrie (Elgass et al., 2015; Miyazono et al., 2018; Ohta et al., 2014). L'IEM (Immunoelectron Microscopy), quant à elle, offre l'avantage de visualiser, grâce à des particules d'or liées à des anticorps secondaires, des complexes ou des protéines aux MAMs (Filadi et al., 2018a). Chaque type de ME permet des analyses de hautes résolutions en 2D ou en 3D d'échantillons à l'échelle de la cellule, du tissu ou d'échantillons issus du fractionnement cellulaire. La seule limite réside dans le fait que les échantillons sont fixés, ce qui ne permet donc pas d'étudier des mécanismes dynamiques.

4.1.2) Co-Immuno-Fluorescence (Co-IF)

Les contacts RE-mitochondrie peuvent également être étudiés par colocalisation en marquant les 2 organites d'intérêt avec un fluorophore différent. L'analyse des observations est faite par microscopie confocale ou à fluorescence plus classiquement et permet de déterminer le coefficient de colocalisation de Mander's ou de Pearson's qui détermine la superposition en terme d'aires/volumes entre le RE et la mitochondrie (Bolte and Cordelières, 2006). Cette technique permet également d'étudier le nombre ou la morphologie des organites sur cellules vivantes ou fixées.

4.1.3) Proximity Ligation Assay (PLA)

Le PLA est une technique décrite par Fredriksson et ses collaborateurs en 2002 pour permettre l'étude des interactions protéiques (Fredriksson et al., 2002). Elle a été optimisée au sein de notre équipe (par Emilie Tubbs et Jennifer Rieusset) pour visualiser et quantifier les contacts entre le RE et la mitochondrie sur les cellules ou tissus fixés. C'est la proximité entre VDAC1 (Mitochondrie, OMM) et IP3R (RE) au sein des MAMs qui est visualisée. On utilise tout d'abord des anticorps primaires d'espèce différente qui reconnaissent VDAC1 et IP3R, ceux-ci vont être ensuite reconnus par des anticorps secondaires couplés à des sondes (ADN) dites sondes PLUS (+) et sonde MINUS (-). Ces 2 sondes ont des séquences complémentaires et la ligation en présence de ligase n'est possible que si la distance entre ces 2 protéines est inférieure à 40 nm. En présence ensuite d'ADN polymérase, un long produit d'ADN lié aux sondes PLA se forme qui peut être visualisé sous forme de points fluorescents en présence d'oligonucléotides fluorescents ou de points bruns en présence d'oligonucléotides couplés à la peroxydase. Chaque point représente ensuite une proximité entre VDAC et IP3R inférieure à 40 nm et donc indirectement la proximité entre la mitochondrie et le RE. On peut ainsi quantifier sous microscope à fluorescence ou en lumière blanche le nombre de points par cellule (Tubbs et al., 2014; Tubbs and Rieusset, 2016). Le kit fluorescent est préférentiellement utilisé sur les cellules en culture alors que le kit « brightfield » est préférentiellement utilisé sur les coupes de tissus pour ne pas être gêné par l'autofluorescence des tissus. Néanmoins, cette technique est dépendante du niveau d'expression ainsi que de la distribution de VDAC1 et IP3R, et de la spécificité des anticorps utilisés. Cette technique nécessite aussi des cellules ou tissus fixés et n'est pas applicable à des études dynamiques en temps réel.

4.1.4) FRET

Le FRET ou **Fluorescent Resonance Energy Transfer** se base sur l'utilisation de 2 fluorophores dont la longueur d'onde d'émission du premier sera égale à la longueur d'onde d'excitation du second. Ainsi, en marquant par exemple la mitochondrie avec la **CFP (Cyan Fluorescent Protein)** considérée comme le donneur et la **YFP (Yellow Fluorescent Protein)** comme l'accepteur côté RE, on peut suivre la proximité entre le RE et la mitochondrie au niveau des zones de transfert d'énergie. Ce transfert d'énergie n'est permis qu'à des

proximités aux alentours de 10 nm, cette technique offre plus de sensibilité pour l'étude des contacts rapprochés RE-mitochondrie, mais permet également des analyses en temps réel sur cellule vivante (Csordás et al., 2010). Néanmoins, il n'est pas à exclure que l'adressage de ces fluorophores ancrés au RE et à la mitochondrie, de par leur taille et leur structure, altèrent ou gênent la formation des MAMs ou diffusent au sein des organites.

D'autres techniques existent également telles que la dDFP (dimerization dependent Fluorescent Protein) où les 2 protéines non fluorescentes le deviennent lors de leur dimérisation (Alford et al., 2012). Ou encore l'utilisation de split-GFP, où la GFP (Green Fluorescent Protein) a été séparée en 2 polypeptides non fluorescents qui fluorescent lorsqu'ils s'associent (Pinaud and Dahan, 2011). Des versions courtes et longues de split-GFP (SPLIC-S/L) ont été également générées pour étudier en dynamique les interactions étroites et plus longues entre le RE et la mitochondrie (Cieri et al., 2018)

4.2) Etude de la composition protéique des MAMs

Extraction/fractionnement des MAMs

Il est possible d'isoler les MAMs. Pour cela, il faut séparer les différents constituants cellulaires par gradient de densité au percoll et ultracentrifugation. Cette fraction a été nommée à l'origine fraction X (Vance, 1990), cette technique est maintenant utilisée en routine pour isoler les MAMs de tissus ou plus difficilement de cellules (Wieckowski et al., 2009). On peut ainsi séparer le RE, les mitochondries pures des mitochondries dites « mito crude » et les MAMs et déterminer des rendements de purification. On peut ensuite par WB (Western Blot) étudier l'expression et la composition des protéines aux MAMs ainsi isolées. Cependant ces extractions font débat quant à leurs pureté et nécessitent d'être optimisées (Wieckowski et al., 2009).

Il est possible également par co-immuno précipitation (co-IP), d'étudier les interactions protéines-protéines par l'utilisation d'anticorps couplés à des billes. L'élution de la 1^{ère} protéine permet de récupérer en même temps la/les protéine(s) en interaction avec celle-ci, cette technique peut donc s'utiliser également pour l'étude de l'interaction inter-organites (Theurey et al., 2016).

4.3) Etude fonctionnelle des MAMs

4.3.1) Signalisation calcique

Les échanges calciques au sein des MAMs ont un rôle essentiel dans la fonction ou la dysfonction mitochondriale. Il est possible d'étudier par l'intermédiaire de sondes calciques codées par des plasmides, les quantités de calcium intra-organite. De très nombreuses sondes existent à ce jour pour quantifier les quantités de calcium dans le RE ou la mitochondrie. Je ne décris dans cette partie que brièvement celles que j'ai utilisées durant ma thèse.

Le calcium du RE peut se quantifier par l'intermédiaire du biosenseur erGAP1. Cette sonde est ratiométrique et basée sur le **BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer)** entre l'aequorin et la GFP (Rodríguez-Prados et al., 2015). Elle permet de suivre directement les quantités de calcium réticulaire dans une cellule vivante. L'utilisation de la Thapsigargine, qui vidange le RE par inhibition des pompes de recapture **SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase)** est un moyen utilisé pour confirmer les résultats avec erGAP1 ou peut être utilisée en mesurant à l'inverse le calcium côté cytosolique avec la sonde ratiométrique Fura2-AM.

On peut suivre les quantités de calcium dans la mitochondrie par l'intermédiaire de sondes telles que le 4mtD3CPV, sonde caméléon dont le principe est basé sur le FRET entre la YFP et la CFP. Cette sonde est adressée dans la mitochondrie et permet un suivi en direct les quantités de calcium intramitochondriaux (Palmer et al., 2006). Elle peut servir également à suivre les transferts calciques entre le RE et la mitochondrie. En effet, l'utilisation de molécules qui activent le transfert entre les 2 organites, telles que l'ATP ou l'histamine (génère de l'IP3 et donc active les canaux IP3R) vont induire un transfert du calcium vers la mitochondrie où l'on va pouvoir mesurer son accumulation. L'intensité de cette augmentation définit l'importance du transfert entre les 2 organites.

4.3.2) Echanges lipidiques

L'étude des lipides se fait essentiellement par radio-marquage et permet de suivre les quantités de phospholipides par chromatographie sur couche mince. Il est possible également de suivre le transfert de lipides par marquage par exemple de la sérine au

carbone 14 dans les microsomes, que l'on met en contact artificiellement avec des mitochondries. Après séparation des microsomes et des mitochondries, on évalue la quantité en C¹⁴ dans la fraction mitochondriale (Ardail et al., 1991). Il est actuellement possible d'analyser la composition en phospholipides en couplant la **CLHP (Chromatographie en phase liquide à haute performance)** à la spectrométrie de masse. Ce couplage assure des analyses très sensibles et sélectives de nombreuses molécules dont les phospholipides (Busardò et al., 2017).

4.4) Modulation des MAMs

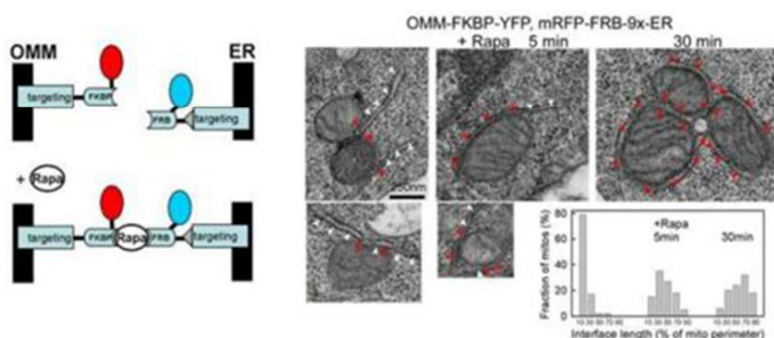
La modulation positive ou négative des MAMs peut se faire via la sous- ou sur-expression des différents acteurs considérés comme pont ou « tether », certaines cibles privilégiées comme PACS-2, Mfn2 ou encore IP3R ont été très étudiées dans ce contexte. Il reste néanmoins difficile de dissocier le rôle « tether » de ces protéines de leurs fonctions multiples dans la cellule. C'est pourquoi ces dernières années beaucoup d'efforts ont été développés pour mettre en place une modulation des MAMs sans moduler l'expression des différentes protéines endogènes qui les composent (Csordás et al., 2010; Doghman-Bouguerra et al., 2016).

4.4.1) Linker

Hajnóczky et ses collaborateurs ont développé différents types d'outils pour assurer la liaison artificielle entre le RE et la mitochondrie (Csordás et al., 2010). Notamment ils ont généré un « linker » synthétique inducible par la rapamycine. Le linker fonctionne par la présence d'une séquences d'ancrage côté mitochondrial (OMM) via **mAKAP1 (mitochondrial A Kinase Anchoring Protein 1)** fusionnée à une protéine taguée **RFP (Red Fluorescent Protein)** qui forme la première partie du linker (**Figure 35A**), puis une autre séquence ancrée côté RE via la phosphatase **Sac1 (Suppressor of actin mutations 1-like)** couplée elle aussi à une protéine taguée CFP. Ces 2 protéines dimérisent en présence de la rapamycine et forment des contacts artificiels aux zones de contact préexistantes entre la mitochondrie et le RE, mais ceux-ci restent fonctionnels car ils sont le siège de transferts calciques (Csordás et al., 2010). L'effet de la rapamycine doit néanmoins rester aigu pour éviter des effets délétères sur la fonction cellulaire et ce modèle inducible n'est pas nécessairement compatible dans tous les modèles cellulaires. Ils ont développé également des linkers

artificiels (**Figure 35B**) constitutifs, de différentes longueurs, et montré que des contacts trop proches (5nm) diminueraient les transferts calciques alors qu'un linker plus long (10 nm) favoriserait ces transferts. Le bon et le mauvais côté de ces linkers restent néanmoins le côté synthétique de la liaison RE-mitochondrie, car d'une part on s'affranchit des modèles de sous-expression et surexpression protéique, mais d'autre part on court-circuite un système multiprotéique très conservé. Enfin l'induction prolongée des MAMs artificiellement reste à prendre avec précaution car ces mécanismes sont associés à l'apoptose cellulaire ce qui pourrait remettre en question la pertinence de l'utilisation des linkers. De plus en figeant ces interactions, on empêche les mécanismes dynamiques de contact/rupture des MAMs dépendant du statut métabolique de la cellule.

A Linker inducible



B Linker non inducible

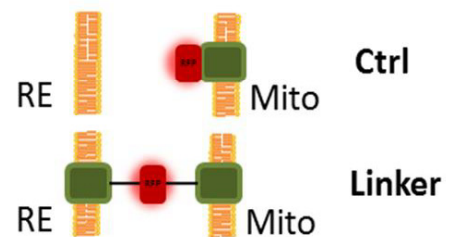


Figure 35 : Schéma représentant le linker inducible et le linker non inducible. A, Schéma illustrant le linker inducible à la rapamycine qui force les contacts entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Csordás et al., 2010). B, Le Linker non inducible nécessite l'utilisation d'une construction « contrôle » (Ctrl) ancrée dans la membrane de la mitochondrie et liée à un fluorophore, le RFP. Le linker non inducible permet la liaison entre le RE et la mitochondrie.

4.4.2) FATE1: Spacer

Récemment, une nouvelle approche pour diminuer les contacts RE-mitochondrie a émergée avec la découverte de FATE1 (Fetal and Adult Testis-Expressed Transcript protein 1). Cette protéine exprimée uniquement dans les testicules est surexprimée dans les contextes cancéreux. Elle joue un rôle dans les mécanismes de fission mitochondriale (Gandre-Babbe and van der Blik, 2008) et a été définie comme un « spacer » (Doghman-Bouguerra et al., 2016) (**Figure 36**). Son expression diminue les contacts RE-mitochondrie

ainsi que les transferts calciques vers la mitochondrie. FATE1 protège également de l'apoptose calcium-dépendante induite par des drogues telles que l' H_2O_2 ou le traitement au C_2 -Ceramide qui génère un stress oxydatif. La présence de FATE1 est permise par son association avec la protéine réticulaire EMD (ER-chaperones and emerlin) et la protéine mitochondriale Mic60/mitofilin. De manière surprenante, FATE1 est retrouvée dans les fractions MAMs, mitochondries « crude » et RE mais pas dans les mitochondries pures, ce qui pourrait s'expliquer par l'insertion en C terminal de FATE1 dans la membrane du RE (Doghman-Bouguerra et al., 2016). Ce nouvel outil pourrait s'avérer utile pour la modulation négative des MAMs et a récemment été utilisé au sein de notre équipe pour valider le rôle des MAMs dans les myotubes (Tubbs et al., 2018).

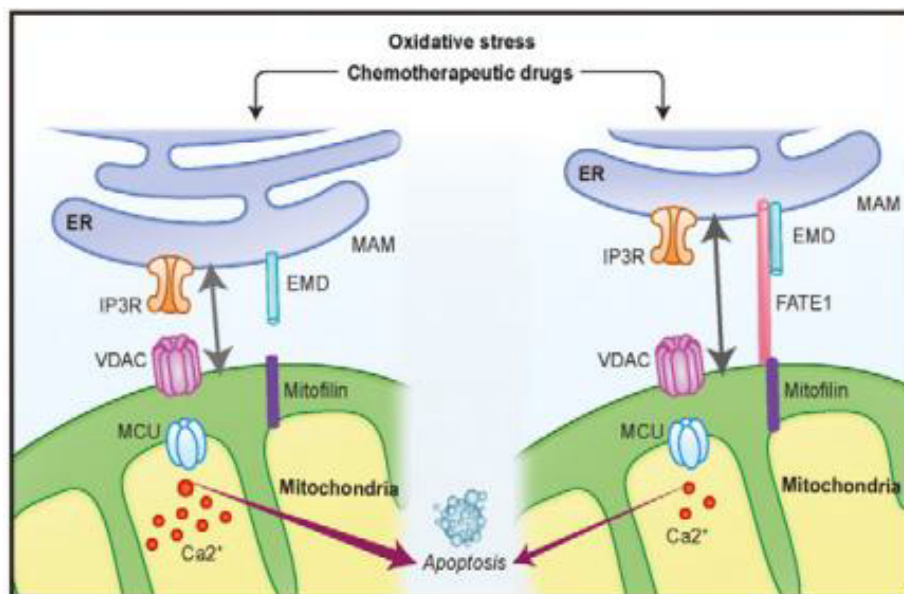


Figure 36 : Image illustrant l'effet de FATE1 sur la distance entre le RE et la mitochondrie. En présence de FATE1 (droite) au niveau des MAMs, les flux calciques entre les 2 organites diminuent, conférant à la cellule une résistance à l'apoptose induite par le stress oxydatif ou par des drogues (Doghman-Bouguerra et al., 2016).

5) Physiopathologie des MAMs

5.1) Pathologies associées aux MAMs

Les MAMs sont aussi impliquées maintenant dans les processus inflammatoires et le développement de nombreuses pathologies, comme les maladies neurodégénératives, le cancer.

5.1.1) Les MAMs dans les processus inflammatoires et les pathologies associées

Les MAMs sont également au cœur des processus inflammatoires. En effet les MAMs sont une plateforme moléculaire importante pour la formation de l'inflammasome **NLRP3 (NOD-like receptor protein 3)**. L'inflammasome NLRP3 est un complexe multiprotéique constitué de la forme inactive de NLRP3, de la protéine **ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain)** et de la pro-caspase-1. Ce complexe se forme en réponse à différents signaux comme des motifs microbiens ou des signaux de dommages cellulaires tels les **DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns)**. A terme, ce complexe permet la maturation de la pro-caspase 1 inactive en caspase 1 active qui permet la maturation et la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou l'IL-18 par les cellules immunitaires. (Missiroli et al., 2018). En outre, les ROS sont aussi capables de promouvoir l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Zhou et al., 2011). Cette étude montre aussi que dans les macrophages lorsqu'on active l'inflammasome, sa localisation passe du RE/cytosol aux MAMs. Ainsi les rapprochements entre le RE et la mitochondrie favorisent la formation de l'inflammasome NLRP3 et place l'inflammasome comme « senseur » de la dysfonction mitochondriale. **Txnip (Thioredoxin-Interacting Protein)**, un partenaire de NLRP3, est également retrouvé aux MAMs en réponse à un stress oxydant (Saxena et al., 2010).

D'autre part les MAMs peuvent prendre part à la réponse antivirale. **MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling protein)** est une protéine localisée à la membrane de la mitochondrie, elle joue un rôle important dans la réponse immunitaire antivirale. MAVS permet ainsi l'activation des voies pro-inflammatoires NF κ B et la production d'interférons pour lutter contre l'infection. Différents partenaires de MAVS permettent d'assurer la réponse anti-virale. On distingue ceux associés aux virus ADN, par exemple l'interaction avec le partenaire réticulaire **STING (Stimulator of Interferon genes)**, de ceux associés avec des virus à ARN, par exemple l'interaction avec **RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene-I)**. Ainsi l'association de STING et/ou RIG-I avec MAVS permet d'activer la réponse anti-virale. Cette liaison a notamment lieu au sein des MAMs (Ishikawa and Barber, 2008). En outre, MAVS interagit également avec Gp78 et peut réguler la réponse antivirale. Les MAMs sont aussi la cible de la réponse immunitaire contre de nombreux virus comme le HIV, le virus de la Dengue ou encore le cytomégalovirus (Missiroli et al., 2018).

Enfin de nombreuses pathologies sont maintenant associées à des processus inflammatoires, comme le diabète, les maladies cardiovasculaires ou encore les pathologies neurodégénératives. Dans ce contexte les MAMs pourraient être une plateforme de mise en place de l'inflammation présente dans ces différentes pathologies.

5.1.2) Les MAMs et les pathologies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont considérées comme des « maladies des organites », il n'est donc pas surprenant que les MAMs jouent un rôle dans le développement de ces pathologies. Il a été rapporté notamment que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson sont associées à une dysfonction des MAMs (Area-Gomez et al., 2009; Cali et al., 2012).

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative associée à la perte des neurones dopaminergique basés dans la *substantia nigra* du cerveau. L'aggrégation de l' α -synucléine joue particulièrement un rôle important dans la dégénération neuronale associée à la maladie de Parkinson (Liu and Zhu, 2017). Son implication précise dans la dégénération neuronale reste cependant peu claire à ce jour. L' α -synucléine a récemment été retrouvée aux MAMs où elle contrôle les transferts calciques vers la mitochondrie en régulant positivement les interactions entre le RE et la mitochondrie (Cali et al., 2012). La mutation de la protéine Parkin est aussi associée au développement de la forme juvénile de la maladie de Parkinson. Parkin est une protéine uprégulée notamment lors du stress du RE. Elle a récemment été retrouvée aux MAMs et sa surexpression favorise les contacts entre le RE et la mitochondrie, ainsi que les transferts calciques (Cali et al., 2013). Enfin d'autres protéines associées au développement de la maladie de Parkinson comme Pink1 et Beclin-1 ont récemment été retrouvées aux MAMs où elles favorisent les interactions entre les organites et l'induction de la mitophagie (Gelmetti et al., 2017).

La maladie d'Alzheimer est la plus commune des pathologies neurodégénératives, elle est caractérisée par une perte de neurones dans l'hippocampe et le cortex cérébral. Cette pathologie se caractérise notamment par l'accumulation de plaques amyloïdes β dans les neurones (Schon and Area-Gomez, 2010). Il existe des formes familiales de la maladie d'Alzheimer associées à différents gènes comme ceux de la [preseline 1 et 2 \(PS1/2\)](#). Des études récentes ont montré que la preseline était enrichie aux MAMs et que la preseline 2

modulait les échanges calciques entre les 2 organites via la modulation des contacts entre le RE et la mitochondrie (Area-Gomez et al., 2009; Zampese et al., 2011). De plus, la génération des plaques amyloïde β dans les neurones est corrélée à une augmentation de l'expression des protéines aux MAMs (Tambini et al., 2016). Les mécanismes moléculaires précis qui entrent en jeu dans l'augmentation de ces contacts et la maladie d'Alzheimer restent néanmoins à être élucidés.

5.1.3) Les MAMs et le cancer

De plus en plus d'arguments montrent que les cellules cancéreuses ont la capacité de remodeler l'homéostasie calcique pour favoriser la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. En outre les mécanismes empruntés par les proto-oncogènes et les suppresseurs de tumeurs pour réguler la survie cellulaire sont dépendants de leurs localisations subcellulaires. Beaucoup de protéines onco-suppressives ont été retrouvées aux MAMs (Marchi et al., 2014). Dans ce contexte, des membres de la famille de Bcl-2 comme **Bok (Bcl-2-related ovarian killer)** ont été trouvés aux MAMs. La surexpression de Bok favorise l'apoptose induite par la formation du pore **Bax/Bak (Bcl-2 associated protein X/Bcl homologous antagonist killer)**, le relargage du cytochrome c. Les oncogènes comme Bcl-2 favorisent les fuites calciques du RE, empêchant la surcharge calcique dans la mitochondrie, la protégeant ainsi de l'apoptose (Filadi et al., 2017b). A l'inverse, la protéine p53 est considérée comme un suppresseur de tumeur de par son activité positive sur la recapture du calcium dans le RE par les pompes SERCA (Giorgi et al., 2015). Ainsi elle favorise l'apoptose induite par les transferts calciques entre les 2 organites. Les MAMs sont donc une plateforme importante pour la régulation de l'homéostasie calcique et une dérégulation de cette plateforme peut conduire les cellules tumorales à prendre le chemin de la survie plutôt que celui de la mort.

5.1) Rôle des MAMs dans l'insulino-résistance hépatique, musculaire et adipocytaire

Les altérations de la mitochondrie et du RE ont été depuis longtemps associées à l'insulino-résistance des tissus périphériques et à la dysfonction de la cellule β pancréatique au cours du développement du diabète de type 2. Très récemment, plusieurs études suggèrent que les MAMs sont régulées par l'apport nutritionnel et pourraient entrer en jeu

dans le développement de l'insulino-résistance notamment hépatique et musculaire (Arruda et al., 2014; Tubbs et al., 2018, 2014).

Le diabète de type 2 appartient à la catégorie des maladies métaboliques et il est caractérisé par une insulino-résistance des tissus périphériques ainsi qu'une altération de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques provoquant, à terme, des hyperglycémies. Dans les tissus périphériques tels que le foie, le muscle ou le tissu adipeux, l'action de l'insuline est centrale pour le contrôle du catabolisme énergétique. L'insuline en se liant à son récepteur active une cascade de phosphorylations, menant à la phosphorylation d'IRS1 ainsi que de la PI3K, et à l'activation de la PKB, permettant ainsi l'adressage à la membrane plasmique des transporteurs GLUT à la membrane et la capture du glucose dans les muscles et le tissu adipeux (cf partie 1) (Cheng et al., 2010; Siddle, 2011). Les mécanismes sous-jacents à l'insulino-résistance restent encore mal compris à ce jour (cf partie 2) et le rôle des MAMs dans le développement de l'insulino-résistance vient tout juste d'émerger.

5.2.1) *Le foie*

Le RE et la mitochondrie sont des senseurs du statut nutritionnel. Au sein de notre équipe, nous avons pu démontrer que le statut nutritionnel (à jeun/nourri) pouvait impacter la structure des MAMs. Notamment, le foie issu de souris nourries présente une diminution des contacts entre le RE et la mitochondrie comparé à des souris à jeun et cette régulation peut être reproduite en donnant à boire à des souris à jeun une solution de sucre (10%) (Theurey et al., 2016). De la même manière dans la lignée d'hépatocytes HuH7, l'exposition aiguë (4h) à de fortes concentrations de glucose (22,5mM Glc) diminue le nombre de MAMs et induit une fission mitochondriale. D'autre part la rupture des contacts entre le RE et la mitochondrie, via un siRNA dirigé contre CypD ou Grp75 (2 protéines aux MAMs), mime les effets du glucose sur la fonction et la dynamique mitochondriale (Theurey et al., 2016). Ces résultats démontrent que les MAMs permettent d'adapter la dynamique et la fonction mitochondriale au statut nutritionnel et plus particulièrement aux concentrations de glucose, faisant des MAMs des senseurs métaboliques dans les hépatocytes.

L'insuline est une hormone clé dans la régulation de la glycémie par les tissus périphériques, et plusieurs protéines de la voie de signalisation d'insuline ont été

dernièrement identifiées aux MAMs. L'Akt ou PKB découle de l'activation du récepteur à l'insuline. L'état de phosphorylation d'Akt est essentiel dans le contrôle de la signalisation de l'insuline. La présence d'Akt aux MAMs (Giorgi et al., 2010) semble réguler l'intégrité des MAMs, en effet les contacts RE-mitochondries sont réduits dans les modèles Akt KO (Betz et al., 2013). L'état de phosphorylation d'Akt semble également aussi réguler les flux calciques entre les 2 organites (Szado et al., 2008; Tubbs et al., 2014). D'autre part, Akt interagit avec de nombreuses protéines, qui peuvent également réguler en retour Akt. La phospho-Akt peut interagir avec IP3R, dont la phosphorylation diminue les flux calciques (Szado et al., 2008). [PTEN \(Phosphatase and Tensin homolog on chromosome 10\)](#) et [mTORC \(mammalian Target Of Rapamycin Complex 2\)](#) sont tous les 2 des régulateurs de l'activité d'Akt et sont localisés aux MAMs (Betz et al., 2013; Bononi et al., 2013). PTEN déphosphoryle Akt pour réduire son activité, il favorise ainsi les transferts calciques de RE vers la mitochondrie. D'une part, mTORC lui régule positivement l'activité d'Akt, et d'autre part, il régule également la phosphorylation de protéines des MAMs comme IP3R ou encore PACS2. De plus, nous avons pu démontrer précédemment dans notre équipe que l'intégrité des MAMs est nécessaire à la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes (Tubbs et al., 2014).

Dans un contexte pathologique comme chez les souris obèses ob/ob ou les souris nourries avec un régime riche en sucre et en graisse ([HFHS, High Fat High Sucrose](#)), notre équipe a pu montrer dans ces modèles une diminution des contacts entre le RE et la mitochondrie. Celle-ci s'accompagne d'une insulino-résistance. *Ex-vivo*, la signalisation d'insuline peut être restaurée par la surexpression de la cyclophiline D (Tubbs et al., 2014). L'altération des contacts RE-mitochondrie *in vitro* et *in vivo* via la modulation de protéines des MAMs (Grp75, Mfn2 ou CypD) induit également une insulino-résistance hépatique (Rieusset et al., 2016; Theurey et al., 2016). Ces résultats sont cependant controversés, Arruda et ses collaborateurs (Arruda et al., 2014) montrent à l'inverse que l'insulino-résistance hépatique des modèles ob/ob et HFD (High Fat Diet) est associée à une augmentation des contacts entre le RE et la mitochondrie, liée à une augmentation des transferts calciques. Ils utilisent également un linker pour forcer artificiellement les contacts entre le RE et la mitochondrie et miment les effets de leurs modèles ob/ob et HFD. Ces discordances pourraient s'expliquer par différents points. Le fond génétique des souris utilisées dans ces modèles est différent, de plus l'étude d'Arruda ne précise pas l'état

nutritionnel des souris ob/ob ou HFD au sacrifice, enfin l'origine du lobe analysé pour mesurer les contacts RE-mitochondrie pourrait différer.

5.2.2) Le muscle

Le muscle est un autre tissu dit insulino-dépendant et donc sensible à l'action de l'insuline. C'est le site principal de l'insulino-résistance lors du développement du diabète de type 2, car il est responsable de 75% de l'utilisation de glucose en réponse à l'insuline (Cheng et al., 2010; Siddle, 2011). Notre équipe a récemment évalué l'impact de la rupture des MAMs dans le développement de l'insulino-résistance musculaire. Nous avons pu démontrer comme dans le foie que l'intégrité des MAMs était essentielle à la mise en place d'une réponse correcte à l'insuline. D'autre part, les muscles squelettiques de souris obèses (ob/ob ou HFHS) présentent une rupture des contacts entre le RE et la mitochondrie. De manière intéressante, ce résultat a été retrouvé dans les myotubes humains rendus insulino-résistants par un traitement au palmitate et dans les myotubes de patients obèses et/ou diabétiques de type 2 comparés à des myotubes de sujets sains. Enfin, diminuer les contacts mitochondrie-RE par la surexpression du spacer FATE1 est suffisant pour induire une insulino-résistance musculaire *in vitro* dans les myotubes humains et *in vivo* dans le muscle de souris (Tubbs et al., 2018). Ces résultats placent les MAMs comme de potentielles cibles thérapeutiques originales pour restaurer la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques de patients atteints de diabète de type 2, mais nécessitent de plus amples études pour comprendre les mécanismes moléculaires.

5.1.3) Le tissu adipeux

Le rôle des MAMs dans la fonction ou la dysfonction du tissu adipeux a suscité peu d'intérêt à ce jour. Seulement, deux études se sont intéressées au rôle d'une protéine des MAMs [Cisd2 \(CDGSH iron-sulfur cluster-containing protein 2\)](#) dans la régulation de l'homéostasie calcique et la sensibilité à l'insuline dans ce tissu (Chen et al., 2009; Wang et al., 2014). Cisd2 est une protéine associée au syndrome de Wolfram, une pathologie génétique neurodégénérative grave associant un diabète insulino-dépendant, une atrophie optique, une surdité de perception. Cisd2 est située à la fois au niveau du RE et de la mitochondrie. Ils ont pu montrer que Cisd2 interagit avec [Gimap5 \(GTPase Immuno associated protein 5\)](#) aux MAMs et régule l'entrée de calcium dans la mitochondrie dans

l'adipocyte. D'autre par le KO de *Cisd2* provoque une diminution de la sensibilité à l'insuline associée à une dysfonction mitochondriale. Des études plus poussées sur le rôle des MAMs dans l'insulino-résistance et l'homéostasie glucidique du tissu adipeux sont nécessaires.

5.3) Rôle des MAMs dans la cellule β pancréatique

Le rôle et le phénotype des MAMs dans la cellule β n'ont pas à ma connaissance été encore explorés, exceptés au sein de notre équipe (équipe 3, CarMeN, U1060). Cette étude a pu montrer que la lipotoxicité induite par le palmitate diminue les contacts entre le RE et la mitochondrie (PLA, dirigé contre IP3R1-VDAC1) dans un modèle de cellules β de souris MIN6B1 (Thivolet et al., 2017). Cette diminution est accompagnée d'une augmentation de l'expression de différents marqueurs du stress du RE, ainsi que d'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Elle a pu également montrer, sur des coupes de pancréas de patients atteints de diabète de type 2, une diminution des contacts entre les 2 organites (PLA, dirigé contre IP3R2-VDAC1) spécifiquement dans les cellules β pancréatiques. Néanmoins, aucune information n'a été apportée quant au rôle des MAMs dans la physiologie, la dysfonction β ou le développement du diabète de type 2, ces observations restent phénotypiques. C'est dans ce contexte que nous avons eu pour objectif de mieux comprendre dans la cellule β pancréatique le rôle de ces contacts en condition physiologique ou physiopathologique, en réponse à un traitement aigu ou chronique avec des concentrations élevées de glucose mimant un diabète de type 2.

RESULTATS

Je présente dans une première partie ce qui correspond à l'essentiel du travail fourni durant ma thèse, c'est à dire l'étude de l'effet de la glucotoxicité sur la structure/fonction des MAMs dans la cellule β pancréatique (**Partie 1**). Je présente ensuite des résultats originaux que j'ai obtenus sur le même modèle, complémentaires de la partie 1 (**Parties 2-3**). Enfin, je présente les résultats obtenus en collaboration avec Roméo Cassel, le précédent étudiant en thèse, sur les effets de la lipotoxicité en relation avec la modulation du translocon dans la cellule β (**Partie 4**).

Partie 1 : Rôle des MAMs dans la dysfonction β pancréatique associée à la glucotoxicité

1) Résumé

2) Article n°1 :

Differential effect of glucose on ER-mitochondria Ca^{2+} exchange participates to insulin secretion of β cells and to glucotoxicity-mediated dysfunction.

Florian Dingreville, Baptiste Panthu, Charles Thivolet, Sylvie Ducreux, Yves Gouriou, Sandra Pesenti, Marie-Agnès Chauvin, Elisabeth Errazuriz-Cerda, Fabien Van Coppenolle, Jennifer Rieusset and Anne-Marie Madec.

Soumis à « Diabetes », Octobre 2018

**Partie 2 : Etude de l'effet de la glucotoxicité sur les oscillations calciques cytosoliques.
(Données non publiées)**

Partie 3 : Etude de la sous-expression de différentes protéines des MAMs : Mfn2, Grp75, CypD (Données non publiées)

Partie 4 : Rôle protecteur de la modulation du translocon dans les effets délétères de la lipotoxicité.

1) Résumé

2) Article n°2 :

Protection of human pancreatic islets from lipotoxicity by modulation of translocon.

Cassel R, Ducreux S, Alam MR, **Dingreville F**, Berlé C, Burda-Jacob K, Chauvin MA, Chikh K, Païta L, Al-Mawla R, Crola Da Silva C, Rieusset J, Thivolet C, Van Coppenolle F, Madec AM.

PLoS One. 2016

Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité.

1) Résumé

-Introduction

Les cellules β pancréatiques sont des senseurs du glucose et ajustent la sécrétion d'insuline à la glycémie. Le RE et la mitochondrie sont 2 acteurs clés impliqués dans la mise en conformation de l'insuline, ainsi que la production d'ATP en réponse au glucose. De plus, ces organites contrôlent la dynamique calcique intracellulaire. Le diabète de type 2 se caractérise par une incapacité de la cellule β à produire suffisamment d'insuline en réponse au glucose à cause d'une perte de fonction et de masse β pancréatique. Un des mécanismes sous-jacents au développement du diabète de type 2 est l'exposition chronique à des fortes concentrations de glucose, appelée glucotoxicité. La glucotoxicité altère la sécrétion d'insuline et les défauts fonctionnels de la mitochondrie et du RE ont été largement décrits comme étant impliqués dans cet effet. Ces 2 organites possèdent des interactions structurelles et fonctionnelles appelés MAMs et sont associés à des échanges lipidiques et calciques pour réguler la bioénergétique mitochondriale. Le rôle des MAMs dans les maladies métaboliques émerge ces dernière années, cependant leur rôle dans la cellule β n'a à ce jour jamais été étudié.

-Matériels et méthodes

Nous avons effectué une exposition chronique d'une lignée de cellules β pancréatiques d'insulinome de rat (INS-1E) ou des îlots humains avec des concentrations élevées de glucose pour induire une glucotoxicité modérée. Nous avons ensuite évalué les effets de cette glucotoxicité sur des marqueurs du stress du RE, l'homéostasie calcique, la respiration mitochondriale ainsi que la sécrétion d'insuline. Nous avons aussi déterminé l'effet de la glucotoxicité sur l'intégrité structurelle et fonctionnelle des MAMs. Nous avons analysé la fréquence des MAMs par PLA et MET et microscopie électronique, alors que la fonctionnalité a été étudiée via des sondes calciques spécifiques du RE et de la mitochondrie et par stimulation du transfert calcique via l'ATP. La dynamique mitochondriale a été

analysée via des marquages mitochondriaux au mitotracker et des marquages OXPHOS. Nous avons aussi modulé les MAMs soit via une stimulation aigüe au glucose, soit par l'utilisation d'un siRNA GRP5 qui rompt partiellement les contacts entre le RE et la mitochondrie ou par l'utilisation d'un linker qui artificiellement force ces contacts.

-Résultats

Dans cet article, nous avons montré qu'une stimulation aigüe au glucose est capable d'augmenter les contacts RE-mitochondrie ainsi que le transfert calcique entre les 2 organites. D'autre part, la rupture des contacts via la sous-expression de Grp75 altère la sécrétion d'insuline, pointant un rôle important du couplage RE-mitochondrie dans la sécrétion d'insuline. D'autre part, comme attendu, la glucotoxicité induit une altération de la sécrétion d'insuline associée à une dysfonction mitochondriale et un stress du RE. De manière surprenante, la glucotoxicité est associée également à une augmentation des MAMs ainsi qu'une diminution des quantités de calcium réticulaire. Cette augmentation n'est cependant pas fonctionnelle car le transfert calcique entre les 2 organites est bloqué, malgré une accumulation de calcium dans la mitochondrie. D'autre part, la glucotoxicité induit une fission mitochondriale qui est corrélée à une augmentation de calcium dans les mitochondries fissionnées. Enfin, l'induction artificielle des MAMs par le linker mime les effets de la glucotoxicité en altérant la sécrétion d'insuline. De manière intéressante, les cellules β arborent un aspect similaire à celui observé en contexte de diabète de type 2 avec des mitochondries gonflées et un réticulum endoplasmique dilaté.

-Conclusion

En conclusion, nous avons pu démontrer le rôle important des MAMs dans la sécrétion d'insuline et dans la dysfonction β pancréatique liée à la glucotoxicité. Les mécanismes adaptatifs précis entrant en jeu dans le défaut de transfert calcique restent à élucider. Ils pourraient être associés à la diminution des stocks calciques liés au stress du RE, mais pourraient aussi être imputables au stress oxydant mitochondrial.

2) Article 1

Differential effect of glucose on ER-mitochondria Ca^{2+} exchange participates to insulin secretion of β cells and to glucotoxicity-mediated dysfunction.

Florian Dingreville¹, Baptiste Panthu¹, Charles Thivolet^{1,2}, Sylvie Ducreux¹, Yves Gouriou¹, Sandra Pesenti¹, Marie-Agnès Chauvin¹, Elisabeth Errazuriz-Cerda³, Fabien Van Coppenolle¹, Jennifer Rieusset^{1*} and Anne-Marie Madec^{1*}

¹ Univ Lyon, CarMeN laboratory, INSERM, INRA, INSA, Lyon, Université Claude Bernard Lyon1 (69121, OULLINS, FRANCE)

² Hospices Civils de Lyon, Department of Endocrinology and Diabetes, Hopital Lyon Sud, 69310, Pierre-Bénite, France

³ CIQLE, Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: Anne-Marie MADEC and Jennifer RIEUSSET

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

Phone number: 33 (0)4 26 23 59 20, Fax: 33 (0)4 26 23 59 16

E-mails: anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr
jennifer.rieusset@univ-lyon1.fr

Word count: 4000

Number of Figures: 7

Short running title: Organelle miscommunication and β cell function

ABSTRACT

Glucotoxicity-induced β cell dysfunction in type 2 diabetes is associated with alterations of mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). Both organelles interact at contact sites, defined as mitochondria-associated membranes (MAMs), which were recently implicated in the regulation of glucose homeostasis. The role of MAMs in β cells is still largely unknown and their implication in glucotoxicity-associated β cell dysfunction remains to be defined. Here, we report that acute glucose stimulation stimulated ER-mitochondria interactions and calcium (Ca^{2+}) exchange in INS-1E cells, whereas disruption of MAMs altered glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Conversely, chronic incubations with high glucose of either INS-1E cells or human pancreatic islets altered GSIS, and concomitantly reduced ER Ca^{2+} store, increased mitochondrial Ca^{2+} and reduced ATP-stimulated ER-mitochondria Ca^{2+} exchanges, despite an increase of organelle interactions. Furthermore, glucotoxicity-induced perturbations of Ca^{2+} signalling are associated with ER stress, altered mitochondrial respiration and mitochondria fragmentation, and these organelle stresses may participate to increased organelle tethering, as a protective mechanism. Lastly, sustained induction of ER-mitochondria interactions using a linker induced mitochondrial fission and altered GSIS. Therefore, dynamic organelle coupling participates to GSIS in β cells and over-time disruption of organelle Ca^{2+} exchange might be a novel mechanism contributing to glucotoxicity-induced β cell dysfunction.

INTRODUCTION

Pancreatic β cells are glucose-sensors adjusting insulin secretion to glycaemia via a triggering pathways including glucose oxidation by glycolysis and Krebs cycle, an increase in the cytosolic ATP/ADP ratio, closing ATP-sensitive K^+ channels, membrane depolarization, opening of voltage-dependent calcium (Ca^{2+}) channels, increase in cytosolic Ca^{2+} and exocytosis of insulin (1,2). Importantly, mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) play a crucial role in this process, as glucose-derived mitochondrial metabolism regulates insulin release by increasing ATP/ADP ratio (3) and ER controls the synthesis, correct folding and sorting of insulin in response to glucose (4). Furthermore, both ER and mitochondria control Ca^{2+} dynamics by regulating Ca^{2+} uptake and release from/into intracellular organelles.

β cell dysfunction is a major feature of type 2 diabetes (T2D), characterized by the incapacity to product sufficient amounts of insulin to control glycaemia due to a progressive decrease of both β cell function and mass. Repeated or sustained exposure of β cells to supra-physiological glucose levels, referred as glucotoxicity, contributes to β cell dysfunction during T2D (5). Particularly, chronic exposure of β cells or pancreatic islets to high glucose (HG) concentrations impairs their glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and decreases the processing of insulin (6). Interestingly, mitochondria dysfunction (7) and ER stress (8) as well as perturbations of Ca^{2+} homeostasis (9), have been largely associated with glucotoxicity-mediated β cell dysfunction, highlighting the crucial role of these two organelles in T2D-related β cell failure. Particularly, changes in mitochondria structure (10), decreased mitochondrial respiration (11), reduced mitochondrial ATP production (12) and altered mitochondria dynamics (13) underlies glucotoxicity-mediated β cell dysfunction. In addition, ER Ca^{2+} depletion (9) and activation of the unfolded protein response (UPR) (8) are associated with glucotoxicity-induced β cell dysfunction.

Interestingly, both organelles interact structurally and functionally at specific contact sites, called mitochondria-associated membranes (MAMs), in order to exchange phospholipids and Ca^{2+} and to regulate mitochondrial bioenergetics, then impacting several cellular pathways (14). Different physio-pathological roles of MAMs start to emerge, especially in metabolic diseases. Indeed, MAMs appear as new hubs of insulin signalling and glucose sensing, playing a key role in the control of glucose homeostasis (15). We recently demonstrated that MAMs controlled insulin action in both the liver (16) and skeletal muscle (17), and that organelle miscommunication was associated with insulin resistance in various mice models of obesity and T2D (16–18). Importantly, we also evidenced a disruption of organelle interactions in β cells of type 2 diabetic patients and in palmitate-treated

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

MIN6-B1 cells (19), suggesting a potential implication of MAMs in β cell dysfunction. Nevertheless, the direct role of MAMs in glucotoxicity-associated β cell dysfunction is unknown.

The aim of the present study was therefore to clarify the role of MAMs in regulating insulin secretion by β cells and to investigate whether MAM alterations could contribute to the mechanisms of glucotoxicity-mediated β cell dysfunction. Here we evidence, in both pancreatic β cell line and human pancreatic islets, a differential regulation over time of ER-mitochondria Ca^{2+} exchange in response to HG representing a continuum from a positive response to stimulate insulin secretion to a deleterious outcome participating to the progressive glucotoxicity-associated β cell failure.

MATERIAL AND METHODS

Culture of INS-1E cells

Rat pancreatic INS-1E β cells were cultured as previously described (20). INS-1E cells were treated with either 11 mmol/L or 22.5 mmol/L glucose for 30 minutes (mn), 48 hours (h) or 72h. INS-1E cells were also treated with either 0.5 μ g/ml tunicamycin (Sigma) for 24h or with 2 μ mol/L oligomycin (Sigma) for 1h. INS-1E cells were transfected for 72h with a cocktail of 3 Grp75-specific siRNA (Quiagen, 20 μ mol/L) using DharmaFeCT duo (Dharmacon). Cells were transfected for 48h using DharmaFeCT duo, with 2 μ g of mAKAP1-mRFP-yUBC6 plasmid (Linker) and mAKAP1-mRFP plasmid (pcDNA Ctrl) (21). RFP fluorescence of plasmids at 558 nm was used to sort cells (FACS aria, BD Bioscience).

Culture of human pancreatic islets

Human pancreatic islets from 7 non-diabetic donors (Supplementary Table 1) were obtained through the Geneva European Consortium for islet transplantation (ECIT). Islets were processed and cultured as previously described (9). Islets were cultured either in 5.5 mmol/L or in 16.5 mmol/L glucose during 48h. For imaging analysis, islets were mechanically dissociated in order to obtain single cells and specifically analyse insulin-positive cells.

Glucose-stimulated insulin secretion

Cells were kept at 37°C for 2h in Krebs-Ringer bicarbonate Hepes buffer (KRBH) containing 0.1% BSA and 5.5 mmol/L glucose for pre-incubation, incubated 1 hour with 5.5 mmol/L glucose and then further challenged with 22.5 mmol/L glucose for 1h to assess GSIS. Insulin was measured on culture medium by ELISA (ALPCO) for INS-1E cells or by a highly specific immunoradiometric assay for human islets (9) and normalized by protein levels. Results are expressed as the fold of insulin secretion.

Transmission electronic microscopy (TEM)

Cell fixation, post-treatments, and image acquisition, were performed as previously described (9). Mitochondria and ER were delimited using ImageJ and the fraction of mitochondrial membrane in contact with ER within a 50nm range was calculated and normalized to mitochondria perimeter, and expressed as total percent of contact between mitochondria and ER. Another calculation of the total percent of contact was also made according to different ranges of distance between both organelles, as previously described (22)

In situ proximity ligation assay (PLA)

ER-Mitochondria interactions were assessed by *in situ* PLA, as previously described and thoroughly validated (16,23), by targeting two organelle-surface proteins, VDAC1 and IP3R2 (19). For human islets, *in situ* PLA were performed in parallel of insulin immunofluorescence labelling (Dako, 1/500) and blobs per nucleus were quantified only in labelled β cells.

Organelle specific Ca^{2+} content

To quantify either mitochondrial or ER Ca^{2+} content, we used the ratiometric Ca^{2+} probe plasmids encoding the 4mtD3CPV (24) or erGAP1 (25) biosensors, respectively. 48h or 72h post-transfection, cells were washed and incubated in Ca^{2+} -free KRBH buffer. Measurements were performed using a wide field Leica DMI6000B microscope equipped with a 40x objective and an Orca-Flash4.0 digital camera (HAMAMATSU). Cells were treated either with 1 $\mu\text{mol/L}$ Na-ATP (Sigma) in order to stimulate Ca^{2+} transfer from ER to mitochondria or with 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin (TG, Sigma) to release ER Ca^{2+} stock. Fluorescence ratio was analysed with MetaFluor 6.3 (Universal imaging) and normalized by the fluorescence at the origin (F/F₀).

Mitochondrial oxygen consumption

Cells were pelleted and resuspended in 100 μl KRBH supplemented with 0.5% BSA and 11 mmol/L glucose. Oxygen consumption was measured at 37°C using a Clark-type electrode (Strathkelvin Instruments). Oligomycin (10 $\mu\text{g/mL}$) was added in order to analyse resting oxygen consumption linked to non-phosphorylated mitochondrial activities.

Mitochondrial DNA analysis

The content of **mitochondrial DNA (mtDNA)** was calculated using real-time PCR by measuring the threshold cycle ratio of a mitochondrial gene COX1 (rat INS-1E) or COX2 (human islets) versus a nuclear gene (cyclophilin A), as previously described (26).

Mitochondrial dynamics analysis

Mitochondrial network was analysed as previously described (27), either using MitoTracker (500 nmol/L, 20mn, Invitrogen) for INS-1E cells or by performing immunofluorescence labelling, using both OXPHOS (Molecular probesTM, 1/400) and insulin (Dako, 1/500) primary antibodies to specifically assess β cells. Fluorescent images were analysed using ImageJ, and circularity ($4*\pi*area/perimeter^2$) and length of major and minor axis were measured in order to calculate **form factor (FF)**, opposite of circularity) and **aspect ratio (AR)**, major axis/minor axis).

RT-qPCR

Total RNAs were extracted with the TRI-Reagent Solution (Sigma). Levels of target mRNAs were measured by reverse transcription (PrimeScript RT, Takara), followed by real-time PCR using a Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Research). **TATA-binding protein (TBP)** mRNA was quantified as a reference gene. The list of primers is given in Supplementary Table 2.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. Differences between groups were tested with paired Student t-test. Mann and Whitney test was applied when values were not normally distributed. Statistical significance was accepted when $p < 0.05$.

RESULTS

Dynamic increase of structural and functional ER-mitochondria interactions by high glucose participate to GSIS in β cells

We investigated the role of MAMs in the acute regulation of GSIS in the rat pancreatic beta cell line INS-1E. For that, we analysed ER-mitochondria interactions and Ca^{2+} exchange after 30 minutes of glucose challenge (22.5mmol/L), known to stimulate GSIS (28). MAM integrity was analysed using *in situ* PLA by targeting VDAC1-IP3R2 proximity (19), in INS-1E cells treated with both 11mmol/L (Ctrl) and 22.5mmol/L of glucose (HG). As shown in Figure 1A, a 30mn exposure of INS-1E cells with HG increased VDAC1-IP3R2 interactions compared to Ctrl cells. We then investigated the effects of HG on MAM function, by analysing both basal and ATP-stimulated ER-mitochondria Ca^{2+} transfer of INS-1E cells using the mitochondrial selective calcium fluorescent probe 4mtD3cpv (Figure 1B) (24). Figure 1C illustrates representative curves of intra-mitochondrial Ca^{2+} following ATP stimulation, that induces the IP3-mediated mobilization of Ca^{2+} stores (29), in both Ctrl- and HG-treated INS-1E cells. Quantitative analysis showed that HG significantly increased both basal mitochondrial Ca^{2+} content (Figure 1C-D) and ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation (Figure 1C and 1E). Altogether, these data suggest that insulin secretion upon HG stimulation may require dynamic ER-mitochondria Ca^{2+} exchange.

To validate this assumption, we explored whether the reduction of ER-mitochondria interactions, by silencing Grp75 as previously performed (16,17), can alter GSIS in INS-1E cells. We validated that silencing of Grp75 using specific siRNA reduced GRP75 protein expression (Figure 1F) and disrupted ER-mitochondria interactions, as illustrated by the reduction of VDAC1-IP3R2 interactions by *in situ* PLA (Figure 1G). Importantly, Grp75-mediated disruption of MAMs significantly altered GSIS in INS-1E cells (Figure 1H), pointing that organelle coupling is a new component regulating GSIS in β cells.

Glucotoxicity increases ER-mitochondria interactions, but dampens organelle Ca^{2+} exchange in β cells

Next, we investigated the effects of chronic HG concentrations (glucotoxicity) on ER-mitochondria interactions and Ca^{2+} transfer both in INS-1E cells and human pancreatic islets, after 48h and/or 72h incubation times. We first validated that exposure of INS-1E cells to HG significantly

reduced GSIS, compared to Ctrl cells, after both 48h (Figure 2A) and 72h (Supplementary Figure 1A) of treatment. As shown in Figure 2B, a 48h HG treatment significantly increased ER-mitochondria contacts, as illustrated by the upregulation of VDAC1-IP3R2 interactions. This result was confirmed by TEM analysis, as we observed a significant increase of the percentage of ER adjacent to mitochondria in a 50nm range in 48h HG-treated INS-1E cells (Figure 2C-D). Specifically, only the 10-20 and 20-30 nm ranges of distance between both organelles were significantly increased by HG (Figure 2E), whereas the number of mitochondria per field was not modified (Figure 2F). Similar effects were observed after longer HG treatment, using both *in situ* PLA (Supplementary Figure 1B) and TEM (Supplementary Figure 1C-F). Importantly, we confirmed in human pancreatic islets, a more physiological model, that glucotoxicity-mediated β cell dysfunction (Figure 2G) is also associated with increased ER-mitochondria interactions, measured by both *in situ* PLA (Figure 2H) and TEM (Figure 2I-K) in insulin-positive cells. Once again, only the smallest range of contacts between both organelles were significantly increased by HG in human islets (Figure 2K), without modification of mitochondria amount (Figure 2L). Therefore, glucotoxicity-mediated β cell dysfunction is associated with an increase of ER-mitochondria contact sites.

We then investigated in INS-1E cells the effects of glucotoxicity on ER-mitochondria Ca^{2+} exchange. Figure 3A and 3D illustrate representative curves of intra-mitochondrial Ca^{2+} following ATP stimulation in both Ctrl and HG-treated INS-1E cells after 48h and 72h of treatment, respectively. Quantitative analysis showed that HG significantly increased basal mitochondrial Ca^{2+} content in INS-1E cells only after 72h (Figure 3E), whereas the effect was not significant after 48h (Figure 3B). Importantly, ATP-stimulated Ca^{2+} mitochondrial accumulation was significantly and drastically reduced under HG both at 48h (Figure 3C) and 72h (Figure 3F). Altogether, these data indicate that glucotoxicity-mediated β cell dysfunction is associated with altered IP3R-mediated Ca^{2+} transfer into the mitochondria, despite an increase of MAM contact points.

Glucotoxicity depletes ER Ca^{2+} content in β cells

As glucose stimulus is an acute signal increasing organelle interactions and Ca^{2+} exchange, we reasoned that sustained glucose stimulation over time could alter Ca^{2+} transfer from ER to mitochondria by depleting ER Ca^{2+} stock. Therefore, we measured ER Ca^{2+} content after transfection of INS-1E cells with the aequorin-based fluorescent erGAP1 vector (25) (Figure 4A), both at basal state and following Tg-induced emptying of reticular Ca^{2+} stock. Figure 4B and 4E illustrate representative curves of ER Ca^{2+} content following TG-stimulation (1 $\mu\text{mol/L}$), a non-competitive

inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase that deplete almost all ER Ca^{2+} stores, in INS-1E cells after both 48h and 72h of HG treatment, respectively. Quantitative analysis showed that HG significantly reduced basal ER Ca^{2+} content after both 48h (Figure 4C) and 72h (Figure 4F) of treatment. Following Tg-stimulation, ER Ca^{2+} content was significantly reduced in HG condition after 72h (Figure 4G), whereas no significant difference was observed after 48h (Figure 4D). Therefore, HG induces ER Ca^{2+} depletion in INS-1E cells, hence impacting the capacity of reticular Ca^{2+} release over time, and this defect may participate to HG-mediated disruption of organelle Ca^{2+} exchange.

Glucotoxicity-mediated β cell dysfunction is associated with ER stress and mitochondrial dysfunction

As modification of organelle Ca^{2+} stores may stress both ER and mitochondria (30), we then analysed consequences of glucotoxicity on both ER stress and mitochondrial function, both in rodent and human β cells. ER stress was assessed by measuring mRNA levels of key markers of the UPR. We found that HG only significantly increased [activating transcription factor 4 \(ATF4\)](#) mRNA levels after both 48h (Figure 5A) and 72h (Supplementary Figure 2A) in INS-1E cells. Interestingly, ER stress was more marked in human pancreatic islets, as 48h-HG treatment significantly increased mRNA levels of 78 kDa glucose-regulated protein, ATF4 and spliced X-box binding protein 1 (Figure 5B). As mitochondria function, we measured basal mitochondrial oxygen consumption in intact cells, both in INS-1E cells and human islets. As shown on Figure 5C, 48h HG treatment of INS-1E cells significantly reduced basal respiration, as well as coupled respiration, without change in proton leak measured in presence of oligomycin. More pronounced effects were observed in INS-1E cells treated by HG during 72h (Supplementary Figure 2B). In human pancreatic islets, HG significantly decreased basal mitochondrial oxygen consumption but did not affect both proton leak and coupled respiration (Figure 5D).

To determine whether HG-mediated organelle stresses could participate to increased organelle tethering as a protective mechanism to restore organelle homeostasis, we induced either ER stress with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tunicamycin for 24h (inhibitor of the synthesis of N-linked glycoproteins that is classically used to induce ER stress, Figure 5E) or mitochondrial stress with 2 μM oligomycin for 2h (blocker of proton transfer during mitochondrial respiration, Figure 5G), and measured repercussions on ER-mitochondria interactions. Importantly, we found that both tunicamycin (Figure 5F) and oligomycin (Figure 5H) treatments increased VDAC1-IP3R2 interactions in INS-1E cells, suggesting

that glucotoxicity-associated increase of organelle tethering could be secondary to organelle stresses.

Glucotoxicity is associated with mitochondrial fission linked to mitochondrial Ca^{2+} accumulation in β cells

To characterize the effects of HG on mitochondrial network, we measured AR and FF parameters of labelled mitochondria in both rat and human β cells. Consistent with previous reports (31), HG induced mitochondrial fragmentation in INS-1E cells, with a significant decrease of both AR and FF after 48h of treatment (Figure 6A-C), without change in mtDNA amounts (Figure 6D). We further categorized and quantified mitochondria into “tubules”, “fragments”, and “intermediates”, as previously described (28). In resting conditions, majority of mitochondria are in a tubule and intermediate states (Figure 6E), whereas mitochondria became short and fragmented upon 48h of HG incubation, (Figure 6E). Similar effects of HG were observed in INS-1E cells after 72h of treatment (Supplementary Figures 2C-G). Importantly, we found consistent results in human pancreatic β cells, as 48h HG reduced both AR and FF parameters (Figure 6F-H) without modifications of mtDNA amounts (Figure 6I), and increased the percentage of fragmented mitochondria (Figure 6J). Overall, these data demonstrate that HG switches mitochondrial network from a tubular shape to fragmented pattern in both rat and human β cells.

We then analysed with R software whether HG-mediated mitochondrial fission was linked to intra-mitochondrial Ca^{2+} accumulation, by creating a correlogram between both basal and ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation (ATP response), and AR and FF from Ctrl/HG-stimulated INS-1E cells (Figure 6K). As expected, we found that AR was significantly and positively correlated with FF (Supplementary Figure 3A), whereas basal mitochondrial Ca^{2+} content was negatively, but not significantly, correlated with ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation (Supplementary Figure 3B). Importantly, basal mitochondrial Ca^{2+} was significantly and negatively correlated with both AR and FF parameters (Supplementary Figures 3C-D, respectively), indicating that the more mitochondria have high Ca^{2+} levels the more they are fragmented. Inversely, ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation was significantly and positively correlated with both AR and FF parameters (Supplementary Figures E-F), indicating that mitochondria with disrupted Ca^{2+} transfer from ER were the most fragmented. Altogether, these data suggest that mitochondria dynamics is closely regulated by mitochondrial Ca^{2+} dynamics under chronic HG challenge.

Induced ER-mitochondria tethering by a synthetic linker leads to mitochondrial fragmentation and altered GSIS

To mechanistically connect sustained organelle communication with dysregulation of mitochondrial dynamics and β cell function over time, we used a recombinant construct encoding a red-fluorescent synthetic linker increasing ER-mitochondria tethering (21). TEM analysis (Figure 7A) confirmed that the linker expression significantly increased the surface of organelle contacts in fluorescence-sorted INS-1E cells (Figure 7B-C). Interestingly, the enhancement of organelle contacts affects all distances of contacts (Figure 7D) without changing mitochondrial number (Figure 7E). We then measured 48h later the repercussions on mitochondrial network and GSIS. As shown on Figure 7F, enhancement of organelle contacts induced mitochondrial fragmentation, as illustrated by the reduction of both AR and FF parameters in red INS-1E cells (Figure 7F-H). Importantly, the reinforcement of organelle tethering by the overexpression of the linker significantly reduced GSIS in INS-1E cells (Figure 7I). Altogether, these data confirm the important role of MAMs in the control of mitochondria dynamics and β cell function.

DISCUSSION

MAMs were involved in the control of insulin action (16–18,29) and disruption of MAMs were observed in pancreatic islets from donors with type 2 diabetes (19). Therefore, MAMs could be an important intra-cellular marker reflecting the capacity to fulfill insulin needs, and playing an important role in regulating glucose homeostasis (32). However, the role of MAMs in both β cell function and glucotoxicity-induced dysfunction remained largely unknown. In the present study, we pointed out in rodent and human *in vitro* models a time-dependent regulation of ER-mitochondria communication by glucose, starting from an acute induction of MAM structure and function by glucose towards a chronic disruption of organelle Ca^{2+} exchange, linked to an emptying of ER Ca^{2+} store, which likely progressively participates to both ER stress and mitochondrial fission and ultimately to altered GSIS.

Here, we newly identified that acute glucose stimulation of INS-E1 cells stimulates ER-mitochondria interactions and Ca^{2+} exchange, in parallel to insulin secretion. Furthermore, we demonstrated that Grp75-mediated disruption of MAMs alters GSIS in INS-1E cells, pointing that organelle coupling is a new regulator of insulin secretion by β cells. As Ca^{2+} signalling at MAMs was reported to control mitochondrial bioenergetics (33), it is likely that this regulation participates to the stimulation of mitochondrial ATP production, required to stimulate insulin release. Thus, dynamic increase of MAMs by transient exposure to HG is a new factor participating in GSIS, and has a beneficial effect on pancreatic β cells.

However, as often happens, critical processes in physiology can promote disease in chronic situations. We further demonstrated that glucotoxicity-associated β cell dysfunction also increased organelle tethering, but blunted ER-mitochondria Ca^{2+} transfers over time. Furthermore, glucotoxicity is also associated with an increase of basal Ca^{2+} mitochondrial content and a reduction of ER Ca^{2+} stores over time, suggesting profound perturbations of Ca^{2+} signalling. Therefore, we propose that chronic HG stimulation empties the ER, due to the prolonged organelle Ca^{2+} exchange, leading to increased mitochondrial Ca^{2+} accumulation and reduced Ca^{2+} transfer to mitochondria over time. Of course, we cannot exclude at this stage that other mechanisms participate to both glucotoxicity-mediated disruption of organelle Ca^{2+} exchange (i.e. alterations in IP3 signalling or in the structure/activity of the Ca^{2+} channelling complex) and mitochondrial Ca^{2+} accumulation (i.e. direct import from cytoplasm) in β cells.

As expected, glucotoxicity-related β cell dysfunction is also associated with ER stress and altered mitochondrial function and dynamics in both rodent and human β islets, in agreement with structural alterations of both organelles in β cells of type 2 diabetic islets (34). Even it is unclear from our study whether these intracellular changes are interrelated and what are the underlying molecular mechanisms, our data suggest that glucotoxicity-associated mitochondrial fission could be linked to mitochondrial Ca^{2+} accumulation as the more mitochondria increase their Ca^{2+} contents the more they are fragmented. Interestingly, both acute and hyperactivation of both UPR signalling and mitochondrial fission can also have beneficial and detrimental effects, respectively, on β cell function, as observed here for Ca^{2+} fluxes at MAM interface. Indeed, acute HG treatment induced mild UPR signalling activating IRE1 α leading to glucose-induced insulin biosynthesis, whereas chronic HG stimulation caused hyperactivation of IRE1 α , leading to the suppression of insulin expression (35). Similarly, transient HG-induced mitochondrial fission is required for optimal GSIS (28), whereas we and others (31) found that glucotoxicity induced mitochondrial fragmentation.

Furthermore, synthetic ER-mitochondria linker that artificially increased ER-mitochondria interactions also induced mitochondria fission and altered GSIS in β cells, suggesting that sustained organelle tethering is detrimental for β cell function. It is likely that reinforcement of organelle interactions also empties the ER over-time, leading to disrupted organelle Ca^{2+} exchange and to β cell dysfunction. In agreement, rupture of ER Ca^{2+} homeostasis, likely linked to a combination of Ca^{2+} store release and extracellular Ca^{2+} influx, was shown to play a major role in β cell dysfunction under diabetic conditions (36,37).

We thus propose a model by which glucose differentially regulates functional ER-mitochondria interactions over time and subsequently regulates GSIS in β cells. Acute increase in glucose concentrations increases organelle communication, likely to stimulate mitochondrial bioenergetics and ATP synthesis, and triggers insulin secretion. However, overstimulation of organelle interactions by chronic HG exposure induces a progressive depletion of ER Ca^{2+} stocks, an increase in mitochondrial Ca^{2+} content and a disruption of Ca^{2+} transfer from ER to mitochondria. Simultaneously, time-dependent alteration of Ca^{2+} signalling participates to both ER stress and mitochondrial fragmentation and dysfunction. Organelle stresses might maintain increased organelle tethering as an adaptive mechanism to restore homeostasis. Interestingly, the experimental induction of ER-mitochondria interactions using a linker mimics the glucotoxic situation, as it fragments mitochondria and blunts GSIS. Altogether, these effects subsequently could create a vicious cycle that contributes to the progressive decrease of β cell function and thereby to the

worsening of the disease over time (Supplementary Figure 4). Therefore, disrupted Ca^{2+} signalling at MAM interface might be a key feature of glucotoxicity-mediated β cell dysfunction.

A striking observation is the constant increase of organelle interactions with both acute and longer HG exposure, suggesting that glucose-mediated increase of MAMs could be in the same time a stimulatory and a protective mechanism to compensate reduced organelle Ca^{2+} exchange, respectively. HG-mediated organelle stresses could participate to the increased organelle tethering over time, as both Tm-induced ER stress and oligomycin-induced mitochondrial stress are able to increase ER-mitochondria interactions. In agreement, Tm-induced ER stress increased MAMs in HeLa cells (38) and in liver of lean mice (29), pointing that increased MAM formation is a generalized response to ER stress. However, we assume that the adaptive increase of MAMs in glucotoxicity situations should be transitory as we observed reduced organelle interactions in β cell of T2D patients compared to controls (19). However, cells in culture and diabetic patients differ in term of chronicity as cells are exposed to several days to HG against years for patients. In addition, patients also present chronic dyslipidaemia (lipotoxicity) and palmitate reduced organelle interactions in Min6B1 cells (19). Therefore, MAM integrity could be dynamically and differentially regulated in β cells during the progression of T2D pathology, highlighting that MAM regulation play an important role in the control of β cell function.

Acknowledgement:

The authors thank Pierre Maechler (University Medical Center, Geneva, Switzerland) for the generous gift of INS-1E cells; Karim Chick (Hospices civils de Lyon, Lyon, France) for the measurement of human insulin by RIA; Gyorgi Hajnoczky (Thomas Jefferson institute, Philadelphia, USA) for the generous gift of ER-mitochondria linkers and for sharing his macro to analyse ER-mitochondria interactions by TEM; Roger Tsien's (University of California, San Diego, USA) for the generous gift of 4mtD3cpv vector; Maria Teresa Alonso (University of Valladolid, Spain) for the generous gift of erGAP1probe.

Funding:

This work was supported by INSERM. F.D. was supported by a research fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research.

Conflict of interest:

none declared

Author contributions:

F.D., C.T., J.R. and A-M.M. designed the experiments, researched data, contributed to discussions and wrote the manuscript. B.P. analysed TEM data, contributed to discussion and reviewed the manuscript. Y.G., S.P., M-A.C., and E.E-C. researched data. S.D. and F.V-C. contribute to formation, discussions and reviewed/edited the manuscript. A-M.M. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Prior presentations:

Some of the data in the article were presented as poster at the 2018 EMBO workshop on membrane contact sites in health and diseases, and as an oral presentation at both the 2017 annual meeting of the European association for the study of Diabetes (EASD) and the 2018 annual meeting of the Francophone Society of Diabetes (SFD).

REFERENCES

1. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest.* 2003 Sep;33(9):742–50.
2. Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochem J.* 2015 Mar 1;466(2):203–18.
3. Maechler P, Carobbio S, Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(5–6):696–709.
4. Arunagiri A, Haataja L, Cunningham CN, Shrestha N, Tsai B, Qi L, et al. Misfolded proinsulin in the endoplasmic reticulum during development of beta cell failure in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Apr;1418(1):5–19.
5. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas J-C. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Nov 25;364(1–2):1–27.
6. Eizirik DL, Korbitt GS, Hellerström C. Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *J Clin Invest.* 1992 Oct;90(4):1263–8.
7. Fex M, Nicholas LM, Vishnu N, Medina A, Sharoyko VV, Nicholls DG, et al. The pathogenetic role of β -cell mitochondria in type 2 diabetes. *J Endocrinol.* 2018 Mar;236(3):R145–59.
8. Karunakaran U, Kim H-J, Kim J-Y, Lee I-K. Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and β -cell failure in type II diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:639762.
9. Madec A-M, Cassel R, Dubois S, Ducreux S, Vial G, Chauvin M-A, et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2013 Dec;27(12):5122–30.
10. Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2005 Feb;48(2):282–9.
11. Barlow J, Affourtit C. Novel insights into pancreatic β -cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells. *Biochem J.* 2013 Dec 15;456(3):417–26.
12. Masini M, Anello M, Bugliani M, Marselli L, Filipponi F, Boggi U, et al. Prevention by metformin of alterations induced by chronic exposure to high glucose in human islet beta cells is associated with preserved ATP/ADP ratio. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Apr;104(1):163–70.
13. Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, Yu T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Feb 1;14(3):439–57.
14. Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium.* 2017;62:1–15.
15. Herrera-Cruz MS, Simmen T. Over Six Decades of Discovery and Characterization of the Architecture at Mitochondria-Associated Membranes (MAMs). *Adv Exp Med Biol.* 2017;997:13–31.

16. Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin M-A, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 2014 Oct;63(10):3279–94.
17. Tubbs E, Chanon S, Robert M, Bendridi N, Bidaux G, Chauvin M-A, et al. Disruption of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Contributes to Muscle Insulin Resistance in Mice and Humans. *Diabetes*. 2018;67(4):636–50.
18. Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, Belaidi E, Tubbs E, Chauvin M-A, et al. Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia*. 2016 Mar;59(3):614–23.
19. Thivolet C, Vial G, Cassel R, Rieusset J, Madec A-M. Reduction of endoplasmic reticulum- mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes. *PloS One*. 2017;12(7):e0182027.
20. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):667–78.
21. Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*. 2006 Sep 25;174(7):915–21.
22. Weaver D, Bartok A, Csordas G, Hajnoczky G. A Standardized Method to Quantify ER-Mitochondrial Interfaces in Electron Micrographs. *Biophysical Journal*. 112(3), 133a. 2017;
23. Tubbs E, Rieusset J. Study of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Interactions by In Situ Proximity Ligation Assay in Fixed Cells. *J Vis Exp JoVE*. 2016 10;(118).
24. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, et al. Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*. 2006 May;13(5):521–30.
25. Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Aulestia FJ, Gallego-Sandin S, Garcia-Sancho J, et al. GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca²⁺ in organelles. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Feb 18;111(7):2584–9.
26. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin M-A, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):789–800.
27. Theurey P, Tubbs E, Vial G, Jacquemetton J, Bendridi N, Chauvin M-A, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J Mol Cell Biol*. 2016 Apr;8(2):129–43.
28. Jhun BS, Lee H, Jin Z-G, Yoon Y. Glucose stimulation induces dynamic change of mitochondrial morphology to promote insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1E. *PloS One*. 2013;8(4):e60810.
29. Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med*. 2014 Dec;20(12):1427–35.
30. Gilon P, Chae H-Y, Rutter GA, Ravier MA. Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium*. 2014 Nov;56(5):340–61.
31. Molina AJA, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, et al. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes*. 2009 Oct;58(10):2303–15.

32. Rieusset J. The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death Dis.* 2018 Mar 9;9(3):388.
33. Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, et al. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell.* 2010 Jul 23;142(2):270–83.
34. Masini M, Martino L, Marselli L, Bugliani M, Boggi U, Filipponi F, et al. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33(6).
35. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab.* 2006 Sep;4(3):245–54.
36. Kono T, Tong X, Taleb S, Bone RN, Iida H, Lee C-C, et al. Impaired Store-Operated Calcium Entry and STIM1 Loss Lead to Reduced Insulin Secretion and Increased Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic β cell. *Diabetes.* 2018 Aug 21;
37. Gwiazda KS, Yang T-LB, Lin Y, Johnson JD. Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Apr;296(4):E690-701.
38. Bravo R, Vicencio JM, Parra V, Troncoso R, Munoz JP, Bui M, et al. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 2011 Jul 1;124(Pt 13):2143–52.

Legends of Figures

Figure 1: Glucose-induced increase of ER-mitochondria interactions and Ca^{2+} exchange control GSIS in INS-1E cells. A) Representative images (at left, x63, scale bar 20 μm) and quantitative analysis (at right) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by *in situ* PLA in INS-1E after 30 minutes of incubation in 11 mmol/L (Ctrl) or 22.5mmol/L of glucose (HG) (n=135 images analysed in 3 independent experiments). B) Image (x63, scale bar 20 μm) and schematic representation of the mitochondrial Ca^{2+} probe, 4mtD3cpv. 4mtD3cpv was excited at 430nm and the emitted fluorescence light was measured at 475 nm (CFP) and 535nm (YFP). C) Representative curves of intra-mitochondrial Ca^{2+} following ATP stimulation in both 11- and 22.5mmol/L-treated INS-1E cells for 30 minutes. D-E) Quantitative analysis of basal mitochondrial Ca^{2+} content (D) and ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation (E) in both 11- and 22.5mmol/L-treated INS-1E cells after 30 minutes of treatment (n=170-220 cells analysed in 3 independent experiments). F) Representative Western blots (at left) and quantitative analysis (at right) illustrating that Grp75 silencing reduced GRP75 protein levels in INS-1E cells (n=7). G) Representative images (at top, x63, scale bar 20 μm) and quantitative analysis (at bottom) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by *in situ* PLA in Grp75-silenced INS-1E (n=90 images analysed in 2 independent experiments). H) Glucose-stimulated insulin secretion (expressed in fold) measured in Grp75-silenced INS-1E after 72h of incubation (n=9). *P <0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs Ctrl.

Figure 2: Chronic high glucose treatment mimics glucotoxicity and induces ER-mitochondria interactions in both the rat pancreatic beta cell line INS-1E and in human pancreatic islets. A) Glucose-stimulated insulin secretion (expressed in fold) in INS-1E after 48h of incubation in 11mmol/L Glc (Ctrl) or 22.5 mmol/L Glucose (HG) (n=9). B) Representative images (at top, x63, scale bar 20 μm) and quantitative analysis (at bottom) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by *in situ* PLA in INS-1E after 48h of incubation in Ctrl or HG conditions (n=135 images). C) Representative TEM images (Scale bar 0.2 μm) of INS-1E cells treated with 11 or 22.5 mmol/L glucose. Bottom images are magnifications of the boxed areas of the top images. M, mitochondria; ER, Endoplasmic Reticulum; The arrows show MAMs. D-E) Quantitative analysis of the percent of total ER-mitochondria interaction/mitochondria surface in a 50nm range (D), or according to range 0-10nm, 10-20nm, 20-30nm, 30-40nm, 40-50nm (E) (n=130-200 ER-mitochondria contacts analyzed in n=30 cells). F) Quantification of mitochondria number per field of TEM images (n=30 cells). G) Glucose-stimulated insulin secretion (expressed in fold) in human pancreatic islets after 48h of incubation in 5.5 mmol/L

Glc (Ctrl) or 16.5 mmol/L Glucose (HG) (n=11, from 4 different donors). H) Representative images (at top, x63, scale bar 20 μ m) and quantitative analysis (at bottom) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by *in situ* PLA in human pancreatic beta cells (green insulin-positive cells) in control (Ctrl) or glucotoxic conditions (HG), (n=135 images, from 4 different donors). I) Representative TEM images of human pancreatic beta cells (scale bar 0.2 μ m). Bottom images are magnifications of the boxed areas in the top images. J-K) Quantitative analysis of the percent of total ER-mitochondria interaction/mitochondria surface in a 50nm range (J), or according to 0-10 nm, 10-20nm, 20-30nm, 30-40nm, 40-50nm ranges (K) (n=130-200 ER-mitochondria contacts analyzed in n=30 cells, from 3 different donors). L) Quantification of mitochondria number per field of TEM images (n=30 cells). All analyses were the sum of 3 independent experiments. *P <0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Ctrl.

Figure 3: Chronic high glucose treatment induces mitochondrial Ca^{2+} accumulation and blunts IP3R-mediated Ca^{2+} transfer in INS-1E cells. A) Representative curves of intra-mitochondrial Ca^{2+} following ATP stimulation in both 11- and 22.5mmol/L glucose-treated INS-1E cells (Ctrl and HG, respectively) after 48h of incubation. B-C) Quantitative analysis of basal mitochondrial Ca^{2+} (B, n=700-1000 cells) or ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation (C, n=100-130 cells) in Ctrl and HG-treated INS-1E cells after 48h of treatment. D) Representative curves of intra-mitochondrial Ca^{2+} following ATP stimulation in both 11- and 22.5mmol/L glucose-treated INS-1E cells (Ctrl and HG, respectively) after 72h of incubation. E-F) Quantitative analysis of basal mitochondrial Ca^{2+} (E, n=700-1000 cells) or ATP-stimulated mitochondrial Ca^{2+} accumulation (F, n=100-130 cells) in Ctrl and HG-treated INS-1E cells after 72h of treatment. All analyses were the sum of 3 independent experiments. **P<0.01, ***P<0,001 vs. Ctrl. ns: non-significant.

Figure 4: Chronic high glucose treatment reduces ER Ca^{2+} store and emptying in INS-1E cells. A) Image (x63, scale bar 20 μ m) and schematic illustration of the ER Ca^{2+} probe, erGAP1. erGAP1 was excited at 403nm and 470nm and the emitted fluorescence light was measured at 510nm. B) Representative curves of ER Ca^{2+} content following thapsigargin (TG) stimulation in both 11- and 22.5mmol/L glucose-treated INS-1E cells (Ctrl and HG, respectively) after 48h of incubation. C-D) Quantitative analysis of basal ER Ca^{2+} stock (C, n=700-1000 cells) or TG-stimulated ER Ca^{2+} release (D, n=70-100 cells) in Ctrl and HG-treated INS-1E cells after 48h of treatment. E) Representative curves of ER Ca^{2+} content following thapsigargin (TG) stimulation in both 11- and 22.5mmol/L glucose-treated INS-1E cells (Ctrl and HG, respectively) after 72h of incubation. F-G) Quantitative analysis of basal ER

Ca^{2+} stock (F, n=70-100 cells) or TG-stimulated ER Ca^{2+} release (G, n=100 cells) in Ctrl and HG-treated INS-1E cells after 72h of treatment. All analyses were the sum of 3 independent experiments. ***P<0.001 vs. Ctrl. ns: non-significant.

Figure 5: Glucotoxicity-related beta cell dysfunction is associated with ER stress and mitochondrial dysfunction in both rat pancreatic beta cell line and in human islets. A-B) mRNA levels of ER stress markers in INS-1E cells (n=9) (A) or human pancreatic islets (n=12 from 4 different donors) (B) incubated for 48h with 11- or 22.5mmol/L glucose (Ctrl or HG, respectively) in INS-1E and 48h with 5.5 or 16.5mmol/L glucose (Ctrl or HG, respectively) in human pancreatic islets. C-D) Measurement of oxygen consumption of INS-1E cells (C) or human islets (D) incubated for 48h with 11- or 22.5mmol/L in INS-1E and 48h with 5.5 or 16.5mmol/L glucose in human pancreatic islets, in basal situation and in the presence of oligomycin (2 μ M, ATP synthase inhibitor) (n=9 in 3 independent experiments). Coupled respiration was calculated. E) mRNA levels of ER stress markers in INS-1E cells treated with tunicamycin (Tm, 0.5 μ g/ml) for 24h. F) Representative images (at top, x63, scale bar 20 μ m) and quantitative analysis (at bottom) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by *in situ* PLA in INS-1E after 24h of incubation with or without tunicamycin (n=135 images analysed in 3 independent experiments). G) Oxygen consumption of INS-1E cells pre-treated with oligomycin (2 μ mol/L) for 1h. H) Representative images (at top, x63, scale bar 20 μ m) and quantitative analysis (at bottom) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by *in situ* PLA in INS-1E after 1h of incubation with or without oligomycin (n=135 images analysed in 3 independent experiments). *P <0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Ctrl.

Figure 6: Chronic high glucose treatment induces mitochondrial fission in both the rat pancreatic beta cell line INS-1E and in human pancreatic islets. A) Representative segmented (at left) and original (at right) images (Scale bar, 20 μ m) of mitochondria from INS-1E cells labelled with MitoTracker, after 48h of 11- or 22.5mmol/L glucose treatment (Ctrl and HG, respectively). B-C) Quantitative shape analysis of mitochondria, including the calculation of Form Factor (FF, B) and Aspect Ratio (AR, C), in Ctrl and HG-treated INS-1E cells. D) Quantification of mitochondrial DNA amount in INS-1E cells under Ctrl or HG conditions during 48h. E) Percent of cells exhibiting tubular, intermediate or fragmented morphology in Ctrl and HG-treated INS-1E cells during 48h, n=300 cells analysed. F) Representative segmented (at left) and original (at right) images (Scale bar, 20 μ m) of mitochondria from human pancreatic beta cells (Insulin labeled), following the immunodetection of

OXPPOS proteins. G-H) Quantitative shape analysis of mitochondria, including the calculation of Form Factor (FF, G) and Aspect Ratio (AR, H), in Ctrl and HG-treated human pancreatic beta cells. I) Quantification of mitochondrial DNA amount by PCR in human islets cells under Ctrl or HG conditions during 48h. J) Percent of cells exhibiting tubular, intermediate or fragmented morphology in human pancreatic beta cells. n=130-150 cells analysed from 3 different donors. K) Correlogram representing positive (blue) and negative (red) correlations between mitochondrial Ca^{2+} content, ATP response, Aspect Ratio (AR) and Form Factor (FF) in INS-1E cells (n=88 cells analysed). *P<0.05, **P<0.01, ***, P<0.001. ns: non-significant.

Figure 7: Experimental induction of ER-mitochondria interactions using a linker induces mitochondrial fission and alters GSIS. A) Schematic illustration of the ER-mitochondria artificial linker. B) Representative TEM images (Scale bar 0.2 μm) of sorted INS-1E cells transfected with a control vector (pcDNA Ctrl) or a vector expressing the linker (Linker). Bottom images are magnifications of the boxed areas of the top images. M, mitochondria; ER, Endoplasmic Reticulum; The arrows show MAMs. * represent swollen mitochondria and ** represent dilated ER. C-D) Quantitative analysis of the percent of total ER-mitochondria interaction/mitochondria surface in a 50nm range (C) or according to range 0-10nm, 10-20nm, 20-30nm, 30-40 nm, 40-50nm (D) (n=130-160 ER-mitochondria contacts analyzed in n=30 cells). E) Quantification of mitochondria number per field of TEM images (n=30 cells). F) Representative segmented (at left of each box) and original (at right of each box) images (Scale bar, 20 μm) of mitochondria from pcDNA Ctrl or linker transfected INS-1E cells. Images showed tubular and reticular mitochondrial networks in control conditions (pcDNA-Ctrl), and short and fragmented morphology after induction of ER/mito contact (Linker) in INS-1E. G-H) Mitochondrial Shape analyses including the calculation of Form Factor (FF, G) and Aspect Ratio (AR, H) (n=150-200 cells). I) GSIS expressed in fold of insulin secretion in response to acute stimulation with glucose (22,5mmol/L) in INS-1E cells expressing the control vector or the linker (n=9). *P<0.05, **P<0.01, ***, P<0.001 vs. pcDNA Ctrl.

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

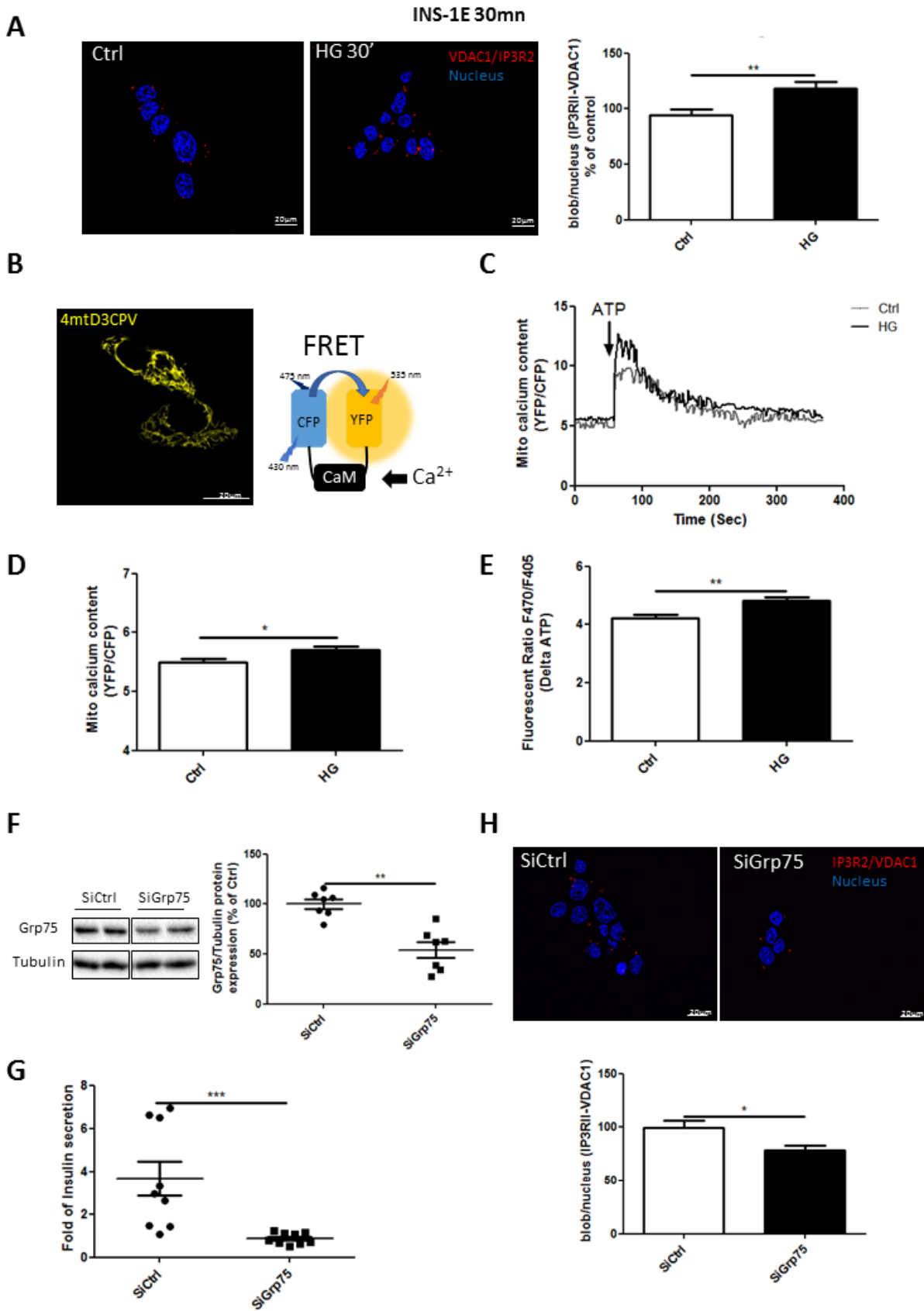


Figure 1

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

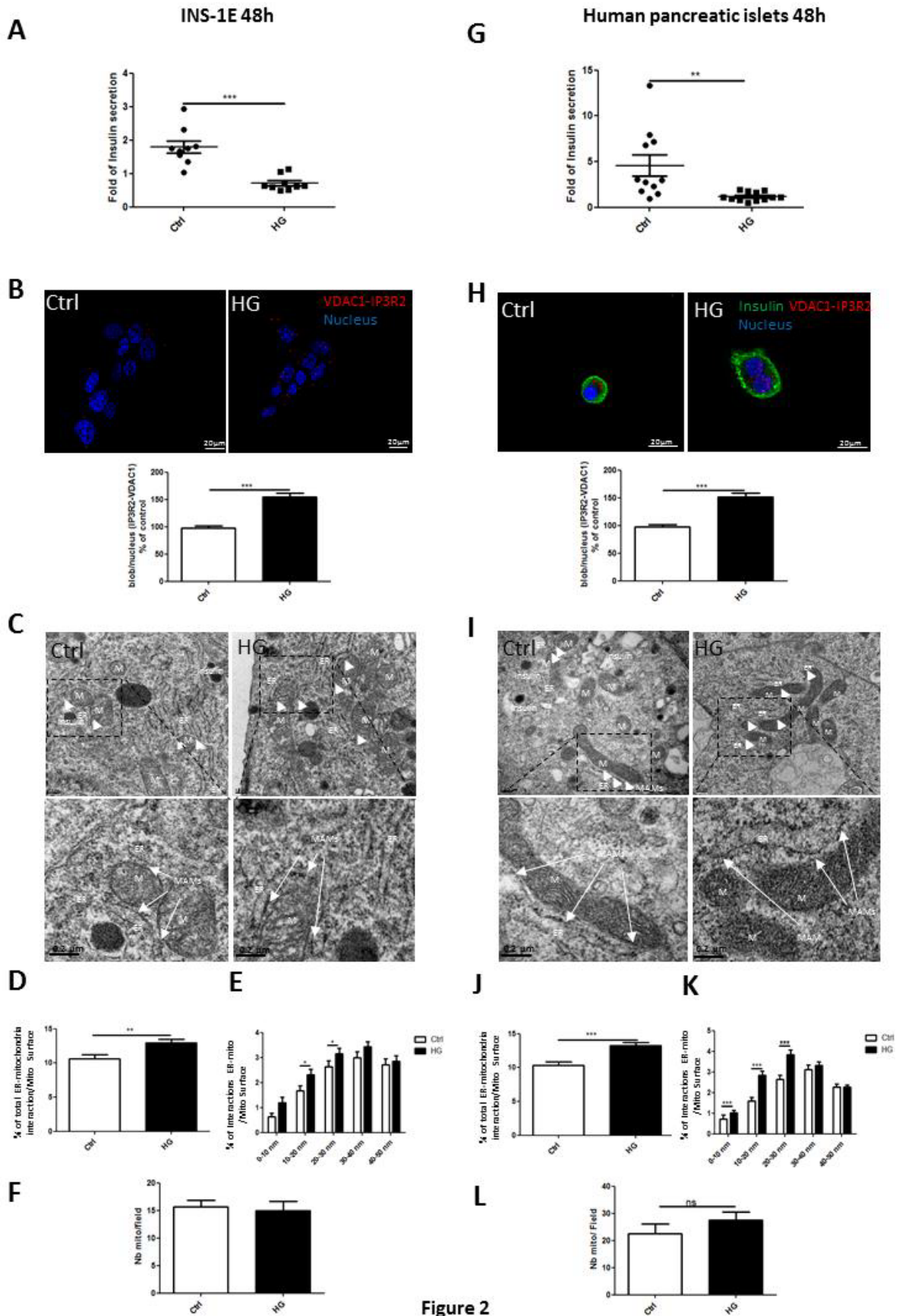


Figure 2

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

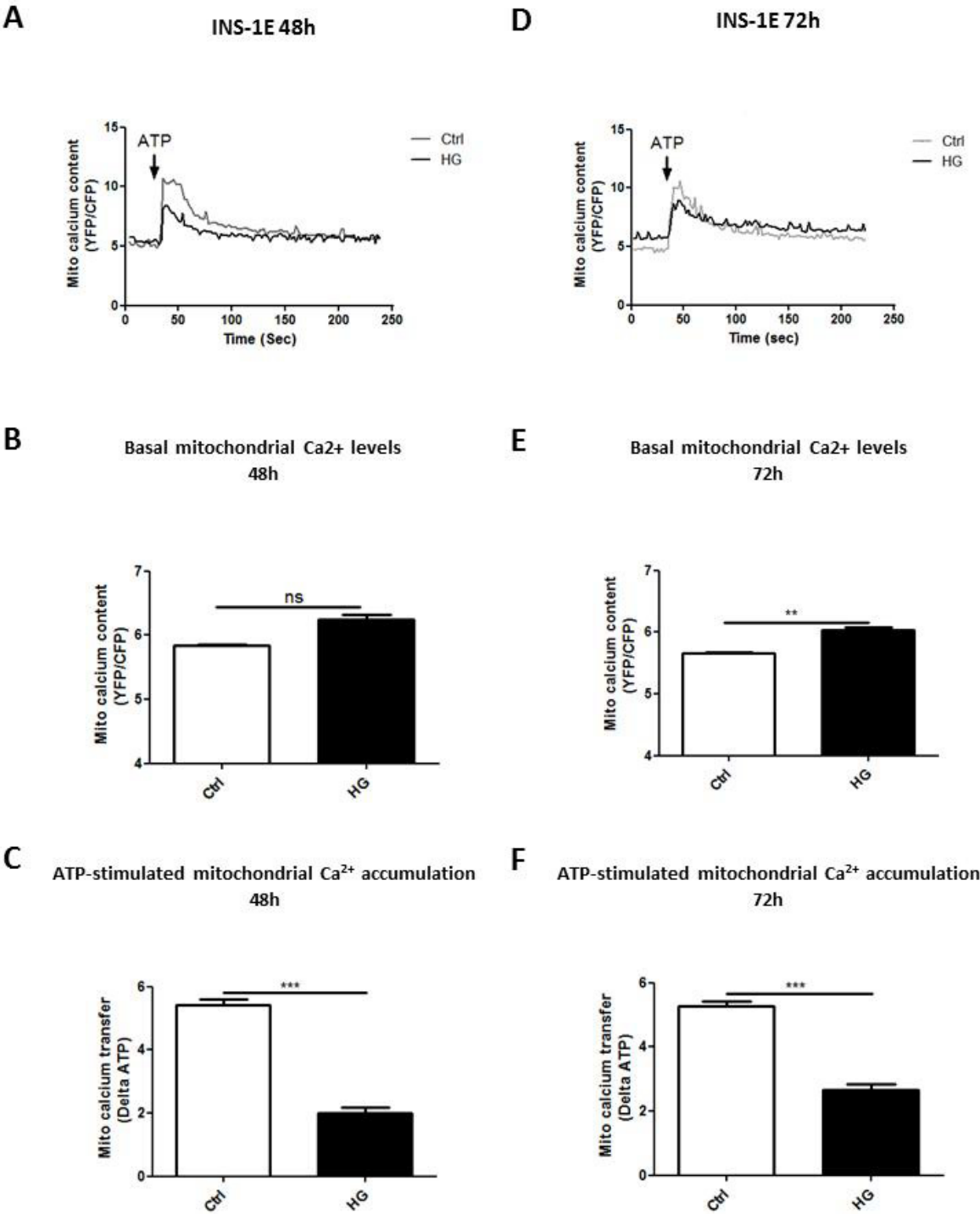


Figure 3

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

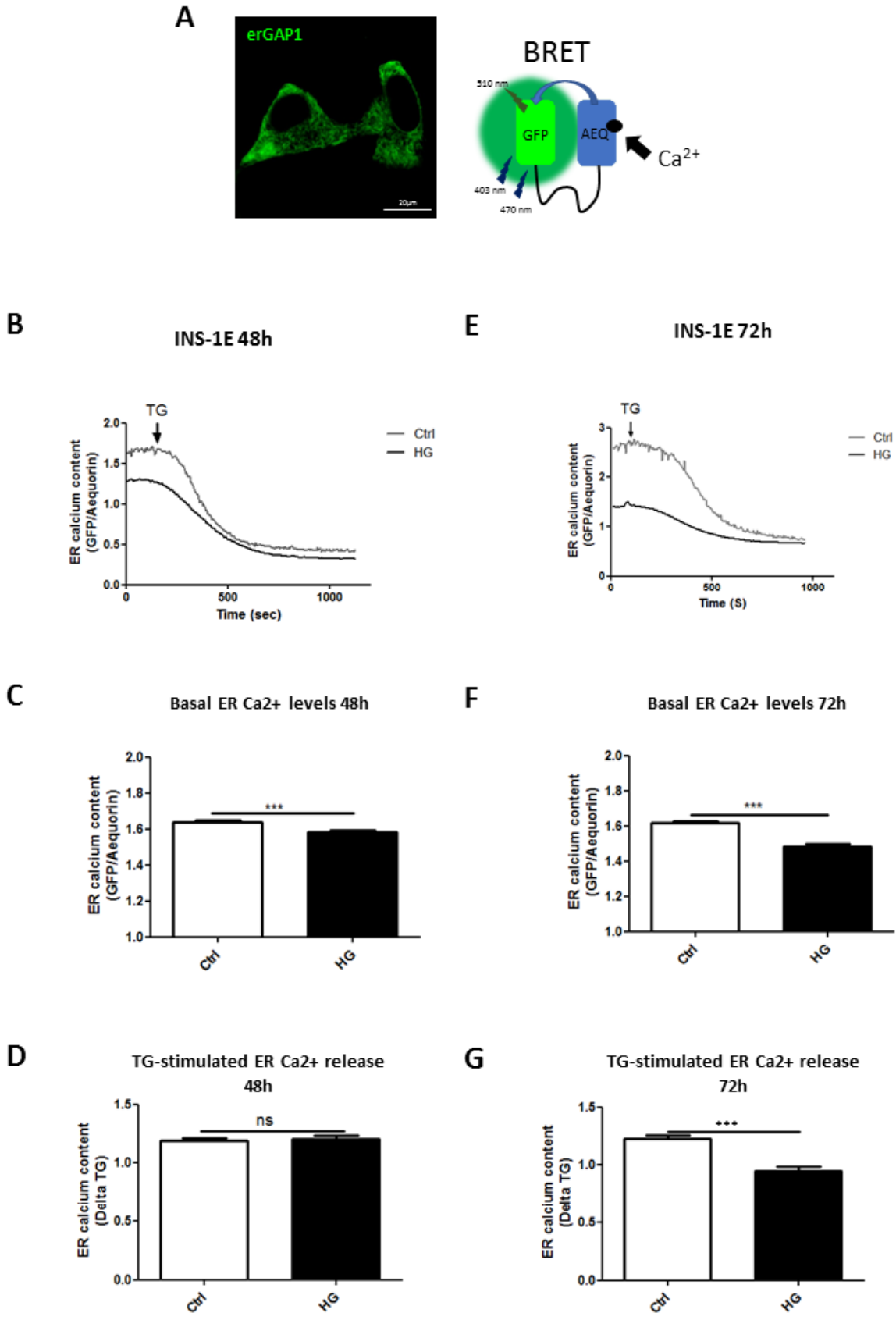


Figure 4

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

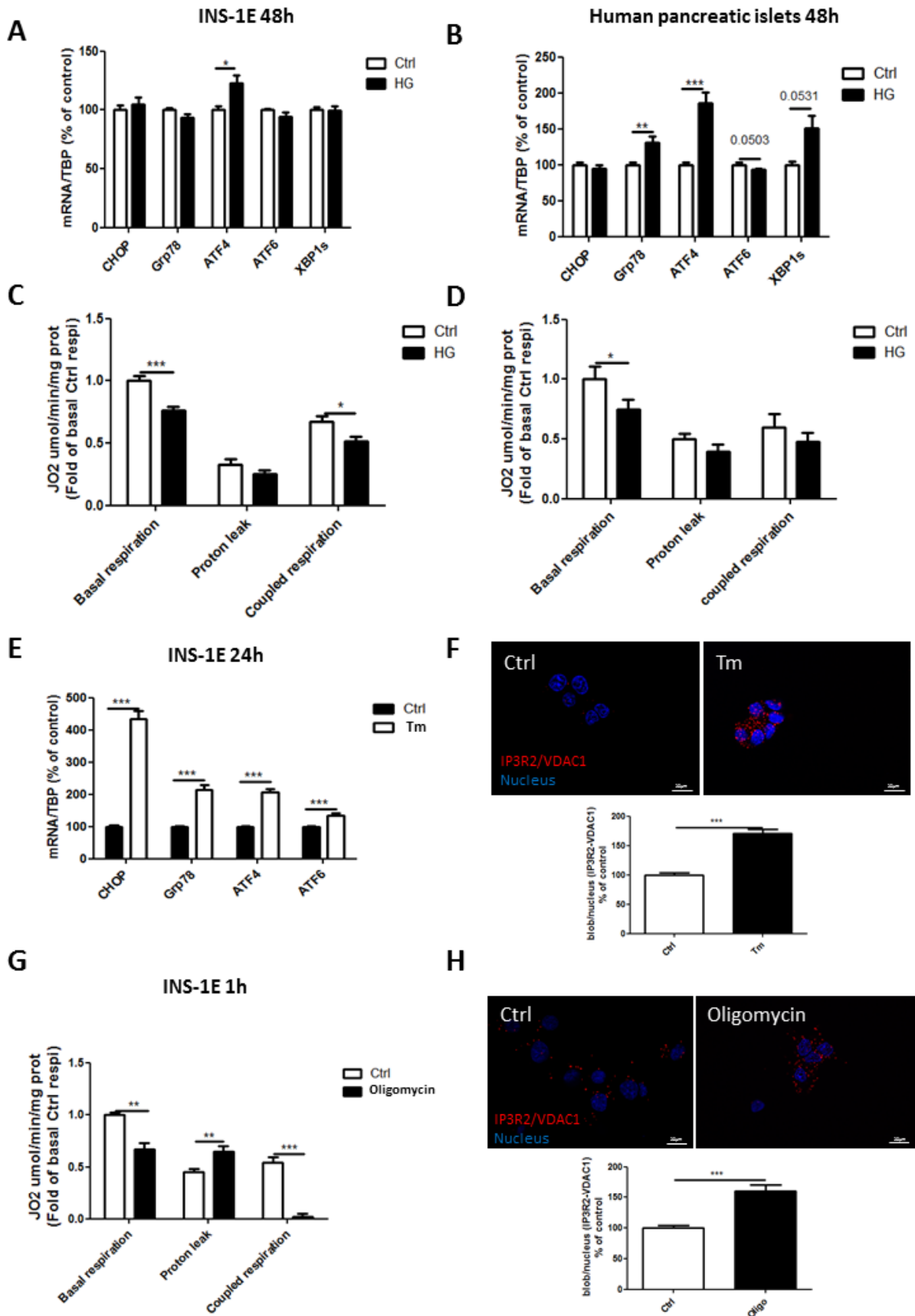


Figure 5

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

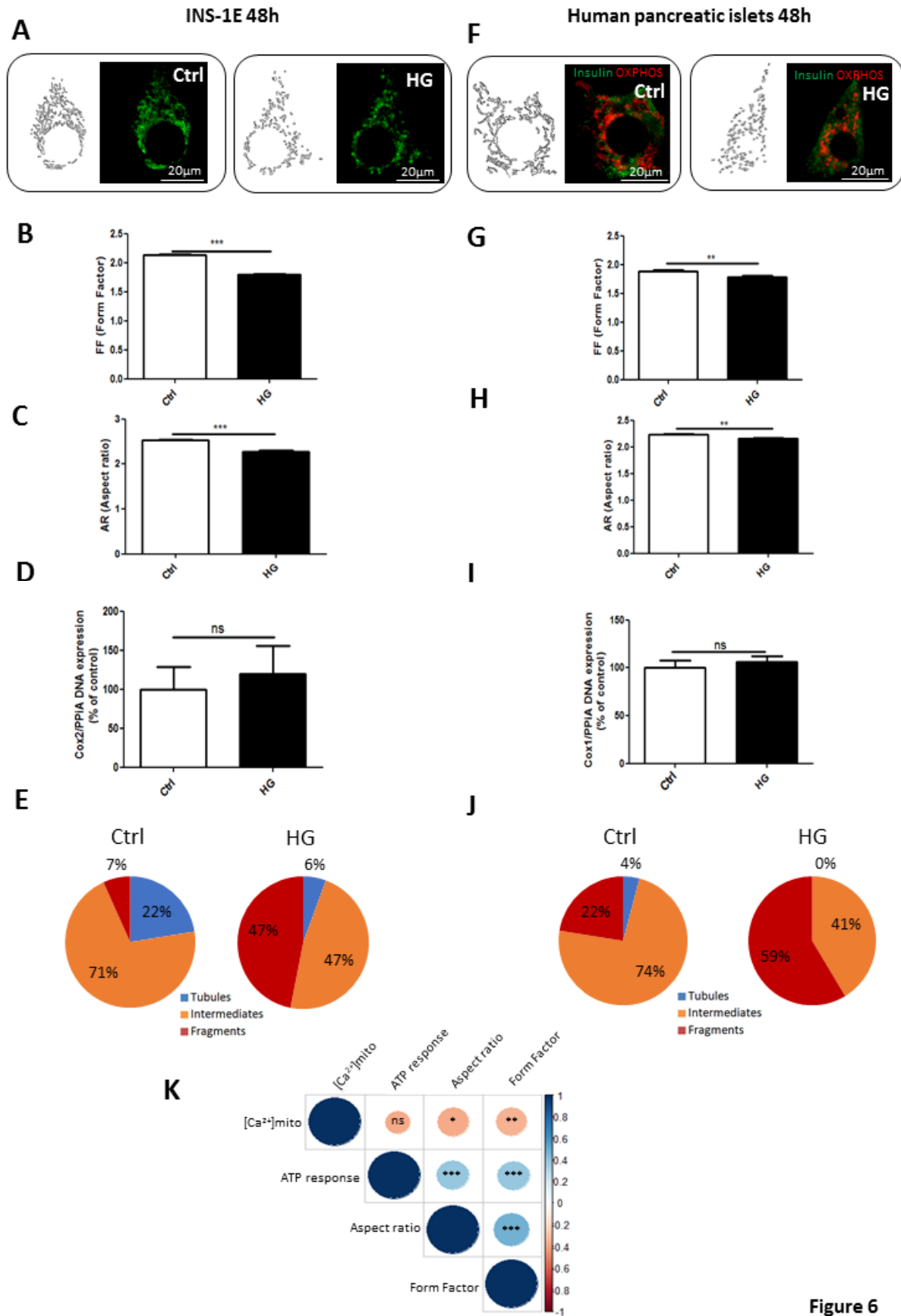


Figure 6

RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité

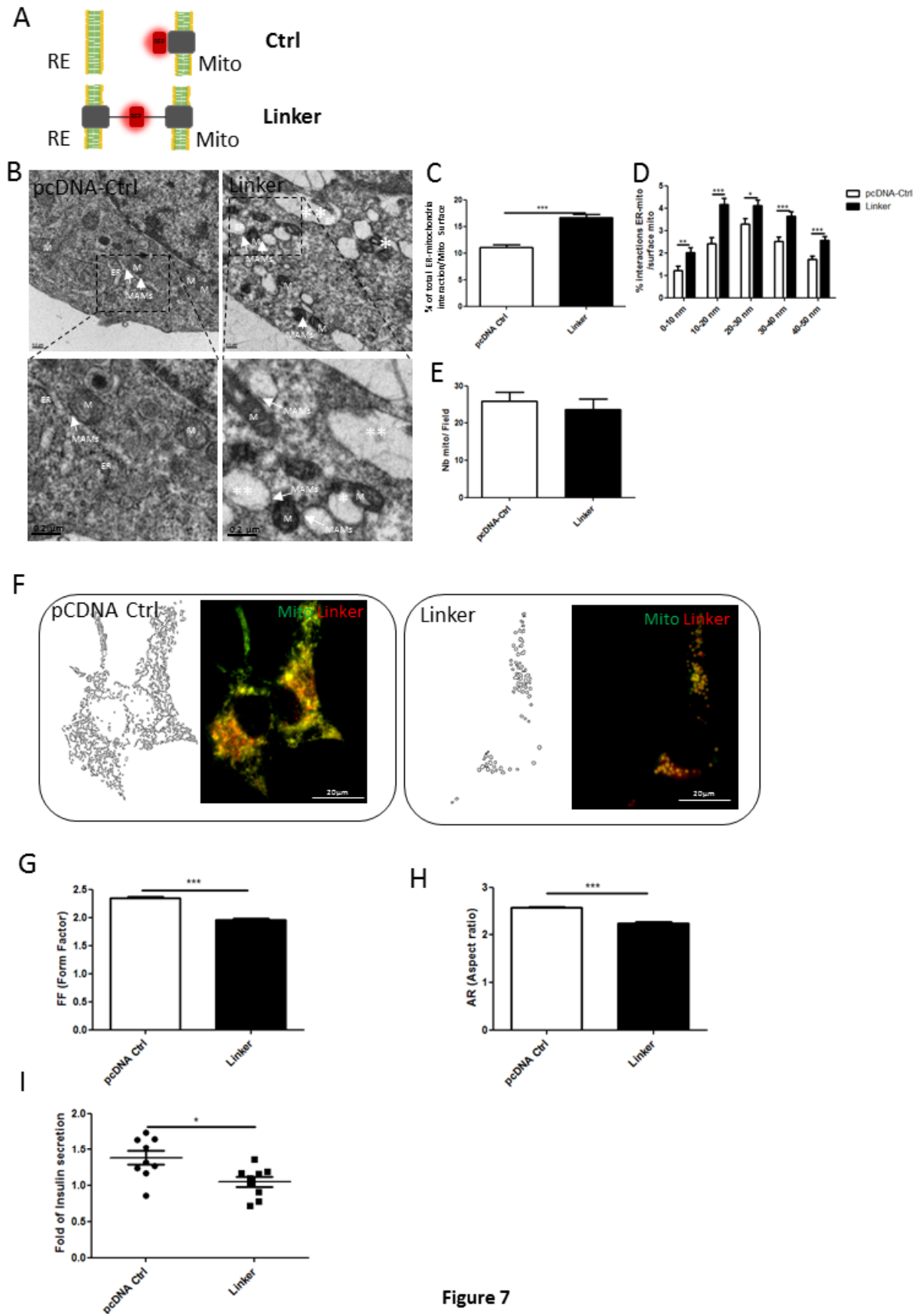
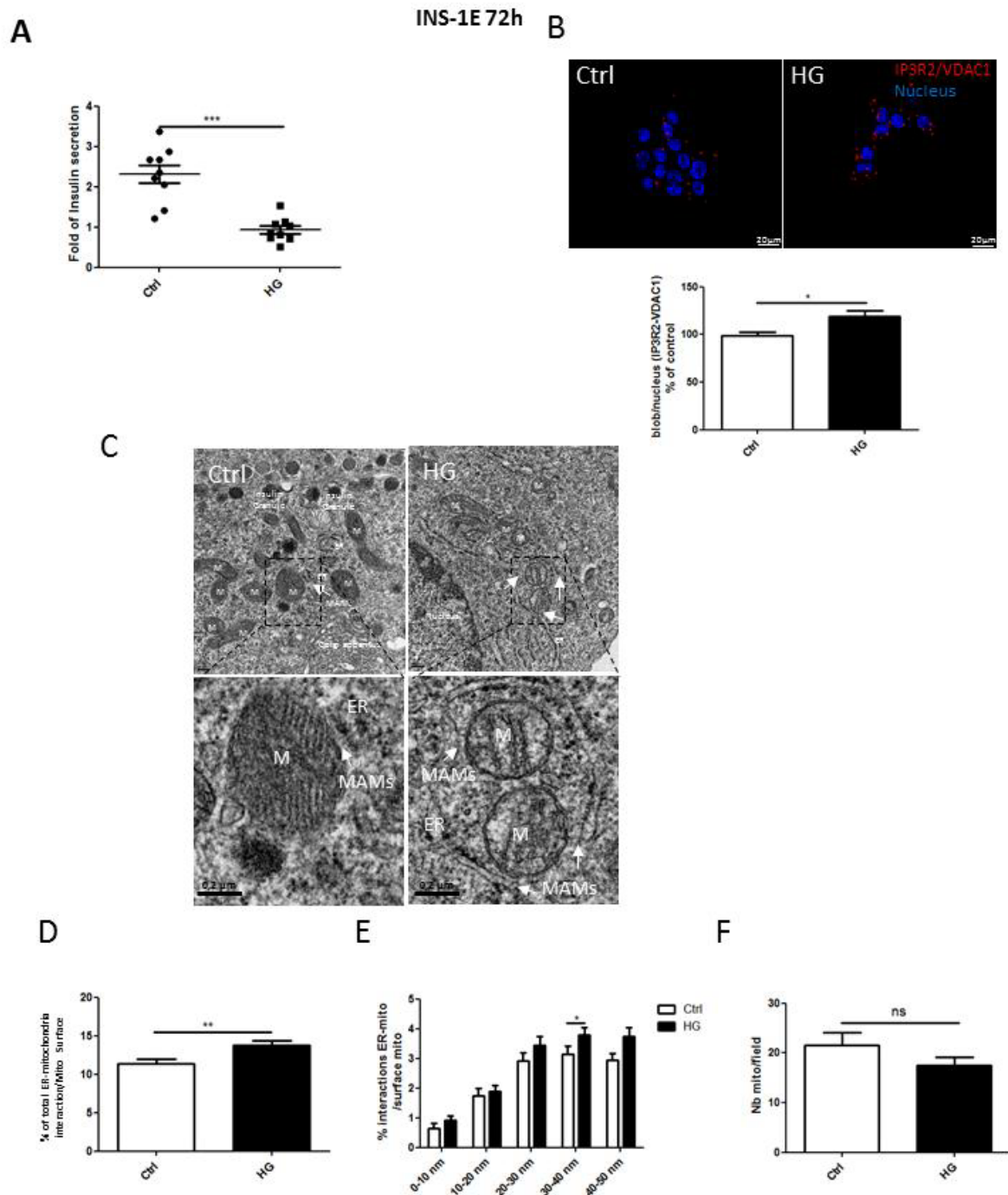
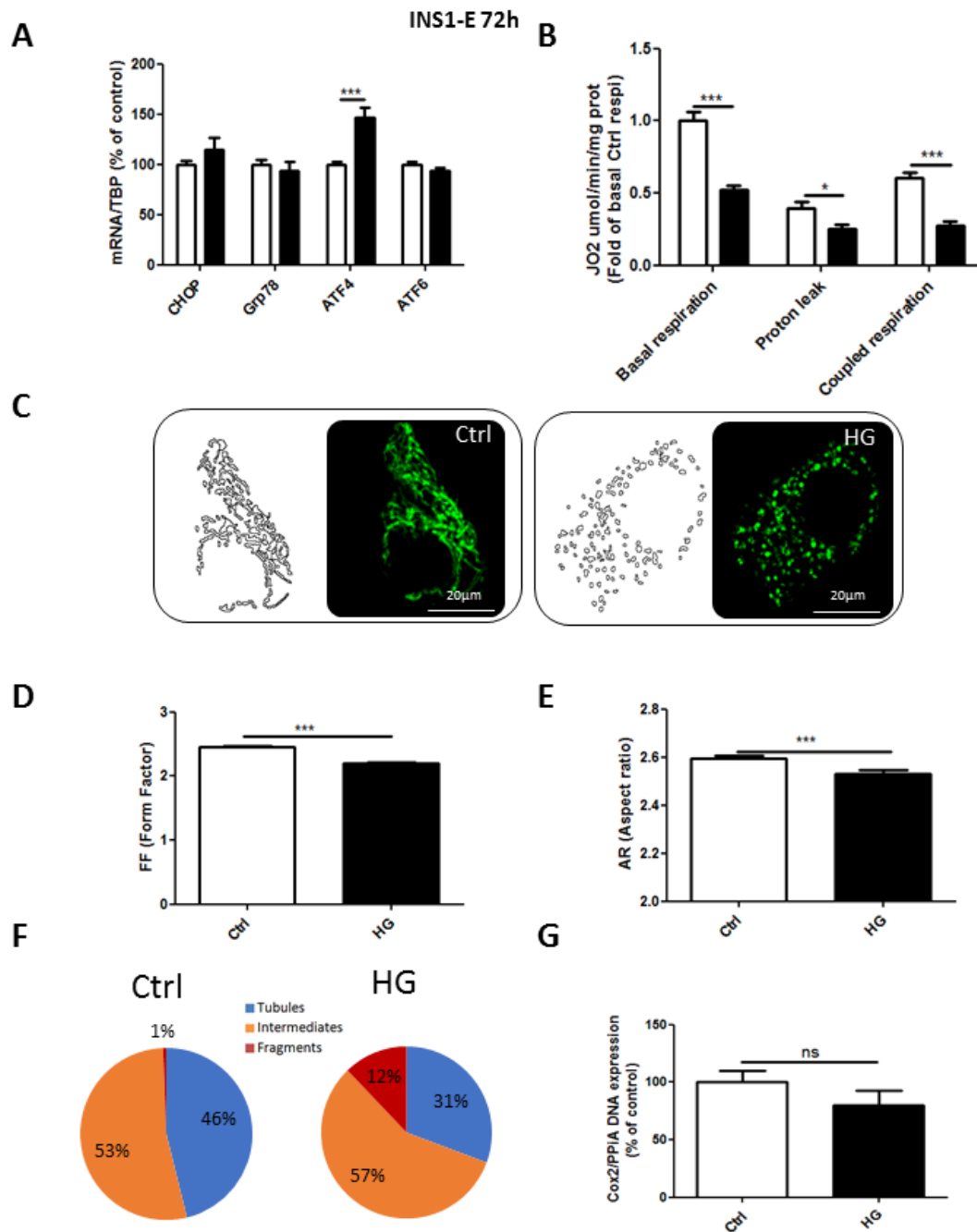


Figure 7

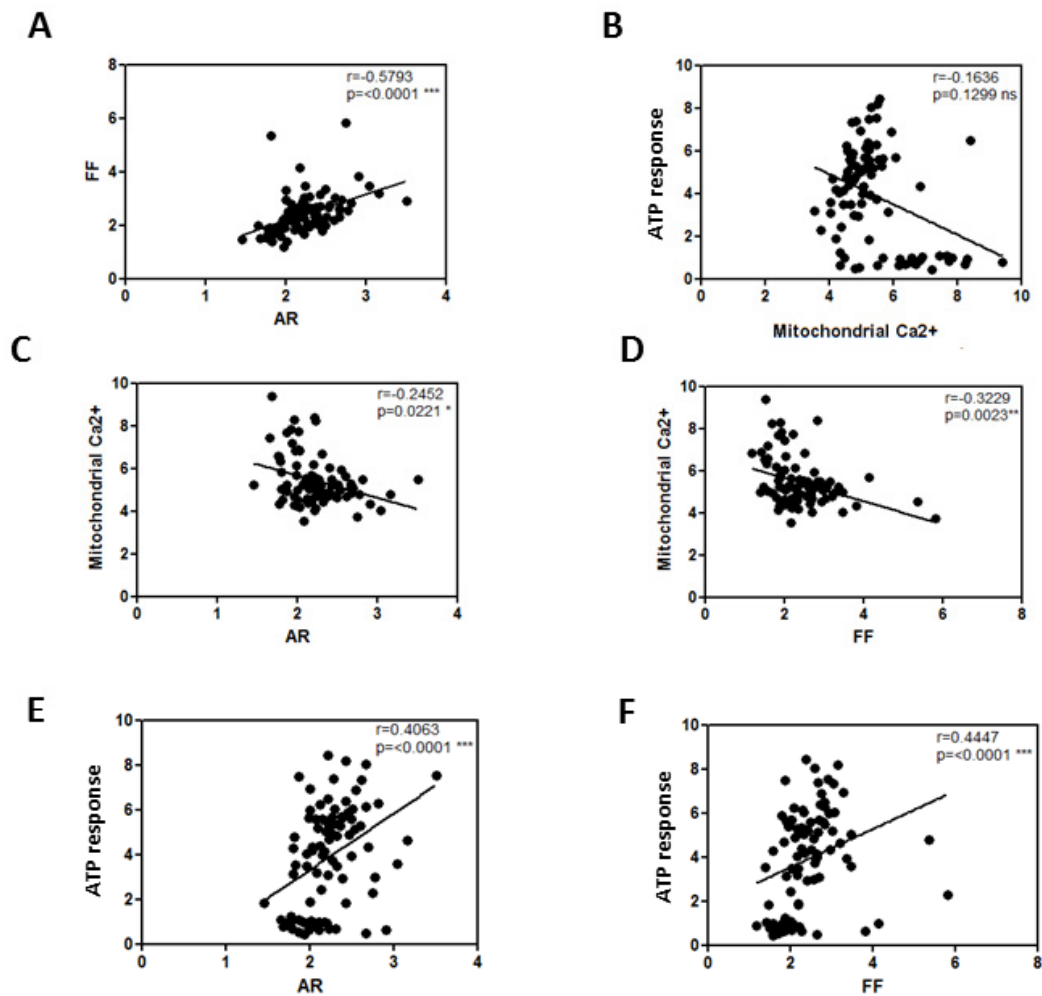
RESULTATS - Partie 1 : Rôle des MAMs dans la fonction et la dysfonction β pancréatique associées à la glucotoxicité



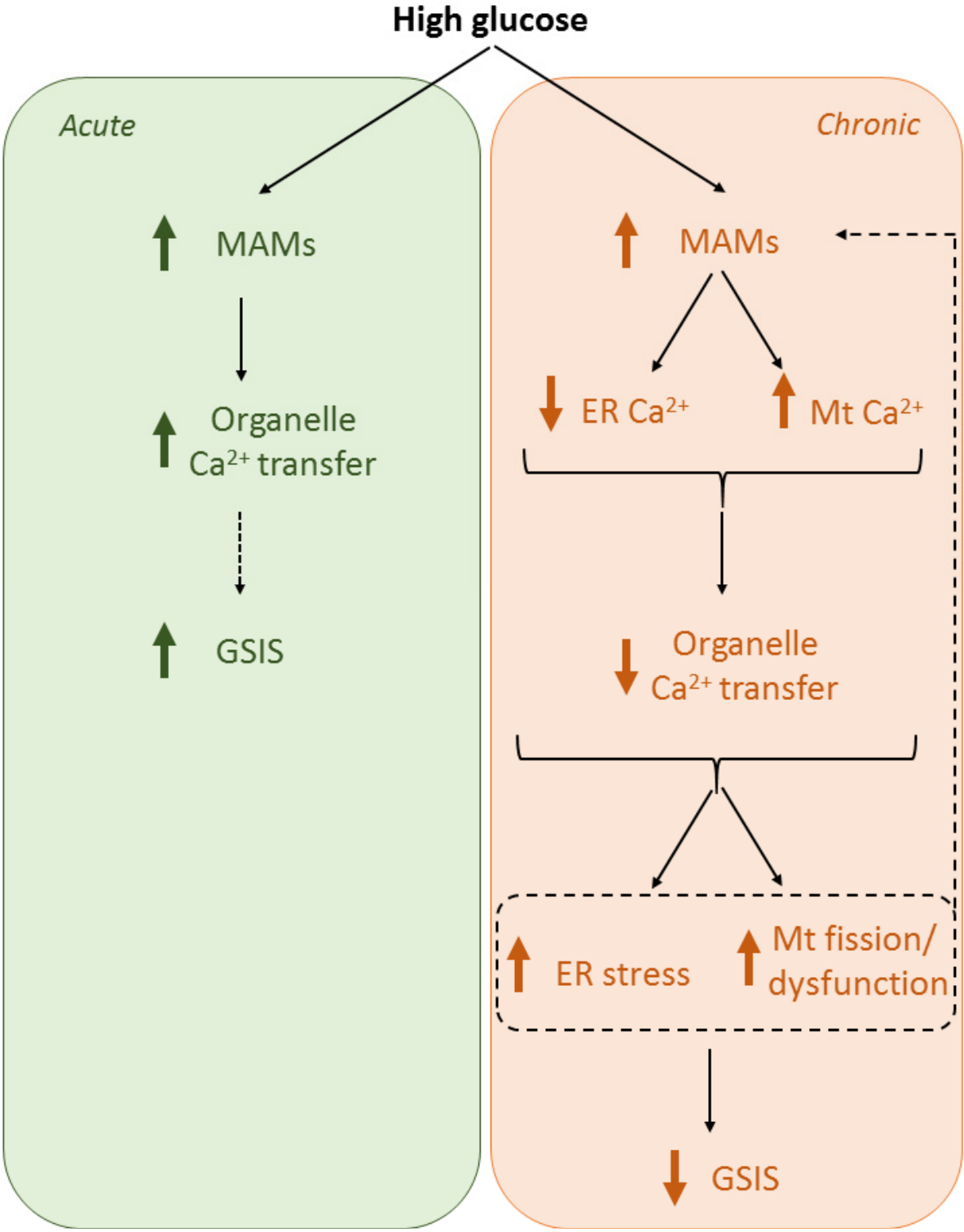
Supplementary Figure 1: A) Glucose-stimulated insulin secretion (expressed in fold) in INS-1E after 72h of incubation in 11mmol/L Glc (Ctrl) or 22.5 mmol/L Glucose (HG) (n=9). B) Representative images (at top, x63, scale bar 20 μ m) and quantitative analysis (at bottom) of VDAC1/IP3R2 interactions measured by in situ PLA in INS-1E after 72h of incubation in Ctrl or HG conditions (n=135 images). C) Representative TEM images (Scale bar 0.2 μ m) of INS-1E cells treated with 11 or 22.5 mmol/L glucose for 72h. Bottom images are magnifications of the boxed areas of the top images. M, mitochondria; ER, Endoplasmic Reticulum; The arrows show MAMs. D-E) Quantitative analysis of the percent of total ER-mitochondria interaction/mitochondria surface in a 50nm range (D), or according to range 0-10nm, 10-20nm, 20-30nm, 30-40nm, 40-50nm (E) (n=150-200 ER-mitochondria contacts in n=30 cells). F) Quantification of mitochondria number per field of TEM images (n=30 cells). **P<0.01, ***P<0.001 vs. Ctrl. Ns: non significant.



Supplementary Figure 2: A) mRNA levels of ER stress markers in INS-1E cells incubated for 72h with 11- or 22.5mmol/L glucose (Ctrl or HG, respectively). B) Measurement of oxygen consumption of INS-1E cells incubated for 72h with 11- or 22.5mmol/L, in basal situation and in the presence of oligomycin (2 μ M, ATP synthase inhibitor) (n=9). C) Representative segmented (at left) and original (at right) images (Scale bar, 20 μ m) of mitochondria from Ctrl and HG-treated INS-1E cells labelled with MitoTracker, after 72h. D-E) Quantitative shape analysis of mitochondria, including the calculation of Form Factor (FF, D) and Aspect Ratio (AR, E), in Ctrl and HG-treated INS-1E cells for 72h. F) Percent of cells exhibiting tubular, intermediate or fragmented morphology in Ctrl and HG-treated INS-1E cells during 72h, n=480 cells analysed. G) Quantification by PCR of mitochondrial DNA amount in INS-1E cells under Ctrl or HG conditions during 72h. All analyses were the sum of 3 independent experiments. *P <0.05, ***P<0.001 vs. Ctrl. Ns: non significant.



Supplementary Figure 3: A-F) Correlations from the correlogram represented in Figure 6K. Respective correlations between FF/AR (A), ATP response/Mitochondrial Ca^{2+} (B), Mitochondrial Ca^{2+} /AR (C), Mitochondrial Ca^{2+} /FF (D), ATP response/AR (E), ATP response/FF (F) (n=88 cells analysed). ns: non-significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



Supplementary Figure 4: Schematic representation of the proposed model of the differential regulations of structural and functional ER-mitochondria interactions by high glucose, following acute (at left) or (chronic (at right) treatments, in beta cells.

Partie 2 : Etude de l'effet de la glucotoxicité sur les oscillations calciques cytosoliques. (Données non publiées)

-Introduction

Un concept récent a émergé et définit qu'il existe au sein de l'îlot des sous-catégories de cellules β . Il existerait des cellules β (1-10% des cellules β) dites « Pacemaker », et d'autres dites « Follower » (Johnston et al., 2016). Ces cellules « pacemaker » seraient à l'origine d'oscillations calciques cytosoliques répétées et constantes directement après l'ajout de glucose. Ces cellules seraient requises pour une libération normale d'insuline en réponse au glucose au sein de l'îlot. Ces cellules pourraient représenter des cibles privilégiées de la glucotoxicité. Un des objectifs corollaires de ma thèse a été de déterminer si :

- Ces oscillations sont toujours présentes dans la lignée INS-1E ?
- La glucotoxicité altère ces oscillations ?

-Matériels et méthodes

Une lignée de cellules β pancréatique de rat INS-1E a été cultivée comme décrit dans la partie 1, pendant 72h à 11mM de glucose. Pour suivre les oscillations calciques cytosolique nous avons utilisé la sonde calcique ratiométrique Fura2-AM (340/380 nm). Après 2 lavages au KRBH, les cellules ont été mises pendant 30 min en présence de 2 μ M de Fura2-AM dans du milieu KRBH w/ Ca^{2+} , à 3mM de glucose, le temps nécessaire au Fura2-AM de s'incorporer dans les cellules. Après 2 lavages au KRBH w/ Ca^{2+} , l'acquisition est effectuée comme décrit partie 1. Après 200 secondes d'acquisition, 22,5mM de glucose ont été ajoutés et l'acquisition a été effectuée pendant 20 min avant l'ajout de 20mM de KCl. En post-acquisition, la fréquence des oscillations (nombre de pics par secondes) ainsi que l'aire sous la courbe ont été calculées. En fonction de leurs temps de réponse oscillatoire au glucose, les cellules ont été classées en 5 catégories (Non oscillantes, Oscillantes dès l'ajout du glucose, Oscillantes 400 secondes après l'ajout du glucose, Oscillantes 600 secondes après l'ajout du glucose, Oscillantes 800 secondes après l'ajout du glucose).

-Résultats

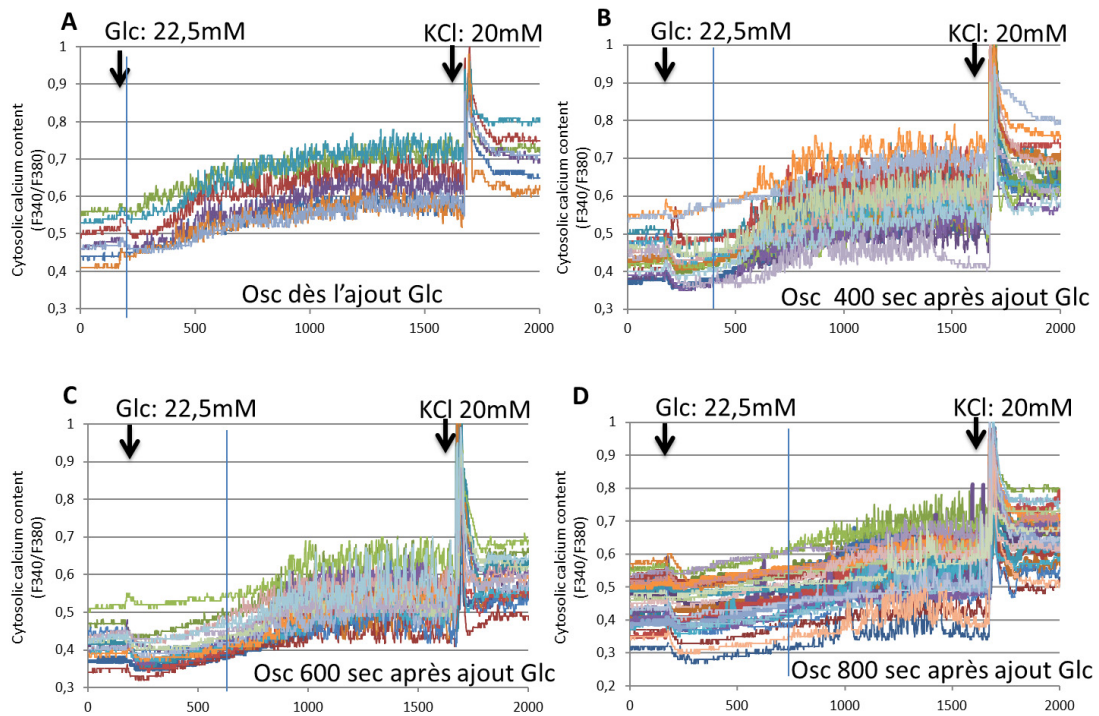


Figure 37 : Mise en évidence de différentes populations d'INS-1E présentant des oscillations (Osc) calciques cytosolique. Démarrant A, dès l'ajout du glucose, après 400 (B), 600 (C) ou 800 secondes (D).

Nous avons pu constater qu'il existait bien différents groupes de cellules β basés sur leur capacité à générer des oscillations calciques cytosoliques en réponse au glucose (**Figure 37**). Nous avons pu isoler des cellules oscillantes dès l'ajout de glucose avec une faible amplitude (8% des cellules) (**Figure 37A**), nous avons ensuite observé différentes sous-populations présentant des oscillations dès 400 (19 % des cellules) (**Figure 37B**), 600 (19 % des cellules) (**Figure 37C**) ou 800 (29 % des cellules) (**Figure 37D**) secondes après l'ajout du glucose.

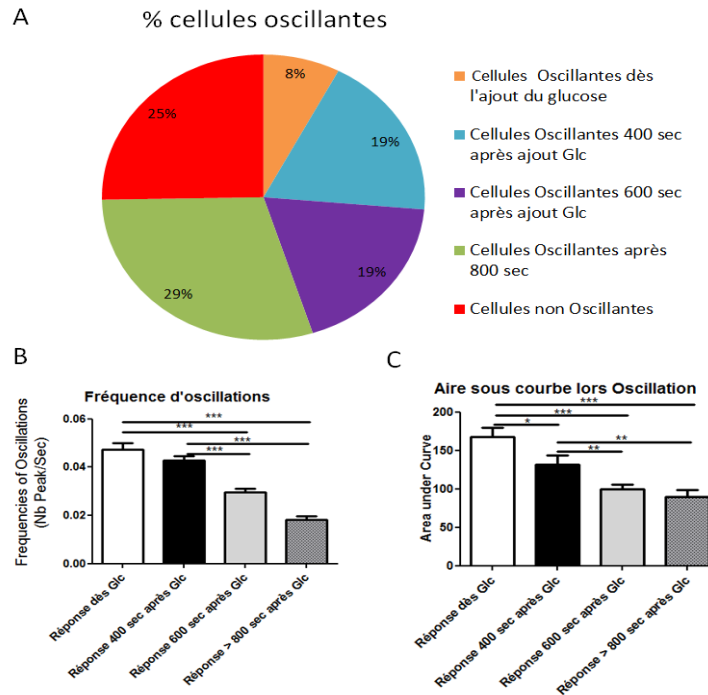


Figure 38 : Oscillations calciques. A, Quantification du % de cellules oscillantes en fonction du temps mis à osciller en réponse au glucose. B, Fréquence des oscillations (nb de pics/seconde). C, Aire sous la courbe des oscillations, donnant un aspect général du « pattern oscillatoire ». n=7-27 cellules, 1 expérience, ANOVA one way. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Ces différentes sous-populations n'ont pas le même « pattern oscillatoires » qui se définit par la fréquence des oscillations, ou encore l'aire sous-courbe donnant un aspect général des oscillations (**Figures 37**). L'amplitude des pics est également un indicateur du pattern oscillatoire mais n'as pas été analysée ici. Nous pouvons observer (**Figure 38B-C**) que le « pattern oscillatoire » diffère selon la population sélectionnée, avec une diminution de la fréquence des oscillations, du nombre de pics et de l'aire sous la courbe dans les populations de cellules qui oscillent tardivement. De plus, on observe que l'amplitude des oscillations calciques cytosoliques de ces cellules semble plus importante que celles des cellules oscillants dès l'ajout de glucose. Ces résultats montrent que même dans un modèle *in vitro* les cellules β conservent une hiérarchisation. Néanmoins, 25 % des cellules sont non oscillantes même 1500 secondes après l'ajout du glucose dans ce modèle.

Nous avons ensuite déterminé l'effet de la glucotoxicité pendant 72h sur les oscillations calciques et nous avons observé que le pattern oscillatoire était très différent. En HG, il est associé à une diminution de la fréquence des pics et l'aire sous la courbe en

comparaison à la condition contrôle (Ctrl) (Figure 39 A-D). On remarquera aussi que l'amplitude des pics en HG semble plus grande qu'en condition Ctrl. Celle des pics du Ctrl sont eux, par contre, plus faible mais les pics sont plus nombreux. De plus, le niveau basal de calcium est plus élevé dans la condition contrôle que dans la condition HG. Enfin on observe dans les 2 conditions une certaine synchronisation des oscillations entre les cellules. Cependant, cette étude préliminaire nécessite d'être optimisée et répétée.

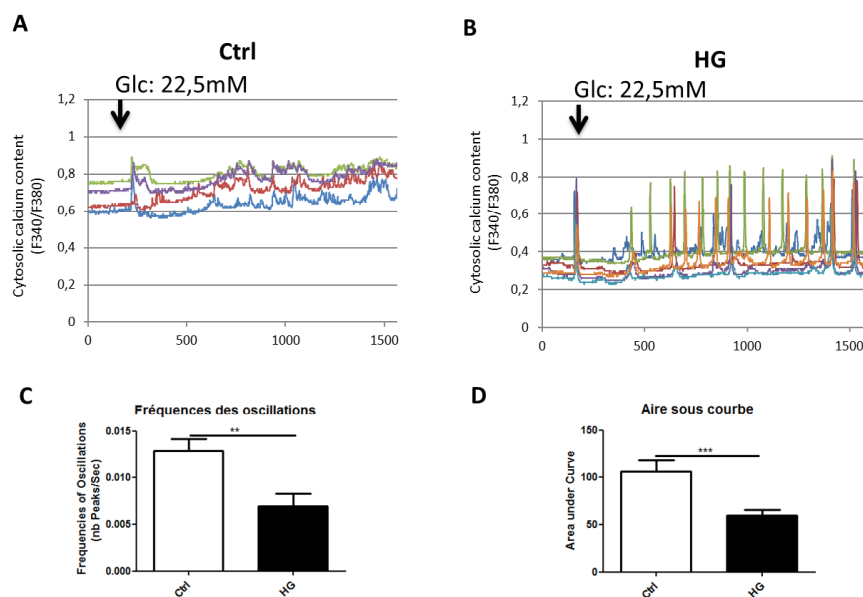


Figure 39 : Caractéristique des oscillations calciques en réponse 72h de glucotoxicité dans les INS-1E. A, B Représentation des patterns oscillatoires du calcium cytosolique en condition contrôle (Ctrl, A) ou en réponse à 72h de glucotoxicité (HG, B). C, Fréquence des oscillations. D, Aire sous la courbe. n=20 cells/conditions, 2 expériences, Man whitney, **P<0.01, ***P<0.001.

-Conclusions

En conclusion, ces résultats nous indiquent que les cellules INS-1E conservent une hiérarchisation cellulaire, qui pourrait se rapprocher du modèle de « pacemaker » et de « follower » décrit par Johnston et ses collaborateurs (Johnston et al., 2016) dans des modèles d'îlots murins. Ici, les cellules « pacemaker » correspondraient aux cellules qui oscillent directement après l'ajout du glucose (8% des cellules) et les cellules « followers » à celles oscillant tardivement (67%). 72h de glucotoxicité provoque des changements de pattern oscillatoire associés à une diminution de la fréquence des oscillations et d'une diminution de l'aire sous la courbe, montrant un effet délétère de la glucotoxicité. Cette

RESULTATS - Partie 2 : Etude de l'effet de la glucotoxicité sur les oscillations calciques cytosoliques

expérience reste très préliminaire et présente peu de cellules oscillantes par condition, elle nécessite d'être répétée et optimisée. De plus, nous n'avons pas étudié le délai de réponse au glucose dans cette dernière expérience.

Partie 3 : Etude de la sous-expression de différentes protéines des MAMs : Mfn2, Grp75, CypD (Données non publiées)

-Introduction

Mfn2, Grp75 et la CypD sont 3 protéines présentes aux MAMs (**Figure 23**). La Mfn2 se trouve dans les MAMs mais son rôle de linker ou de spacer est encore très controversé à ce jour (Filadi et al., 2017a). Grp75 est une protéine chaperonne qui permet l'interaction entre VDAC1 (mitochondrial) et IP3R (réticulaire), facilitant ainsi les transferts calciques entre les 2 organites. Le rôle exact de la CypD dans la formation des MAMs reste peu clair à ce jour, cependant quelques études montrent que sa sous-expression provoque la dissociation des contacts entre le RE et la mitochondrie (Tubbs et al., 2018, 2014), faisant de cette protéine une bonne cible pour moduler les MAMs. Nous avons tenté d'élucider les conséquences de la sous-expression de ces 3 protéines sur la sécrétion d'insuline et les MAMs dans la lignée INS-1E.

-Matériels et méthodes

Nous avons dans un premier temps testé l'effet des différents siRNA sur l'expression de la Mfn2, CypD ou de Grp75 dans la lignée de cellules β de rat INS-1E cultivées comme décrit dans l'article 1. La transfection a été réalisée via le DharmaFectDuo avec 20 μ M de siRNA. Le siRNA dirigé contre Grp75 est constitué d'un pool de 3 siRNA différentes pour améliorer l'efficacité de la sous-expression. Les expériences ont été réalisées 72h après transfection. Nous avons mesuré dans chaque condition l'expression protéique de Mfn2, Grp75 et CypD rapportées à la tubuline (par Western Blot), la quantité de MAMs (VDAC1-IP3R2) par PLA, la sécrétion d'insuline par GSIS (Techniques déjà décrites dans l'article 1). Ces résultats ont été générés à partir de 3 expériences indépendantes.

-Résultats

Nous avons observé que le siRNA Mfn2 diminue de 50% l'expression de la Mfn2, le siCypD de 25% l'expression de la CypD et les siGrp75 de 40% son expression (**Figure 40 A-B**). Néanmoins, la sous-expression de chacune de ces protéines ne semble pas affecter

l'expression des autres. Nous confirmons la controverse concernant le rôle de « tether » de la Mfn2, car la sous-expression de la Mfn2 augmente la proximité entre VDAC1 et IP3R2 mesurée par PLA, marqueur indirect des contacts entre la mitochondrie et le RE. D'autre part, comme attendu, le siGrp75 diminue ces contacts, le siCypD lui ne les modifie pas (**Figure 40 C**). Chaque siRNA diminue néanmoins la sécrétion de l'insuline, soulevant un rôle important de ces 3 protéines dans la régulation de la sécrétion d'insuline (**Figure 40 D**). Ces effets pourraient être MAMs dépendants compte tenu du rôle important de la Mfn2 ou de Grp75 dans la structuration des contacts entre le RE et la mitochondrie. Cependant, ces études nécessiteraient d'être approfondies et complétées par des mesures de transfert calcique entre le RE et la mitochondrie.

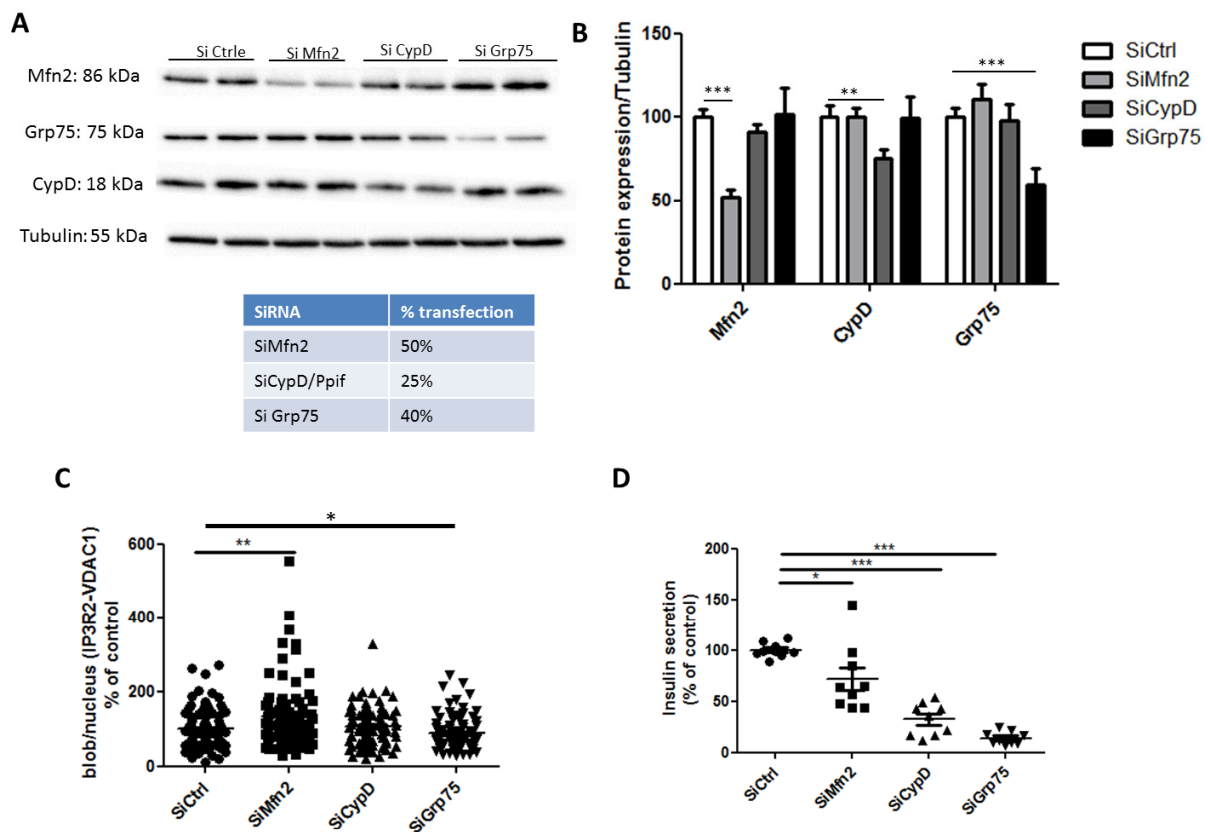


Figure 40 : Effet de la sous-expression de 3 acteurs aux MAMs, Mfn2, CypD et Grp75. A, WB représentant l'effet sur l'expression de Mfn2, CypD et Grp75 de l'utilisation de siRNA dirigé contre Mfn2, CypD et Grp75. B, Quantification du WB (n=7/conditions, 3 expériences). C, Effets des siRNA sur les contacts RE-mitochondrie visualisé par PLA dirigé contre VDAC1/IP3R2 (n= 90 images analysées/conditions, 2 expériences). D, Effets des siRNA sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (n=9/conditions, 3 expériences). Mann-whitney, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

-Conclusion

En conclusion, ces résultats montrent l'importance de la Mfn2, de Grp75 et de la CypD dans la sécrétion d'insuline. La Mfn2 semble jouer un rôle important dans la régulation des MAMs, sa sous-expression dans la cellule β augmente les contacts entre le RE et la mitochondrie et remet en cause son rôle de « tether ». Le rôle précis de Mfn2 dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline par les MAMs nécessite cependant d'être éclairci.

Partie 4 : Rôle protecteur de la modulation du translocon dans les effets délétères de la lipotoxicité. (Publié)

1) Résumé

-Introduction

Le diabète de type 2 est une pathologie complexe, qui mêle des facteurs environnementaux et génétiques. Les risques de développement du diabète de type 2 sont plus forts lors d'une consommation excessive d'AG libres (Charles et al., 1997). Le palmitate est l'AG le plus abondamment trouvé dans le sang et son exposition prolongée est associée avec le développement de résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques comme le muscle, le foie ou encore le tissu adipeux. L'exposition chronique aux AG nommé lipotoxicité induit des altérations fonctionnelles de la sécrétion d'insuline via le développement d'un stress du RE et de la génération de stress oxydant. Les mécanismes précis qui entrent en jeu dans cette dysfonction β pancréatique restent cependant encore flous. Dans ce contexte, le stress du RE se caractérise par l'activation des voies UPR et la dérégulation des stocks calciques réticulaires. Le translocon, impliqué dans la translocation des protéines lors de la traduction est un canal de fuite calcique (Flourakis et al., 2006). La fonctionnalité et le rôle précis du translocon dans des conditions physiologiques ou de lipotoxicité n'ont cependant jamais été étudiés dans la cellule β pancréatique.

-Matériels et méthodes

Des îlots humains et une lignée murine de cellules β MIN6-B1 ont été utilisés. Des modulateurs de l'activité du translocon ont été utilisés, notamment la puromycine, un activateur et l'anisomycine un bloqueur du translocon pour évaluer le rôle du translocon dans la sécrétion d'insuline et dans la dysfonction β pancréatique associée à la lipotoxicité. Les quantités de calcium dans le RE ont été évaluées par l'utilisation de sondes calciques cytosolique et réticulaire.

-Résultats

Tout d'abord, nous avons pu démontrer que le translocon était fonctionnellement impliqué dans l'homéostasie calcique au sein de la cellule β pancréatique, ce canal de fuite est présent à la fois dans le modèle humain et murin. Comme attendu, la lipotoxicité altère la sécrétion d'insuline par une induction du stress du RE et une déplétion des stocks calciques cytosoliques. L'inhibition du translocon protège partiellement contre les effets délétères du palmitate. Elle réduit la déplétion calcique et modère l'induction des voies UPR. De plus, l'inhibition du translocon permet de restaurer la sécrétion d'insuline dans les îlots humains.

-Conclusion

Le translocon semble être un acteur important de la dysfonction β pancréatique associée à la lipotoxicité. Différents acteurs sont capables de moduler le translocon comme Grp78. Cette chaperonne du RE pourrait bloquer la fuite calcique, cependant Grp78 est sollicitée lors de l'activation des voies UPR et pourrait être impliquée dans les effets délétère du stress du RE sur les stocks calciques réticulaires. La modulation du translocon par l'anisomycine a des effets bénéfiques et protège la cellule β de la dysfonction associée à la lipotoxicité, ce qui place le translocon comme une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre du diabète de type 2.

2) Article n°2



RESEARCH ARTICLE

Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon

R. Cassel¹*, S. Ducreux²*, M. R. Alam², F. Dingreville¹, C. Berlé¹, K. Burda-Jacob¹, M. A. Chauvin¹, K. Chikh¹, L. Païta², R. Al-Mawla², C. Crola Da Silva², J. Rieusset¹, C. Thivolet^{1,3}, F. Van Coppenolle^{2†}, A. M. Madec^{1†*}

1 Inserm UMR-U1060 CarMeN Laboratory, University Lyon 1, INRA U1235, INSA-Lyon, Facultés de médecine Charles Mérieux Lyon-Sud, F-69003 Lyon, France, **2** Inserm UMR-U1060 CarMeN Laboratory, University Lyon 1, INRA U1235, INSA-Lyon, Facultés de médecine Rockefeller, F-69003 Lyon, France, **3** Hospices Civils de Lyon, Hôpital Lyon-Sud, Service d'Endocrinologie, Diabétologie et Nutrition, F-69310 Pierre Bénite, France

* These authors contributed equally to this work.
† These authors also contributed equally to this work.
* anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr



OPEN ACCESS

Citation: Cassel R, Ducreux S, Alam MR, Dingreville F, Berlé C, Burda-Jacob K, et al. (2016) Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. PLoS ONE 11(2): e0148686. doi:10.1371/journal.pone.0148686

Editor: Amar Abderrahmani, Communauté d'Universités et d'Établissements Lille Nord de France, FRANCE

Received: September 5, 2015

Accepted: January 20, 2016

Published: February 10, 2016

Copyright: © 2016 Cassel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by INSERM (Institut national de la santé et la recherche Médical) (FR) and Université Claude Bernard Lyon1 (FR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Type 2 diabetes is characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic beta cell dysfunction. Elevated free fatty acids (FFAs) may impair beta cell function and mass (lipotoxicity). Altered calcium homeostasis may be involved in defective insulin release. The endoplasmic reticulum (ER) is the major intracellular calcium store. Lipotoxicity induces ER stress and in parallel an ER calcium depletion through unknown ER calcium leak channels. The main purposes of this study is first to identify one of these channels and secondly, to check the opportunity to restore beta cells function (i.e., insulin secretion) after pharmacological inhibition of ER calcium store depletion. We investigated the functionality of translocon, an ER calcium leak channel and its involvement on FFAs-induced alterations in MIN6B1 cells and in human pancreatic islets. We evidenced that translocon acts as a functional ER calcium leak channel in human beta cells using anisomycin and puromycin (antibiotics), respectively blocker and opener of this channel. Puromycin induced a significant ER calcium release, inhibited by anisomycin pretreatment. Palmitate treatment was used as FFA model to induce a mild lipotoxic effect: ER calcium content was reduced, ER stress but not apoptosis were induced and glucose induced insulin secretion was decreased in our beta cells. Interestingly, translocon inhibition by chronic anisomycin treatment prevented dysfunctions induced by palmitate, avoiding reticular calcium depletion, ER stress and restoring insulin secretion. Our results provide for the first time compelling evidence that translocon actively participates to the palmitate-induced ER calcium leak and insulin secretion decrease in beta cells. Its inhibition reduces these lipotoxic effects. Taken together, our data indicate that TLC may be a new potential target for the treatment of type 2 diabetes.

Introduction

Type 2 diabetes is a worldwide multifactorial disease characterized by peripheral insulin resistance and pancreatic beta cell dysfunction [1,2]. This heterogeneous disease results from a complex environment-inheritance interaction [3]. Free fatty acid (FFA) levels are an independent predictor of future type 2 diabetes [4]. High intake of saturated fatty acids (FFAs) has also been linked to higher risks of type 2 diabetes [5]. Previous studies have shown that palmitate, the most abundant saturated FFA in blood, inhibits insulin signaling in liver, muscle, and fat cells *in vitro* [6–8]. These studies have also shown the deleterious effects of FFAs, collectively termed “lipotoxicity”, on beta cells *in vitro* [9]. Mainly based on the findings of *in vitro* studies, it was proposed that beta cell lipotoxicity is directly induced by palmitate at least in part via pathways involving endoplasmic reticulum (ER) stress and reactive oxygen species (ROS) [10,11], inflammation [12] and autophagy [13]. Similarly, prolonged *in vivo* infusion of FFAs impairs beta cell function in rodent models and in humans [14]. However, molecular mechanisms by which FFAs induce beta cell dysfunction *in vivo* remain poorly understood.

Chronic exposure to saturated FFAs was shown to enhance the unfolded protein response (UPR) of ER. This phenomenon foremost protects the cells by promoting the folding of proteins in the ER lumen and/or their degradation by the 26S proteasome. On the contrary, a prolonged UPR could also trigger apoptosis if ER function is not preserved or restored [15–17]. Due to high insulin protein production, beta cells are particularly susceptible to the activation of UPR and ER stress. Particularly, the phosphorylation of PERK and the induction of the transcription factor CHOP is a key feature for the saturated FFA-induced progression to apoptosis [18,19]. Relevance of these *in vitro* models to human disease was confirmed by the enhanced expression of ER stress markers in beta cells of type 2 diabetic patients [16,17] and by the recent clinical trial of an ER stress reducing drug (phenylbutyric acid), which improved beta cell functions caused by prolonged hyperlipidemia [20]. Thus, how mechanically ER stress is induced by saturated FFAs is still an unanswered question. ER stress is due to the accumulation of unfolded proteins within the ER and/or the depletion of calcium stores [21,22], both leading to apoptosis.

Altered cellular calcium homeostasis may be involved in defective insulin release [23]. Calcium plays an important role in ER stress and in UPR, and the regulation of ER calcium homeostasis is closely linked to precise control of ER calcium leak channels permeability. Indeed, ER calcium concentration is an equilibrium between ER calcium entry through SERCA pumps and calcium leak via opened calcium leak channels. These channels, involved in ER stress transduction pathways, are not yet characterized in pancreatic beta cells. Gwiazda *et al.* pointed out a direct link between ER calcium decrease with ER stress in human islets and MIN6 murine beta cells [23]. However, the molecular mechanisms of calcium dysregulation during ER stress in beta cells are still unknown. Therefore, the modulation of ER calcium permeability during UPR could be a useful way to better understand ER calcium involvement in UPR in physiological and pathological conditions especially in type 2 diabetes.

In previous studies [24,25], we have shown that translocon, a complex involved in protein translocation during translation [26], is an ER calcium leak channel in human cancerous prostatic cells. Translocon has also been demonstrated to act as a calcium leak channel by other groups and in several cell types: in *Xenopus* oocytes [27]; in rat liver microsomal vesicles [28]; in Sec61 proteoliposomes obtained from dog pancreas [29,30] and in mouse pancreatic acinar cells [31]. Recently, we further demonstrated that ER calcium depletion by thapsigargin (an inhibitor of SERCA pumps and an ER stress inducer) occurs mainly via translocon, which is also implied in the unfolded proteins retro-translocation for their degradation by the 26S proteasome [32]. This process is called ERAD for ER-associated degradation [33]. In parallel to ER

protein retro-translocation through translocon, calcium may follow the same way. In this study, we investigated for the first time the functionality of translocon in the calcium homeostasis of pancreatic beta cells and its involvement in palmitate-induced alterations of both human pancreatic islets and murine beta cells.

Material and Methods

Islet culture

Human pancreatic islets from 8 non-diabetic donors (Table 1) were obtained through the Geneva European Consortium for islet transplantation (ECIT) and Grenoble Cell Therapy Unit (UMTC). The use of human islet preparations for experimental research was approved by the Institutional Review Board for clinical research of the Departments of Neurology, Dermatology, Anesthesiology and Surgery of the University Hospital of Geneva (CER Nr. 05–028). The Geneva University Hospital ethical institution waived the need for consent from the donor. Islets were used for experimental research only when not suitable for clinical purposes and with the intention to be destroyed. In such cases, obtaining informed consent is not mandatory in Europe. Tissues samples were not procured from a tissue bank. Our ethical review board of Lyon-Sud Medicine Faculty specifically approved this study.

Islets (purity 80%) were processed as described previously [34], and cultured in a DMEM medium containing 5.5 mM glucose and 5% (vol./vol.) SVF. For treatments, islets were incubated with either BSA or palmitate/BSA (6:1, 500 μ M) during 48h, in presence or absence of anisomycin (200nM or 500nM).

MIN6B1 culture

Murine beta cells MIN6B1 (provided by Dr. Jun-Ichi Miyazaki, OUMS, Osaka, Japan) were cultured in DMEM medium containing 15% SVF, 2 mM glutamine, 100U/ml penicillin, and 100mg/l streptomycin.

Insulin secretion study

At the end of the 48h incubation period, islets were kept at 37°C for 45 min in DMEM 5.5 mM glucose and 5% SVF. To assess insulin basal secretion, 50 islets were incubated in KRBH containing 5.5 mM glucose, 5% SVF during 45 min then challenged with 16.7 mM glucose, 5% SVF to assess glucose-stimulated insulin release (GSIS) as previously described [34]. Insulin was quantified using a highly specific immuno-radiometric assay (IRMA) (Bi-insulin IRMA,

Table 1. Characteristics of human islet donors.

N°	Gender	Age (y)	BMI (kg/m ²)
1	M	48	23.2
2	M	58	29.3
3	F	54	24.7
4	M	54	26.7
5	M	53	27.8
6	M	39	22.0
7	F	38	23.0
8	M	39	22.9
Moyenne		47.9	25.0
SEM		2.9	0.9

doi:10.1371/journal.pone.0148686.t001

Cis-Bio International, Gif sur-Yvette France). Islet proteins were used to normalize the secretion values. So insulin expression was expressed in mU/L/ μ g Prot /H. The quality of the islets was assessed by the high 15.5/5.5 mM Glucose stimulated insulin secretion (4.09 ± 0.88 mU/L/ μ g Prot/H). Due to the high inter-islet variability of insulin secretion (5.5mM glucose basal range: 170–1761 mU/L; 16.5 mM glucose stimulated range: 1410–8786 mU/L), final results were expressed in % of control condition.

Adenoviral constructions and cell infection

Recombinant adenoviral constructs carrying the cDNA of GRP78 was a generous gift of Tatsuhiro Koike, (Hokkaido University, Sapporo, Japan). Adenovirus was amplified in HEK293 cells and purified on a cesium chloride gradient (7.5×10^8 IFU/ μ L). Recombinant adenoviral constructs carrying the cDNA of Renilla Luciferase (control; 10^8 IFU/mL) and D4-ER (5.7×10^7 IFU/mL) were generous gifts of Etienne Lefai (INSERM 1060). Infections of MIN6B1 cells were performed in complete medium.

Transfection

GRP78 silencing was performed using siGRP78 ($5'$ -GGAGCGCAUUGAUACUAGA- $3'$) in MIN6B1 cells. Control siRNA (siLuc) experiments were performed by transfecting siRNA against luciferase ($5'$ -CUUACGUGAGUACUUCGA- $3'$; Dharmacon). Transfection was performed with jetSI ENDO (Polyplus Transfection, Illkirch, France). Protein knockdown was measured after 48H using Western blot assay.

Intracellular calcium measurements

To measure intracellular calcium concentration dynamics, experiments were performed using the membrane-permeable calcium-sensitive dye Fura-2 AM, as detailed previously [34] in human islets of Langerhans and MIN6B1 cells. All experiments were done in calcium-free medium.

To assess translocon involvement in cellular calcium homeostasis in human pancreatic islets and MIN6B1 cells, thapsigargin (1μ M) was used as SERCAs blocker, leading to a almost full calcium leakage from the ER to the cytosol. The subsequent increased Fura-2 fluorescence was attributed to the ER calcium content. Puromycin (200μ M), a specific translocon opener [24,25], was used alone to determine if translocon opening facilitated ER calcium leak. To verify that this ER calcium liberation was due to translocon calcium activity, we pretreated cells with anisomycin (200μ M), a specific translocon blocker, which abrogated puromycin action. Anisomycin was added 30 minutes before puromycin incubation.

Calcium response to chronic treatment of anisomycin (200 nM) and/or puromycin (200 nM), ($IC_{50} = 10 \mu$ M; delay = $130s \pm 10$ for both) was obtained by culturing both MIN6B1 and human islets, in their respective cultured medium, during 48h. The concentrations used, in both acute and chronic conditions, are in accordance with those of our previous work [32]. Anisomycin was added 30 min before puromycin stimulation.

Measurement of ER luminal Ca^{2+}

ER Ca^{2+} in MIN6B1 cells was measured with FRET-based genetic sensors (D1ER or Ad-D4ER) by following live single-cells approach using a widefield microscopy system (Leica Microsystems, France). For Ad-D4ER, cells were infected with the virus particles 48 hours before the experiment while in case of D1ER cells were co-transfected with D1ER plasmid and the respective siRNA in order to use the D1ER as a Ca^{2+} sensor on one hand and as a transfection marker

on the other hand. All experiments were performed in a nominal Ca^{2+} -free KRB solution with or without thapsigargin addition as described for FURA-2 AM experiments. Both the sensors were excited at a wavelength of 430 nm and emissions were collected at 480 nm and 530 nm. Data was acquired using the MetaFluor Imaging software (Leica Microsystems, France) and analyzed with MS Excel and Graphpad Prism softwares to correct for background and photobleaching.

Quantification of mRNAs

Total mRNA samples were prepared as previously described [34]. To monitor ER stress markers, we measured mRNA levels of glucose response protein 78 (GRP78), X-box binding protein-1 (spliced XBP1 and total XBP), activating transcription factor 4 (ATF4), and C/EBP homology protein (CHOP). We also measured SEC61 α , one of the most expressed subunits of the translocon, to evaluate translocon expression modifications in our conditions. Values were normalized using TATA box binding protein mRNA (TBP). Primers are listed in [S1 Table](#).

Caspase activation

Caspase -2 to 10- activation was measured with the Homogeneous Caspases Assay (Roche Diagnostics, Manheim, France), following the manufacturer instructions. Human islets were cultured in black-walled-96-well microplates. At the end of treatment, free Rhodamine-110 concentrations were determined in a plate-reading luminometer ($\lambda_{ex} = 485\text{nm}$, $\lambda_{em} = 510\text{nm}$).

Statistical analysis

Data are given as means \pm SEM. Statistical analysis were performed using the unpaired Student's *t*-test (for 2 groups) or by 2-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls post test (for groups of 3 or more). A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. Origin computer program (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) and Graphpad Prism were used for calcium concentration curve generation and statistical analysis.

Results

We both used anisomycin and puromycin to respectively close and open translocon as previously described [24,25,32]. As anisomycin is an antibiotic that inhibits protein translation at high concentration, we checked by dose-dependent assay that it does not inhibit protein synthesis during chronic treatments. Anisomycin did not affect protein translation until 0.5 μM and reduced it by more than 50% at 1 and 2 μM ([S1 Fig](#)).

Translocon is functionally involved in beta cell calcium homeostasis

ER is a major internal calcium storage organelle in beta cells, which acts as a calcium buffer that regulates calcium-dependent signaling in the cytosol. As we hypothesized that translocon could be involved in global calcium homeostasis of beta cell as an ER calcium leak channel, we first measured puromycin action on ER calcium content in human islets and in MIN6B1 cells. Cytosolic calcium was thus evaluated using the ratiometric Fura-2 AM probe, each ER calcium release would be seen by an increase of the Fura-2 ratio signal. This method is commonly used to appreciate ER calcium content [32]. Another benefit of Fura-2AM is also to directly measure a ratio which allows to quantitatively compare the effects of treatments on the resting cytosolic calcium concentration and on the ER calcium content [32]. In human islets, puromycin

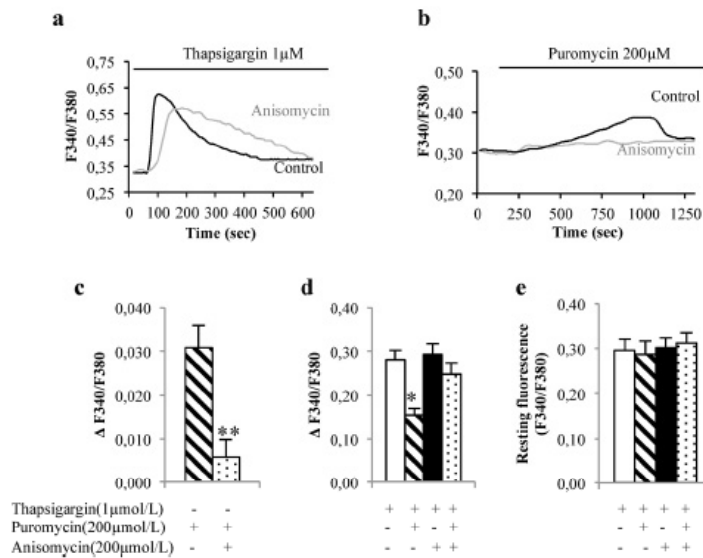


Fig 1. Puromycin and anisomycin acute effects on calcium homeostasis in human islets. Puromycin and anisomycin effects were evaluated in 4 different human islets preparation (44 different cells) (a-e). Typical cytosolic calcium traces in response to 200 μM thapsigargin (a) or to 1 μM puromycin (b) under control conditions and after 30 min incubation with 200 μM anisomycin. Cumulative data of peak cytosolic calcium increases evoked by puromycin responses under control conditions and with anisomycin 200 μM (c). Cumulative data of peak cytosolic calcium increases evoked by thapsigargin responses (d) and (e) resting fluorescence (F340/F380) under control conditions ± puromycin or anisomycin pretreatment. *p<0.05, **p<0.01. Measures were assessed in a calcium-free medium. Preparations were done in duplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0148686.g001

induced an increase in cytosolic calcium concentration. This effect was partly abolished by a 30 min pretreatment with anisomycin (Fig 1A and 1C).

We next investigated the reticular calcium pool by comparing the amplitude of calcium peak obtained after adding thapsigargin (Tg) (a SERCA inhibitor) in a calcium-free medium, with puromycin (200 μM) and/or 30 minutes pretreatment with anisomycin (200 μM) of human islets and MIN6B1. As expected, Tg elicited a transient cytosolic calcium increase in human islets (Fig 1A and 1D). Puromycin pretreatment significantly reduced Tg-induced ER calcium release as compared to control conditions (Fig 1B and 1D). Anisomycin alone was ineffective in Tg response (Fig 1A and 1D). Puromycin, combined with anisomycin, failed to decrease Tg response (Fig 1B and 1D). These results suggest that puromycin pretreatment partly depletes ER calcium content via opening of the translocon leading to a decrease in Tg-induced ER calcium release. We finally checked the impact of puromycin and anisomycin on the resting calcium concentration and found that the basal calcium level remained similar to control conditions in human islets, whatever the pretreatments were (Fig 1E).

Next, we performed similar experiments in MIN6B1 cells, and found that puromycin (200 μM) also induced an ER calcium release, which was inhibited by anisomycin pretreatment (200 μM; S2 Fig). Resting calcium concentrations were not affected by the different pretreatments (S2 Fig). As observed in human islets, the Tg-induced ER calcium release was significantly decreased by puromycin pretreatment as compared to control conditions (S2 Fig).

To exclude the hypothesis that the $[Ca^{2+}]_{ER}$ decrease induced by puromycin was mediated by agonist-activated Ca^{2+} release channels, we perfused the IP3 receptor inhibitor (xestospongin C; 3 μ M) and the ryanodine receptor inhibitor (ryanodine; 50 μ M) in MIN6B1 cells. The [S3 Fig](#) illustrates the effect of puromycin alone ($100 \pm 20.03\%$; control condition; $n = 12$ cells) or in the presence of anisomycin ($24.78 \pm 7.12\%$; $p < 0.001$ vs. puromycin; $n = 14$ cells) in MIN6B1 cells. We have not observed a significant modification of puromycin effects on ER calcium release with ryanodine ($66.1 \pm 9.93\%$ vs. control; $p = NS$) and xestospongin C ($73.03 \pm 10.2\%$ vs. control; $p = NS$) ([S3 Fig](#)).

To further characterize the involvement of TLC in ER Ca^{2+} leak, we directly measured the luminal ER Ca^{2+} using genetically-encoded FRET based sensor which are targeted to ER with high efficiency ([S4 Fig](#)). After 48 hours of Ad-D4ER infection MIN6B1 cells were pre-treated with anisomycin for 20 minutes and compared with non-treated cells. Anisomycin was kept throughout the acquisition period. After an initial measurement of basal FRET ratio cell were treated with TG in order to estimate the leak-mediated ER Ca^{2+} depletion ([S4\(A\) Fig](#)). In agreement with cytosolic Ca^{2+} data, anisomycin treatment effectively suppressed the TG-induced ER Ca^{2+} depletion as displayed by a significant reduction in the $\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$ before and after TG stimulation ([S4\(B\) Fig](#)). However, these results can be an outcome of a low ER Ca^{2+} content due to anisomycin treatment. In order to answer this question we measured the resting levels of luminal ER Ca^{2+} by using the same data set. Interestingly our analysis revealed an increase in the basal ER Ca^{2+} in anisomycin group ([S4\(C\) Fig](#)) highlighting an effect of anisomycin on the resting ER Ca^{2+} levels probably due to an inhibition of Ca^{2+} leak under basal conditions in this cell type.

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

Translocon inhibition partially prevents palmitate-induced reticular calcium depletion

As mentioned earlier, ER stress is linked to ER calcium depletion. In this context, we wanted to know if pharmaceutical modulation of translocon opening could modify ER calcium content in a long-term manner in both control and palmitate-treated conditions. To establish the characteristics of the intracellular calcium pools, we first analyzed the resting concentration in cytosol of human islets exposed to palmitate (500 μ M) with or without anisomycin (200 nM). We observed that chronic treatment (48h) with palmitate did not change resting calcium as compared to control conditions in human islets ([Fig 2A](#)). Chronic addition of anisomycin has not altered resting calcium in control condition in human islets ([Fig 2A](#)). Resting calcium in human islets exposed to palmitate and anisomycin was similar compared to palmitate condition ([Fig 2A and 2C](#)). After Tg stimulation, reticular calcium concentration was reduced in human islets exposed to chronic palmitate treatment ([Fig 2B](#)). Addition of anisomycin partially restored reticular calcium content ([Fig 2B](#)). Anisomycin did not modify ER calcium content in basal conditions ([Fig 2B and 2D](#)).

Similar results were obtained in murine pancreatic beta cells MIN6B1 treated by palmitate ([S5 Fig](#)).

We previously modulated the permeability of translocon using pharmacological compounds. One way would have been to inhibit Sec61 α expression using siRNA. Nevertheless, as Sec61 α is one of the major subunit of the translocon, the decrease of its expression is deleterious for protein synthesis and cell survival. So, as shown in [S6 Fig](#), we then overexpressed GRP78 (also called as Bip) using adenoviruses in Min6B1 cells. GRP78 is present in the ER lumen where it interacts with many other proteins in the lumen and/or ER membrane including translocon [[11,17](#)]. By binding the luminal side of translocon it has been proposed to block

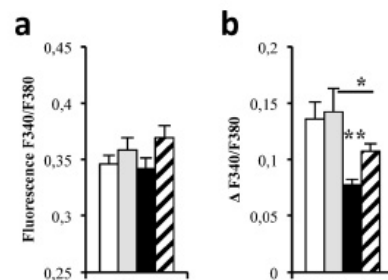


Fig 2. Translocon inhibition partially prevents palmitate-induced reticular calcium depletion. Quantification of fluorescence ratio (F340/F380) of resting calcium (a) and of reticular calcium release induced by 1 μ M thapsigargin (b) in 4 different human islets preparations (11 cells per preparation) under 48h BSA (white bar) + anisomycin (grey bars and palmitate (black bar) conditions + anisomycin (hatched bars). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0148686.g002

the ER Ca^{2+} leak [32,33]. We used a Renilla Luciferase-adenovirus as a control. Resting calcium concentration is not modified by GRP78 overexpression neither in BSA nor in palmitate condition (S6 Fig). ER calcium content was appreciated using TG response. As expected, palmitate treatment decreases ER calcium concentration (S6 Fig). GRP78 overexpression is here ineffective to significantly restore ER calcium content. Quantitative analysis of GRP78 expression was appreciated using Western blot (S7 Fig). We also checked siRNA-mediated knock-down of GRP78 (S8 Fig). We did not notice any differences between ER calcium content in control and in siRNA treated cells using ad-D4ER or Fura-2 (data not shown).

Translocon expression is not modified by palmitate

The translocon complex is composed of several protein complexes. One of which is Sec61 α and is involved in the structure of the pore. Here, we measured whether palmitate (500 μ M) and/or anisomycin (200 nM) treatments could alter the SEC61 α mRNA expression. Palmitate did not modify SEC61 α mRNA expression in human islets (91.38 \pm 3.89% vs. control; $p = NS$). Anisomycin alone or in combination with palmitate did not modify Sec61 α mRNA expression (94.18 \pm 1.97% vs. control; $p = NS$). Anisomycin in basal conditions did not have any effect on this expression (109.37 \pm 22.27% vs. control). These data suggest that the anisomycin capacity to restore ER calcium content under palmitate stress could not be attributed to major variations in the translocon mRNA expression.

Translocon inhibition partially modulates palmitate-induced ER stress

As palmitate is a cause of ER stress in beta cells, we investigated the capacity of anisomycin (200 nM) to reduce the ER stress in pancreatic beta cells in response to palmitate (500 μ M).

Human islets, cultured for 48h in presence of palmitate, showed a significant increase of both GRP78 (Fig 3A), CHOP (Fig 3B) and XBP1s (Fig 3D) mRNA levels, whereas ATF4 was not modified (Fig 3C). Anisomycin had no effect on ER stress markers mRNA expression in basal conditions but significantly reduces GRP78 and CHOP mRNA levels in palmitate conditions in human islets (Fig 3A and 3B).

Palmitate treatment does not activate caspase activity in human islets

To assess survival of cells, we next evaluated caspase activity via free Rhodamine-110 measurement in human islets cultured in BSA or palmitate (500 μ M) conditions in presence or absence

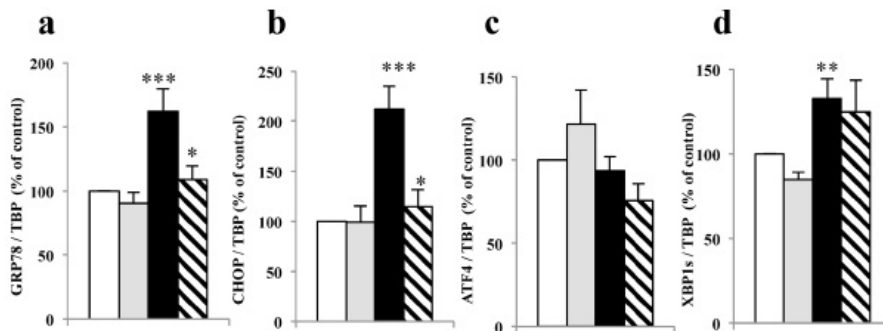


Fig 3. Translocon inhibition partially modulates palmitate-induced ER stress. ER stress mRNA expression markers were measured after 48h BSA (white bar) + anisomycin (grey bars) or palmitate (black bar) + anisomycin (hatched bars) treatment in 5 different human islet preparations. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0148686.g003

of anisomycin (200 nM). No caspase activation was significantly induced by palmitate in the tested set of human islets in our culture conditions ($119.97 \pm 16.96\%$ vs. control; $p = \text{NS}$) and anisomycin treatment did not modify caspase level in both basal and palmitate conditions ($103.23 \pm 8.6\%$ and $143.34 \pm 16.60\%$ vs. control respectively; $p = \text{NS}$).

Anisomycin restores GSIS in palmitate condition in human islets

We finally measured the beta cell function in our conditions. Palmitate (500 μM) significantly reduced the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in human islets ($59.33 \pm 10.41\%$ vs. control; $p < 0.01$) (Fig 4). Interestingly, the inhibition of translocon opening by anisomycin treatment completely prevented the palmitate-induced dysfunction of human islets ($133.17 \pm 32.90\%$ vs. $59.33 \pm 10.41\%$ $p < 0.05$) (Fig 4). Anisomycin did not modified GSIS in basal conditions ($92.96 \pm 6.01\%$ vs. control; $p = \text{NS}$).

Discussion

In type 2 diabetes, prolonged exposure to FFAs contributes to insulin resistance and beta cell dysfunction [35, 36]. These data are reinforced by the last results from the large longitudinal

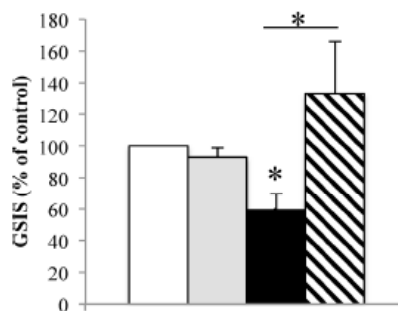


Fig 4. Anisomycin restores GSIS in palmitate condition in human islets. GSIS were measured after 48h BSA (white bar) + anisomycin (200 nM; grey bars) or palmitate (black bar) treatment + anisomycin (200 nM; hatched bars) in 6 human islet different preparations. * $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0148686.g004

prospective study of the EPIC-InterAct case-cohort showing a positive association between plasmatic palmitic acid and incidence of type 2 diabetes [37]. Saturated FFAs, either through oversupply or inappropriate metabolism in the beta cells appear to be one of the primary triggers. Nevertheless, the molecular mechanisms involved in this pathology remain poorly understood [38]. Lipotoxicity is associated with ER calcium depletion and ER stress [39]. An increase in ER calcium efflux first depletes the stores, secondly induces ER stress and finally triggers apoptosis [40]. There is so a need to identify by which pathways calcium leaks from the ER of pancreatic beta cells submitted to lipotoxicity in order to find out drugs to restore ER calcium homeostasis. In addition, knowledge of modulation of ER calcium efflux during lipotoxicity would be useful for a better understanding of the ER calcium involvement in type 2 diabetes. This current study provides several important advances in this context.

We, and other groups, have demonstrated in several models that translocon is an ER calcium leak channel [24,25,27–31]. In addition, we have also shown that translocon is an ER calcium leak channel involved in ER calcium depletion in human cancerous prostatic cells in ER stress conditions [24]. This last study highlights the potential role of translocon in physiopathology. Translocon is an ubiquitous multiprotein complex also implied in protein translation and protein retro-translocation from the ER lumen to the cytosol, to be addressed to their target location. Accumulation of unfolded proteins leads to ER stress and UPR [17]. These unfolded proteins are retro-translocated from the ER lumen to the cytosol, through the translocon, and degraded by the proteasome [41,42]. ER stress is largely investigated currently in the literature and is shown to be central in a lot of cells integrated answers to glucolipotoxicity [43]. Furthermore, it is well established that under resting conditions, GRP78 (also called BiP) binds to the luminal part of ER membrane proteins like IRE1, PERK and ATF6, involved in UPR pathway (for review, see [11,17]). GRP78 is also known to seal the pore of the translocon [44] and so possibly inhibits ER calcium leak [32]. Accumulation of unfolded proteins induces ER stress, so GRP78 is released from IRE1 α , PERK, ATF6 and then triggers the UPR response and probably enhances ER calcium depletion.

In the present work, we hypothesized that translocon could be one of the ER calcium leak channel involved in ER calcium depletion in pancreatic beta cells in physiologic and lipotoxic conditions. We found that its inhibition in lipotoxic conditions maintains beta cell calcium homeostasis and restores insulin secretion in human islets. Interestingly, a point mutation in mice was shown to be responsible for the development of type 2 diabetes [45]. Lloyd and coll. have demonstrated that insulin insufficiency was due to ER stress-induced apoptosis [46]. This interesting article highlights the fact that Sec61 α , and so the translocon, appear to be involved in ER homeostasis in beta cells. Any perturbations of translocon either due to a mutation [47] or to pharmacological modulation (present work) may have important consequences in beta cell functions.

ER homeostasis is linked to regulation of its luminal calcium concentration, resulting from a right balance between intracellular calcium pumps and passive calcium leak channels. We demonstrate here that translocon acts as a functional ER calcium leak channel in pancreatic beta cells by measuring, in MIN6B1 cells and in human islets, a significant ER calcium depletion in response to acute perfusion of puromycin, which was abrogated by anisomycin. Anisomycin and puromycin did not modify the resting calcium concentration in the both models. Puromycin-induced ER calcium depletion in beta cells is specific to translocon as demonstrated in other cell types [24,30,31]. Indeed, previous inhibition of ryanodine receptors or IP₃ receptors did not change either puromycin action on ER calcium content or its inhibition by anisomycin. These results highlight the involvement of translocon in ER calcium homeostasis as a functional reticular calcium leak channel in beta cells. In future studies, luminal and

mitochondrial targeted calcium probes will help to precise the fine tuning that operates on translocon.

ER calcium homeostasis is involved in many cellular functions like ER stress and apoptosis in beta cells [46]. We first measured the long-term effects of palmitate on ER calcium content and the putative ability of anisomycin to maintain ER calcium homeostasis and beta cell function. Chronic palmitate treatment induced an ER calcium decrease and anisomycin partially protected ER calcium stores from depletion in human islets. We obtained similar results in murine pancreatic beta cells MIN6B1 treated by palmitate. GRP78 overexpression also did not change the resting calcium concentration in Min6B1 cells in control and in palmitate conditions. As expected, ER calcium content was enhanced in Min6B1 cells overexpressing GRP78 in control condition: GRP78 seals the pore of translocon and then reduces basal calcium leak. Nevertheless, this effect was not observed in chronic palmitate conditions. This may be due to a not enough effective GRP78 overexpression in our experimental conditions. To our knowledge, these data demonstrate for the first time that palmitate-induced toxicity may enhance ER calcium depletion via translocon. However we must noticed some limitations of the use of modulations of GRP78 expression. It was previously shown that overproduction of the ER chaperone GRP78 partially protects against the effects of palmitate in MIN6 cells [47] on ER stress effectors as Chop and XBP1. Therefore the overexpression of GRP78 could affect not only the activity of the translocon but will also improve ER homeostasis and attenuate ER stress. It would be very difficult to distinguish between the effects on the activity of the translocon and the general improvement of ER homeostasis.

To go further, we next measured the action of palmitate and anisomycin on SEC61 α 1 expression. Recently, Cnop *et al.* [48] examined the transcriptome of human islets submitted to palmitate. Among all the genes studied, expression levels of transcripts for SEC61 α 1 and GRP78 were enhanced, highlighting the importance of translocon in lipotoxic islets. In our study, we did not notice an enhancement of the amount of mRNA for SEC61 α 1 whatever the experimental conditions. We hypothesized that anisomycin beneficial effects on ER calcium content is due to a direct action on its calcium activity and not its expression. Furthermore, we verified that anisomycin did not altered translation in a dose-dependent experiments. This result indicates that translocon is still functional for protein translation and could liberate calcium from the ER to the cytosol each time a protein is going through its pore.

We investigated the other arms of ER stress. Human islets were cultivated in mild palmitate chronic conditions to try to mimic first phase of type 2 diabetes [35,36,49]. Human islets showed an ER stress with mRNA overexpression of GRP78, known to allow UPR, and of CHOP and of XBP1s, ATF4 was not overexpressed under these conditions. These results on human islets, are in accordance with those from Boslem *et al.* showing in MIN6 cells that mild palmitate chronic treatment activated preferentially some ER stress pathways rather than others [50].

Our model of human islets treated with palmitate displayed an up-regulation of GRP78 and unspliced/spliced XBP1 with elevated levels of CHOP which is considered the activator factor of apoptotic pathways elicited by ER stress. In accordance with the fact that caspases were not activated by palmitate treatment in our conditions, we conclude that we have induced a mild ER stress in human islets as observed in the first phase of type 2 diabetes. We speculate that in the long term, calcium depletion and ER dysfunction could have a detrimental effect on beta cell survival. Indeed, a recent study has demonstrated that Ca²⁺ depletion induced by thapsigargin is associated with activation of ER stress, causing upregulation of both GRP78 and CHOP, eventually inducing cell death [51].

Anisomycin partially improves the reticular calcium concentration and was able to prevent palmitate-induced ER stress at GRP78 and CHOP mRNA levels. It is also interesting to notice

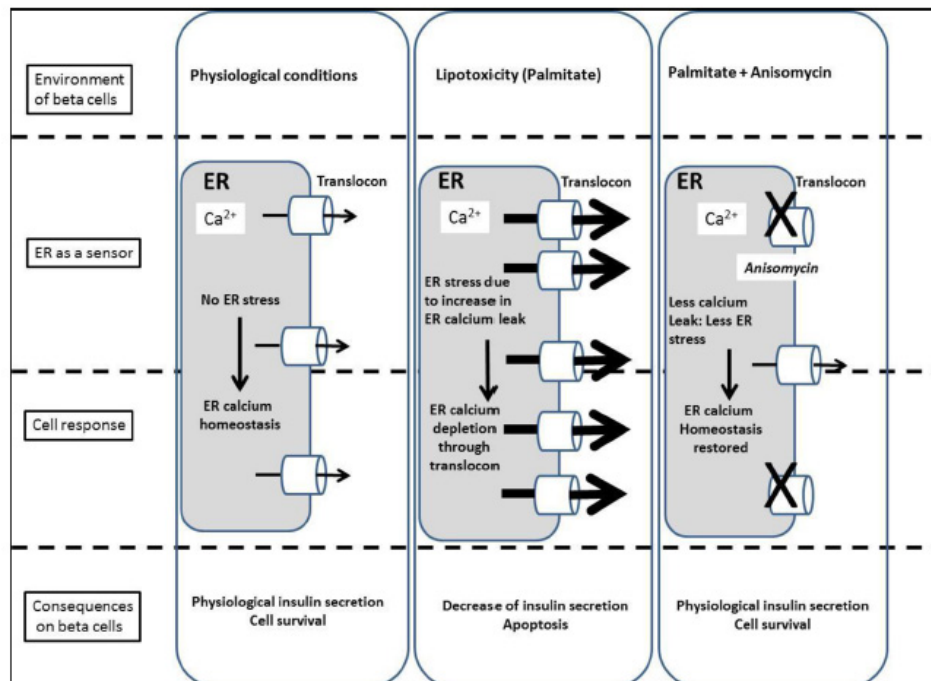


Fig 5. Model of translocon implication in pancreatic beta cells. Chronic palmitate causes ER calcium depletion due to a greater ER calcium leak through the translocon, triggering ER stress and decreased glucose-stimulated insulin release, indicating an altered metabolism-secretion coupling. Addition of anisomycin reduced ER stress and ER calcium leak from translocon, leading to restored insulin secretion.

doi:10.1371/journal.pone.0148686.g005

that, however ER calcium is largely decreased, certainly participates to the moderate ER stress we observed, but is not sufficient to induce a caspase-dependent apoptosis. This suggest that ER calcium maintenance is crucial for the physiology of the cells but not necessary sufficient. Furthermore, recent studies suggested that whether calcium and ER function are tightly linked, there are possibilities for independent actions in pancreatic beta cells [50].

Chronic palmitate treatment is also known to inhibit glucose-induced insulin release [52]. As expected, we observed that mild chronic palmitate treatment reduces GSIS in human islets. We further observed in this study that anisomycin partly prevented ER calcium depletion. Therefore, we guess, in accordance with the literature, that restorations of ER calcium homeostasis should allow suitable insulin secretion in response to glucose and ER calcium liberation [43,53]. This was confirmed in human islets where beta cell function was protected from deleterious effects of lipotoxicity in presence of anisomycin. Anisomycin inhibition of ER calcium depletion suggest that beta cell dysfunction due to lipotoxicity should be mainly triggered by ER calcium depletion rather than an increase in cytosolic calcium concentration. These results are in accordance with data showing that SERCA mRNA expression was not affected by FFAs and that there was neither ER stress induction nor impairment of glucose tolerance in SERCA3 $-/-$ mice indicating that SERCA3 might not be a culprit in the etiology of T2D as previously

suggested (see[52] for review). Indeed, we did not notice any lasting increase in cytosolic calcium concentration in cells treated with palmitate and anisomycin. However, cytosolic calcium increase due to increased ER calcium leak in lipotoxic conditions [23] could have effects on beta cell function as GSIS. Anisomycin, by translocon inhibition could also act on this phenomenon.

Interestingly, translocon inhibition restores ER calcium concentration improvement and insulin secretion in human islets submitted to lipotoxic conditions without affecting all the ways of ER stress. This is an original case of partial dissociation of ER calcium homeostasis and ER function that could help to better understand how calcium regulation by the ER preserves insulin secretion in pancreatic beta cells.

To our knowledge, this is the first study to show that the translocon is implicated in both the global calcium homeostasis in pancreatic beta cells, and in lipotoxicity-induced beta cell dysfunction. Its inhibition resulted in improved calcium homeostasis, ER stress and insulin secretion in human islets as illustrated (Fig 5).

Taken together, these results suggest that the control of calcium homeostasis by translocon inhibition could be a new strategy for preventing and treating type 2 diabetes as a part of combinatorial approaches that might be required to preserve or restore beta cell function as recently concluded in Consensus Statement on type 2 diabetes [54].

Supporting Information

S1 Fig. Anisomycin dose-responses in MIN6B1 cells. Quantitative analysis of protein expression. (a) Western blot from a representative experiment. (b) Analysis of protein expression (n = 3). MIN6B1 were cultured in control conditions during 24h without or with increasing anisomycin concentrations (0.1 to 2 μ M; shading grey bars). ** p<0.01. (PPTX)

S2 Fig. Puromycin and anisomycin acute effects on calcium homeostasis in MIN6B1 cells. Puromycin and anisomycin effects were evaluated in 4 different preparations of MIN6B1 (51 to 82 different cells) (a-e). Typical cytosolic calcium traces in response to 200 μ M puromycin (a) or to 1 μ M thapsigargin (b) under control conditions and after 30 min incubation with 200 μ M anisomycin. Cumulative data of peak cytosolic calcium increases evoked by puromycin responses under control conditions and with anisomycin 200 μ M (c). Cumulative data of peak cytosolic calcium increases evoked by thapsigargin responses (d) and (e) resting fluorescence (F340/F380) under control conditions \pm puromycin or anisomycin pretreatment. *p<0.05, **p<0.01. Measures were assessed in a calcium-free medium. Preparations were done in duplicate. (PPTX)

S3 Fig. Puromycin and anisomycin modulate specifically calcium release from translocon in MIN6B1 cells. (white bar) Puromycin (200 μ M) induced an ER calcium release (n = 12). (black bar) Anisomycin (200 μ M) inhibited puromycin induced calcium release when added 1h before puromycin (n = 14). (dark grey bar) Puromycin (200 μ M) induced a calcium release in presence of ryanodine (50 μ M) added 1h before puromycin (n = 8). (light grey bar) Puromycin (200 μ M) induced an ER calcium release after treatment with xestospongin C (3 μ M) (n = 8). Data were obtained from 3 different experiments. Statistical analysis were done with an Anova test *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (PPTX)

S4 Fig. Dynamic changes in ER Ca²⁺ in MIN6B1 cells, under resting conditions and after stimulation with thapsigargin (TG; 1 μ M), were monitored after a 20 min pre-treatment

with or without anisomycin (200 μ M) using Ad-D4ER. Anisomycin was also present during the measurement period. **(a)** Average traces (black: control, grey: anisomycin) of ER Ca^{2+} (R/R_0) are shown as FRET ratio ($R:YCFP/CFP$) after correction of background/photobleaching and normalization with the basal FRET ratio (R_0) ($n = 90$ & 99 cells for control and anisomycin respectively). **(b)** Analysis of the statistical differences (Δ_{max}) in ER Ca^{2+} before and after TG treatment reflecting the amount of Ca^{2+} released from ER. **(c)** Resting ER Ca^{2+} data extracted from the basal FRET ratio before normalization with R_0 . The bars in panels **(b)** and **(c)** represent mean ratio \pm SEM. *** $p = 0.0001$, * $p = 0.02$ for anisomycin vs control. (TIF)

S5 Fig. Chronic effects of palmitate and anisomycin treatments on calcium homeostasis in MIN6B1 cells. Quantification of fluorescence ratio (F340/F380) of resting calcium **(a)** and of reticular calcium release **(b)** induced by 1 μ M thapsigargin in MIN6B1 cells under BSA (white bar) + anisomycin (grey bars) and palmitate (black bar) conditions + anisomycin (hatched bars). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. $N = 33$ – 44 at least from 3 independent MIN6 cultures; preparations in duplicate. (PPTX)

S6 Fig. Cytosolic Ca^{2+} measured in MIN6B1 cells upon GRP78 overexpression using Fura-2 AM. **(a)** Typical cytosolic calcium traces in response to 1 μ M thapsigargin. Cumulative data of **(b)** resting fluorescence (F340/F380) and **(c)** peak cytosolic calcium increases evoked by thapsigargin responses under control conditions (BSA) or palmitate pretreatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Measures were assessed in a calcium-free medium. Preparations were done in triplicate ($n = 55$ – 66 cells). (PPTX)

S7 Fig. GRP-78 adenovirus dose-responses in MIN6B1 cells. Quantitative analysis of protein expression. **(a)** Western blot from a representative experiment. **(b)** Analysis of protein expression ($n = 3$). MIN6B1 were cultured in control conditions during 48h without or with increasing GRP78-adenovirus concentrations (0.1 to 2. μ l). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$. (PPTX)

S8 Fig. GRP-78 protein knock-down in MIN6B1 cells. Quantitative analysis of protein expression. **(a)** Western blot from a representative experiment. **(b)** Analysis of protein expression ($n = 3$). MIN6B1 were cultured in control conditions during 48h without or with GRP78 siRNAs. ** $p < 0.01$. (PPTX)

S1 Table. Primer sequences used for qRT-PCR. (DOCX)

Acknowledgments

Human islets were provided through the JDRF award 31-2008-413 (ECIT Islet for Basic Research program; T. Berney, D. Bosco) from the Geneva University Hospital. We thank the genomic platform (E. Meugnier, E. Loizon, S. Pesanti) from INSERM UMR-1060 CARMEN and A. Durand and C. Durand (INSERM UMR-1060) for technical assistance in cell culture. We thank Prof Dr. Roger Tsien (UCSD, San Diego, USA) for ER Ca^{2+} sensors. MIN6B1 cell line was provided by Dr. Jun-ichi Miyazaki, OUMS, Osaka, Japan [55].

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RC SD FVC AMM. Performed the experiments: RC SD MRA FD CB KBJ MAC KC LP RAM CCDS FVC AMM. Analyzed the data: RC SD MRA FVC AMM. Contributed reagents/materials/analysis tools: RC SD MRA FD CB KBJ MAC KC LP RAM CCDS JR CT FVC AMM. Wrote the paper: RC SD MRA FVC AMM. Contribution to the discussion and review of the manuscript: JR CT.

References

1. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1802–1812. PMID: [16823478](#)
2. Langenberg C, Sharp SJ, Franks PW, Scott RA, Deloukas P, Forouhi NG, et al. Gene-life style interaction and type 2 diabetes: the EPIC interact case-cohort study. *PLoS Med*. 2014; 11:e1001647. doi: [10.1371/journal.pmed.1001647](#) PMID: [24845081](#)
3. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003; 46:3–19. PMID: [12637977](#)
4. Charles MA, Eschwège E, Thibault N, Claude JR, Warnet JM, Rosselin GE, et al. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia*. 1997; 40:1101–1106. PMID: [9300248](#)
5. Riserus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res*. 2009; 48:44–51. doi: [10.1016/j.plipres.2008.10.002](#) PMID: [19032965](#)
6. Dey D, Pal BC, Biswas T, Roy SS, Bandyopadhyay A, Mandal SK, et al. Lupinose prevented fatty acid induced inhibition of insulin sensitivity in 3T3 L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem*. 2007; 300:149–157. PMID: [17149545](#)
7. Hommelberg PP, Plat J, Langen RC, Schols AM, Mensink RP. Fatty acid-induced NF-kappaB activation and insulin resistance in skeletal muscle are chain length dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296:E114–E120. doi: [10.1152/ajpendo.00436.2007](#) PMID: [18957619](#)
8. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*. 2009; 284:4809–4818.
9. Bensellam M, Laybutt DR, Jonas JC. The molecular mechanisms of pancreatic beta-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 364:1–27. doi: [10.1016/j.mce.2012.08.003](#) PMID: [22885162](#)
10. Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36:348–352. doi: [10.1042/BST0360348](#) PMID: [18481955](#)
11. Fonseca SG, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic b-cell death. *Trends Endocrinol. Metab*. 2001; 22:266–274.
12. Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link β -cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metabolism*. 2012; 15:518–533. doi: [10.1016/j.cmet.2012.01.023](#) PMID: [22465073](#)
13. Martino L, Masini M, Novelli M, Befly P, Bugliani M, Marselli L, et al. Palmitate Activates Autophagy in INS-1E β -Cells and in Isolated Rat and Human Pancreatic Islets. *PLoS ONE*. 2012; e36188. doi: [10.1371/journal.pone.0036188](#) PMID: [22563482](#)
14. Giaccia A, Xiao C, Opreacu AI, Carpentier AC, Lewis GF. Lipid-induced pancreatic b-cell dysfunction: focus on in vivo studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 200:E255–E262.
15. Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology*. 2004; 145:5087–5096. PMID: [15297438](#)
16. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*. 20; 8:767–793.
17. Papa F. Endoplasmic reticulum stress, Pancreatic β -cell degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harbour Perspective in Medicine*. 2012; 2:a007666.
18. Akerfeldt MC, Howes J, Chan JY, Stevens VA, Boubenna N, McGuire HM, et al. Cytokine-induced beta-cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling. *Diabetes*. 2008; 57:3034–3044. doi: [10.2337/db07-1802](#) PMID: [18591394](#)

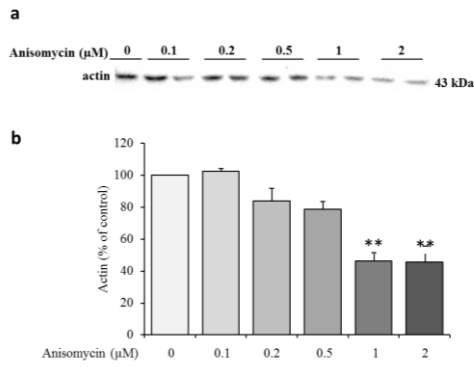
19. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. CHOP deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest*. 2008; 118:3378–3389. doi: [10.1172/JCI34587](https://doi.org/10.1172/JCI34587) PMID: [18776938](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18776938/)
20. Xiao C, Giacca A, Lewis GF. Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes*. 2011; 60:918–24. doi: [10.2337/db10-1433](https://doi.org/10.2337/db10-1433) PMID: [21270237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270237/)
21. Matus S, Gilmcher LH, Hetz C. Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23:239–252. doi: [10.1016/j.ceb.2011.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.01.003) PMID: [21288706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21288706/)
22. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008; 29:42–61. PMID: [18048764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18048764/)
23. Gwiazda KS, Yang TL, Lin Y, Johnson JD. Effects of palmitate on ER and cytosolic calcium homeostasis in beta cells. *AJP Endocrinol. and Metab*. 2009; 296:E690–701.
24. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, et al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci*. 2004; 117:4135–4142. PMID: [15280427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15280427/)
25. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *Faseb J*. 2006; 20:1215–1217. PMID: [16611832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611832/)
26. Gorlich D, Rapoport TA. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*. 1993; 75:615–630. PMID: [8242738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8242738/)
27. Paredes RM, Bollo M, Holstein D, Lechleiter JD. Luminal Ca²⁺ depletion during the unfolded protein response in *Xenopus* oocytes: cause and consequence. *Cell Calcium*. 2013; 53:286–296. doi: [10.1016/j.ceca.2013.01.002](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.01.002) PMID: [23415071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23415071/)
28. Madec AM, Cassel R, Dubois S, Ducreux S, Vial G, Chauvin MA, et al. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway. *FASEB J*. 2013; 27:5122–5130. doi: [10.1096/fj.13-234104](https://doi.org/10.1096/fj.13-234104) PMID: [24008754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24008754/)
29. Giunti R, Gamberucci A, Fulceri R, Bánhegyi G, Benedetti A. Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 462:115–121. PMID: [17481572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17481572/)
30. Erdmann F, Jung M, Maurer P, Harsman A, Zimmermann R, Wagner R. The mammalian and yeast translocon complexes comprise a characteristic Sec61 channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 4:396:714–720.
31. Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, et al. BIP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J*. 2012; 31:3282–3296. doi: [10.1038/emboj.2012.189](https://doi.org/10.1038/emboj.2012.189) PMID: [22796945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22796945/)
32. Lomax, Camello C., Van Coppenolle F., Petersen O.H., Tepikin A.V. Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem*. 2002; 277:26479–26485. PMID: [11994289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11994289/)
33. Hammadi M, Oulidi A, Gackière F, Katsogiannou M, Slomianny C, Roudbaraki M, et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J*. 2013; 27:1600–1609. doi: [10.1096/fj.12-218875](https://doi.org/10.1096/fj.12-218875) PMID: [23322163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23322163/)
34. Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem*. 2010; 147:19–25.
35. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006; 444:840–846. PMID: [17167471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17167471/)
36. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*. 2011; 60:2441–2449. doi: [10.2337/db11-0425](https://doi.org/10.2337/db11-0425) PMID: [21948998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21948998/)
37. Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kröger J, Schulze MB, et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014; 14:70146–9.
38. Kumminski CM, Shetty S, Orzi L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*. 2009; 14:1484–1495. doi: [10.1007/s10495-009-0352-8](https://doi.org/10.1007/s10495-009-0352-8) PMID: [19421860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19421860/)
39. Cnop M, Ladrrière L, Igoillo-Estève M, Moura RF, Cunha DA. Causes and cures for endoplasmic reticulum stress in lipotoxic b-cell dysfunction. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12: 76–82. doi: [10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01279.x) PMID: [21029303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21029303/)
40. Hara T, Mahadevan J, Kanekura K, Hara M, Lu S, Urano F. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to β -cell death. *Endocrinology*. 2014; 155: 758–768. doi: [10.1210/en.2013-1519](https://doi.org/10.1210/en.2013-1519) PMID: [24424032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24424032/)

41. Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell*. 1994; 78:461–471. PMID: [8062388](#)
42. Swanton E, Bulleid NJ. Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Membr Biol*. 2003; 20:99–104. PMID: [12851067](#)
43. Poitout V, Robertson P. Fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*. 2008; 29:351–366. PMID: [18048763](#)
44. Adler NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2005; 168:389–399. PMID: [15684029](#)
45. Lloyd DJ, Wheeler MC, Gekakis N. A point mutation in Sec61alpha1 leads to diabetes and hepatosteatosis in mice. *Diabetes*. 2010; 59:228–235.
46. Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 2002; 32:269–278. PMID: [12543089](#)
47. Laybutt DR, Preston AM, Akerferdt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007; 50:752–763. PMID: [17268797](#)
48. Cnop M, Abdulkarim B, Bottu G, Cunha DA, Igoillo-Esteve M, Masini M, et al. RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes*. 2014; 63:1978–93. doi: [10.2337/db13-1383](#) PMID: [24379348](#)
49. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazzara-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. *J Cell Science*. 2008; 121:2308–2318. doi: [10.1242/jcs.026062](#) PMID: [18559892](#)
50. Boslem E., MacIntosh G, Preston AM, Bartley C, Busch AK, Fuller M, et al. A lipidomic screen of palmitate-treated MIN6 β -cells links sphingolipid metabolites with endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired protein trafficking. *Biochem J*. 2011; 435:267–276. doi: [10.1042/BJ20101867](#) PMID: [21265737](#)
51. Hara T, Mahadevan J, Kanekura K, Hara M, Lu S, Urano F. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to β -cell death. *Endocrinology*. 2014; 155:758–768. doi: [10.1210/en.2013-1519](#) PMID: [24424032](#)
52. Hoppa MB, Collins S, Ramracheya R, Hodson L, Amisten S, Zhang Q, et al. Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of calcium channels from secretory granules. *Cell Metabolism*. 2009; 10:455–465. doi: [10.1016/j.cmet.2009.09.011](#) PMID: [19945403](#)
53. Gilon P, Chae HY, Rutter GA, Ravier M. Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium*. 2014; 14:136–5.
54. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. Beta-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99:1983–1992. doi: [10.1210/jc.2014-1425](#) PMID: [24712577](#)
55. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, et al. Establishment of a pancreatic β cell line that retains glucose inducible insulin secretion: Special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*. 1990; 127:126–132. PMID: [2163307](#)

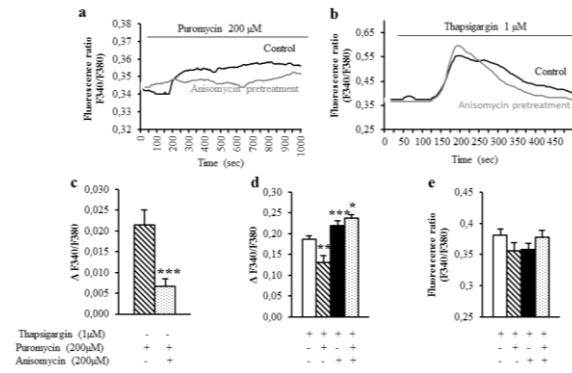
Supplemental figure :

RESULTATS - Partie 4 : Rôle protecteur de la modulation du translocon dans les effets délétères de la lipotoxicité

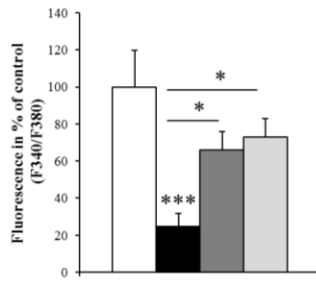
S1 Fig.



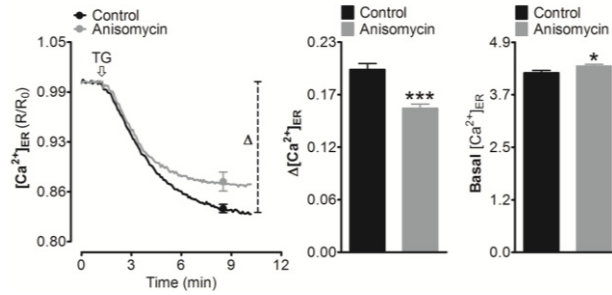
S2 Fig.



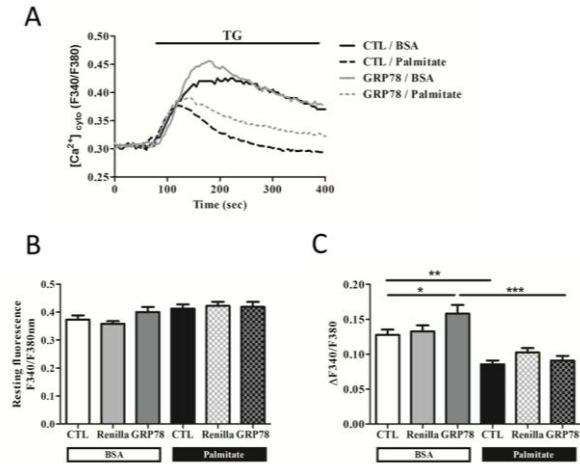
S3 Fig.



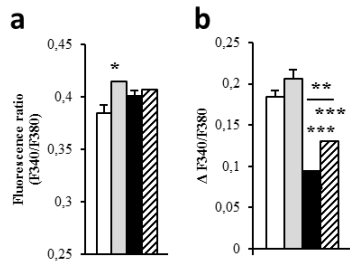
S4 Fig.



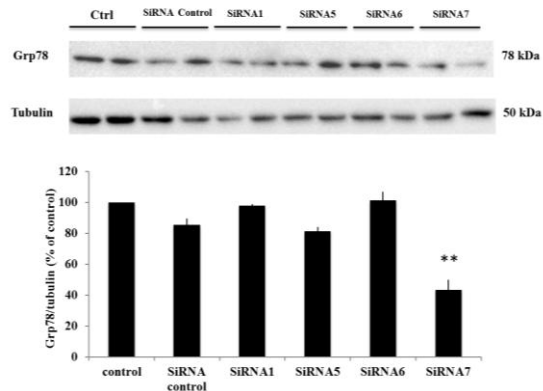
S6 Fig.



S5 Fig.



S7 Fig.



DISCUSSION

Beaucoup d'effort se porte actuellement sur des moyens thérapeutiques permettant de potentialiser la sécrétion d'insuline ou d'empêcher l'apoptose des cellules β lors du diabète de type 2. Il est donc important de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de comprendre dans son ensemble les acteurs précis de la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique en condition physiologique ou physiopathologique.

L'altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose observée au cours du diabète de type 2 est l'événement clé dans la physiopathologie de cette maladie complexe. Les mécanismes sous-jacents à la dysfonction β pancréatique commencent à être élucidés, avec un rôle majeur des phénomènes de gluco-lipototoxicité. Ainsi, il est important de mettre en évidence de nouveaux mécanismes et des processus précis de l'altération de la sécrétion d'insuline, pour pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Les altérations liées à la glucotoxicité due RE et de la mitochondrie sont déjà bien définies mais aucune étude à ce jour ne s'était intéressée au fait que ces dysfonctions puissent être liées ou indépendantes. Les MAMs sont au centre des échanges calciques et lipidiques entre les organites et pourraient contrôler par ce biais le métabolisme cellulaire de la cellule β .

L'objectif de ma thèse était donc de déterminer le rôle des MAMs dans la sécrétion d'insuline et dans la dysfonction de la cellule β au cours du diabète de type 2, en travaillant sur des îlots humains de donneurs sains ou sur une lignée d'insulinome de rat (INS-1E).

Au cours de celle-ci, j'ai pu démontrer que les MAMs étaient des acteurs importants de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par la cellule β dans des conditions physiologiques mais aussi une plateforme de départ pour la dysfonction β pancréatique inhérente à la glucotoxicité ou au développement du diabète de type 2 (**Article 1**). En effet, alors que l'exposition aiguë à de fortes concentrations de glucose stimule les interactions et les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie favorisant la sécrétion d'insuline, l'exposition chronique (glucotoxicité) entraîne un défaut d'échange calcique entre le RE et la mitochondrie, malgré une augmentation des interactions entre les 2 organites. Autrement dit, l'augmentation des MAMs pourrait compenser la demande énergétique excessive, mais cette augmentation n'est pas fonctionnelle lors de la glucotoxicité car les transferts calciques sont sévèrement diminués entre les 2 organites. Ce défaut, probablement lié à la perturbation des stocks calciques du RE, participe ensuite au stress du RE et aux altérations

DISCUSSION

de la dynamique et de la fonction mitochondriale, associés à la glucotoxicité, et *in fine* au défaut de sécrétion d'insuline par la cellule β . Par conséquent, une perturbation fonctionnelle des MAMs pourrait être un évènement précoce dans la dysfonction de la cellule β associée à la glucotoxicité.

Le rôle précis des MAMs dans la sécrétion d'insuline n'est cependant pas encore bien défini et beaucoup de questions restent en suspens.

Questions :

- **Comment les MAMs participent au contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ?**
- **Quelle est l'implication de la dynamique mitochondriale dans le contrôle de la sécrétion d'insuline ?**
- **D'où provient ce défaut de transfert calcique lié à la glucotoxicité ?**
- **Stress du RE ou stress mitochondrial, à qui la faute ?**
- **Glucotoxicité et lipotoxicité, des mécanismes similaires ou non ?**

Comment les MAMs participent au contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ?

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose, est très finement régulée dans la cellule β . La production d'ATP, l'homéostasie calcique et la synthèse d'insuline sont toutes les trois au cœur des processus qui entrent en jeu dans cette sécrétion. La production d'ATP est assurée par la mitochondrie, alors que le RE lui prend en charge la mise en conformation de l'insuline et il est le stock intracellulaire de calcium. Les transferts calciques du RE vers la mitochondrie sont essentiels pour la bioénergétique mitochondriale et permet à la mitochondrie de produire d'avantage d'ATP (Bravo et al., 2011). Dans ce contexte, il n'a pas été surprenant d'observer dans l'**article 1** qu'en réponse à une stimulation aigue au glucose de 30 minutes, les contacts et les transferts calciques entre les 2 organites étaient potentialisés. Par conséquent, l'induction de la communication entre le RE et la mitochondrie par le glucose est un facteur qui provoque probablement la stimulation de la bioénergétique mitochondriale pour favoriser la sécrétion d'insuline. D'autre part, la diminution des contacts entre le RE et la mitochondrie par la sous-expression de Grp75, abolit presque totalement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ces résultats nous apportent un nouveau rôle potentiel des MAMs dans la voie de sécrétion de l'insuline. Cependant les acteurs moléculaires précis du métabolisme glucidique qui entrent en jeu dans une telle augmentation des contacts entre le RE et la mitochondrie restent inconnus.

Implication de la dynamique mitochondriale dans le contrôle de la sécrétion d'insuline ?

La mitochondrie change continuellement d'aspect passant d'une forme tubulaire à un aspect ponctiforme en fonction de la demande énergétique. Le rôle de tels changements dans la sécrétion d'insuline n'a pas encore clairement été élucidé. Néanmoins, il semble très intéressant de noter qu'en réponse à une stimulation aigüe au glucose, la mitochondrie fissionne ponctuellement pour redevenir tubulaire (Jhun et al., 2013). La forme fissionnée des mitochondries pourrait permettre ainsi de faciliter leurs mouvements et leurs distributions au sein de la cellule. J'émet l'hypothèse que cette fission ponctuelle permet ainsi le rapprochement des mitochondries dans des zones cellulaires nécessitant de plus grandes quantités d'énergie. Cet état pourrait ainsi créer des pools intracellulaires d'ATP ciblés par exemple pour la cellule β , proches de la membrane plasmique facilitant ainsi la

sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Il est maintenant bien établi que la surcharge énergétique des cellules (exposition excessive aux lipides ou au glucose), provoque la fragmentation des mitochondries, l'accumulation de dommages sur l'ADNmt et la production de ROS (Picard and Turnbull, 2013). A l'inverse, la carence en substrat énergétique favorise l'élongation et la fusion des mitochondries tout en limitant l'accumulation des dommages à l'ADNmt. La Mitofusine est au centre des processus de fusion mitochondriale. L'exercice ou toute autre activité qui favorise la dépense énergétique, augmente l'expression de la Mfn1/2 dans les muscles squelettiques (Cartoni et al., 2005; Ding et al., 2010). Ces études montrent le rôle important de la balance énergétique dans le contrôle de la structure mitochondriale pour optimiser la fonction mitochondriale en fonction de la demande. En accord avec les travaux de Molina (Molina et al., 2009), nous avons pu démontrer que l'exposition chronique des cellules β humaines et INS-1E à des fortes concentrations de glucose provoque une fission mitochondriale corrélée à une dysfonction des mitochondries. Néanmoins, ce modèle un peu simpliste du « bon » (fusion) et du « truant » (la fission) ne permet pas d'expliquer toute la complexité de la dynamique mitochondriale. De mon point de vue, l'effet délétère se pose plutôt sur l'incapacité des mitochondries à subir des cycles de fusion/fission/fusion plutôt que l'état de fission en lui-même. L'état de fission mitochondriale est néanmoins également associé à la mitophagie et permet d'éliminer les mitochondries ayant accumulé des dommages, comme des ROS ou des mutations de l'ADNmt. Une fois de plus, il faut dissocier les effets aigus bénéfiques des effets chroniques délétères qui forcent le système à fonctionner et les mitochondries à s'adapter avant de s'épuiser et de mourir.

Nous avons démontré (**Article 1**) que dans notre modèle en condition contrôle (bas glucose), toutes les cellules ne présentaient pas les mêmes morphologies mitochondriales. Par exemple, dans les îlots humains à 5,5mM glucose, très peu de cellules β présentaient un aspect mitochondriale tubulaire (4% des cellules), la majorité (74% des cellules) des cellules étaient en état « intermédiaire » (mi-fusionné, mi-fissionné) et 22% des cellules avaient des mitochondries fissionnées. Néanmoins, après 48h de glucotoxicité, 59% des cellules présentaient des mitochondries fissionnées. Ces données suggèrent une certaine hétérogénéité au sein du profil mitochondrial des cellules β . Ces résultats laissent transparaître une sensibilité différente des cellules β à la glucotoxicité, qui pourrait

s'accorder avec le modèle des cellules « pacemaker » et « follower » de Johnston (Johnston et al., 2016). Nos données obtenues à l'aide du linker (qui force artificiellement les contacts entre le RE et la mitochondrie), montrent que forcer les contacts pendant 72h provoque une fission mitochondriale, de plus cette fission s'accompagne de mitochondries dites « swollen » ou gonflées, ce qui apporte encore un niveau de profondeur dans la description morphologique des mitochondries. Cet aspect des mitochondries est aussi retrouvé dans les cellules β issues de coupes de patients atteints de diabète de type 2 depuis plusieurs années (Masini et al., 2017). Il n'existe donc pas qu'un seul type de fission, des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer le rôle exact de la dynamique mitochondriale dans la physiologie et la physiopathologie de la cellule β .

En outre, les transferts calciques ont très récemment été impliqués dans l'induction de la fission mitochondriale (Cho et al., 2017). Nos résultats corroborent cette hypothèse car nous observons que plus les mitochondries sont fissionnées, plus elles contiennent du calcium (**Article 1**). Les MAMs dans ce contexte pourraient servir de plateforme pour l'induction de la fission mitochondriale et pourraient assurer une activation plus forte de la production d'ATP pour répondre à l'élévation de la glycémie.

D'où provient ce défaut de transfert calcique lié à la glucotoxicité ?

Nous avons pu constater que la glucotoxicité induisait une augmentation des contacts entre le RE et la mitochondrie mais que celle-ci était associée à une diminution des transferts calciques entre les 2 organites (**Article n°1**). Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ce défaut de transfert calcique. Cette altération peut être la conséquence de défauts côtés réticulaire, mitochondriale ou les 2 (**Figure 41**).

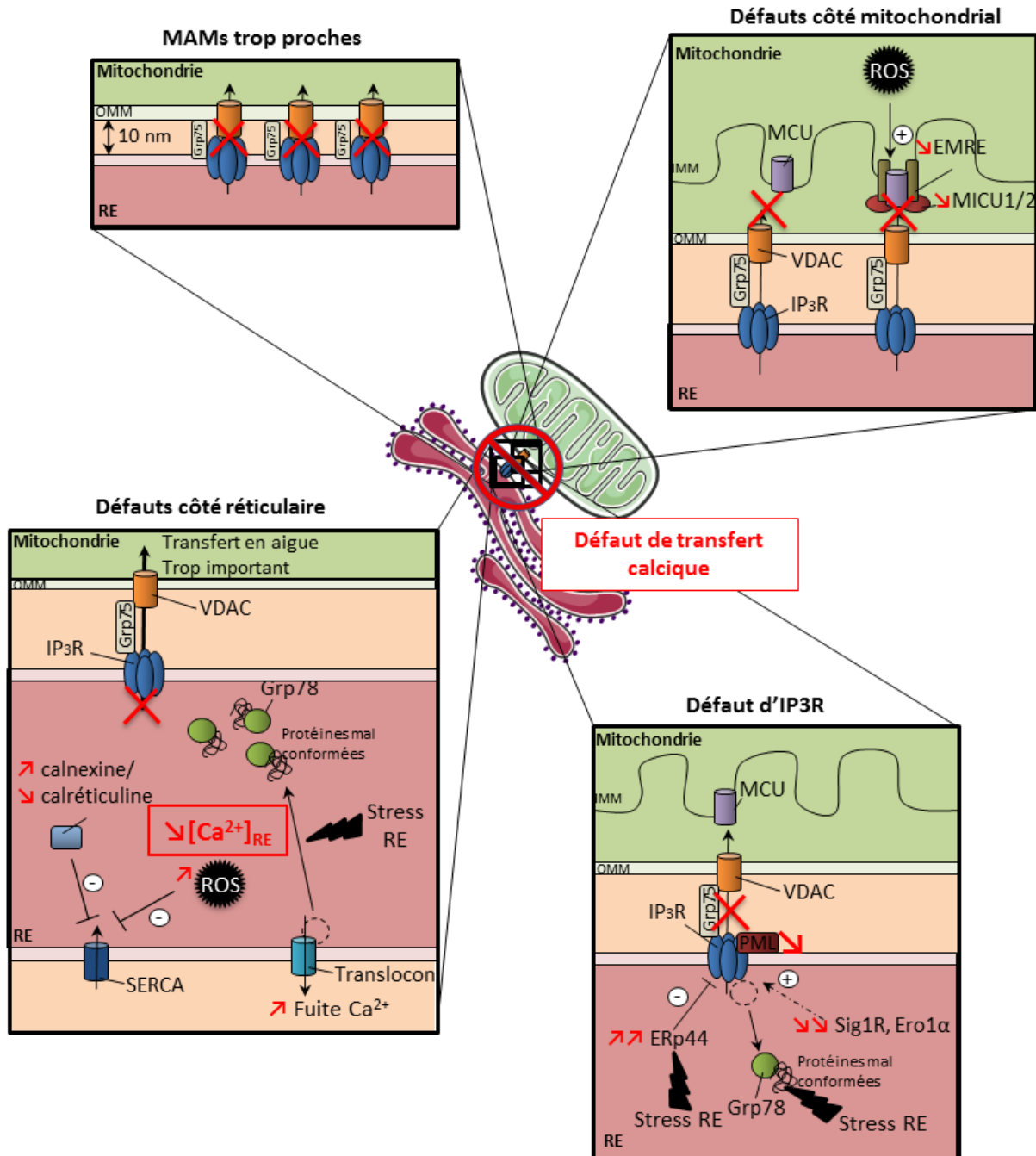


Figure 41 : Causes possibles du défaut de transfert calcique en réponse à la glucotoxicité. 4 hypothèses sont présentées, côté réticulaire, mitochondriale ou les 2.

Le RE constitue le réservoir calcique de la cellule, il est finement régulé par des pompes de recapture, des canaux calciques de sortie et des protéines chaperonnes. Une perturbation des stocks calciques réticulaires peut perturber les transferts calciques entre les 2 organites. La diminution des stocks calciques réticulaires est une des caractéristiques du stress du RE, dans notre modèle nous avons observé une diminution fine des stocks calciques (Cassel et al., 2016; Dejeans et al., 2010). La calnexine et la calréticule sont 2

chaperonnes du RE qui régulent les concentrations de calcium dans le RE en agissant comme des tampons pour le calcium, elles peuvent également réguler les pompes de recapture SERCA (Rizzuto et al., 2012). De plus ces chaperonnes sont localisées aux MAMs (Hayashi and Su, 2007). La calnexine contrôle les oscillations calciques de par son interaction avec la pompe SERCA2b et bloque les oscillations calciques cytosoliques (Roderick et al., 2000). A l'inverse la surexpression de la calréticuline favorise l'augmentation des concentrations de calcium dans le RE (Arnaudeau et al., 2002). L'augmentation de l'expression de la calnexine et la diminution d'expression de la calréticuline pourraient expliquer la déplétion calcique liée à un défaut d'oscillations calciques dans notre modèle. Malgré tout, la diminution des stocks calciques réticulaires observée dans notre modèle est modeste et ne peut pas à elle seule probablement pas expliquer le défaut drastique de transfert calcique, mais pourrait y contribuer. Les stocks calciques sont également régulés par le translocon, un canal de fuite réticulaire. Comme démontré dans l'**article 2**, le translocon a un rôle important dans la mise en place de la diminution des stocks calciques réticulaires lors de la lipotoxicité. Dans ce contexte il ne serait pas surprenant que le translocon soit aussi impliqué dans la diminution des stocks calciques réticulaires associés à la glucotoxicité. D'autre part, le translocon est modulé par différentes protéine dont Grp78. L'interaction entre Grp78 et le translocon permettrait de « sceller » celui-ci et empêcher les fuites calciques (Hammadi et al., 2013). Ainsi la prise en charge des protéines mal conformées par Grp78 lors d'un stress du RE favoriserait la diminution des interactions entre le translocon et Grp78 entraînant une fuite du calcium réticulaire.

Le canal calcique IP3R est central dans les échanges calciques entre les 2 organites, toute perturbation de sa structure ou fonction pourrait engendrer des défauts de transferts calciques. Il existe de nombreux régulateurs d'IP3R, des régulateurs négatifs tels qu'ERp44 ou des régulateurs positifs tels que Sig1R, Ero1 ou encore [PML \(Promyelocytic leukemia\)](#) qui pourraient contribuer à cette dysfonction. Il a été montré que l'expression d'ERp44 augmentait dans des modèles de souris diabétiques db/db (Pang et al., 2018). D'autre part un modèle d'inactivation de Sig1R provoque une augmentation de l'expression d'ATF4, XBP1 et CHOP (Wang et al., 2017), 3 marqueurs de stress du RE. De la même manière l'exposition prolongée à des fortes concentrations de glucose provoque la diminution de l'expression d'Ero1 et l'augmentation de l'expression de marqueurs du stress du RE, dans un modèle de

cellules endothéliales (Schisano et al., 2012). A l'inverse une étude montre que le stress du RE participe à l'activation d'Ero1 pour favoriser la production d' H_2O_2 et l'entrée dans le RE de la glutathione (Ponsero et al., 2017). Il n'est pas à exclure que ces mécanismes soient uniquement présents en réponse à un stress du RE aigu mais ne reflète pas un stress du RE chronique comme lors de la glucotoxicité. Il est intéressant de remarquer que Grp78 est lui aussi un modulateur positif d'IP3R. Le stress du RE force Grp78 à prendre en charge les protéines mal conformées et altère les interactions IP3R1- Grp78, provoquant ainsi la dysfonction d'IP3R1 (Higo et al., 2010). La présence de ROS dans le RE est aussi une caractéristique d'un haut niveau de stress cellulaire, ces ROS peuvent venir soit de la mitochondrie, soit du RE lui-même, la glucotoxicité est à ce jour reconnue comme un inducteur de la production excessive de ROS. La présence excessive de ROS dans le RE peut provoquer l'oxydation d'IP3R, mais de façon intéressante celle-ci favorise son activité plutôt que de la bloquer (Paula-Lima et al., 2014). En outre, un défaut des voies de signalisation qui mènent à la production d'IP3 pourrait aussi contribuer au défaut de transfert calcique entre les 2 organites dans notre modèle. De nombreuses hypothèses restent encore à explorer dans ce contexte.

L'entrée du calcium dans la matrice mitochondriale est dépendante de 2 canaux VDAC1 dans l'OMM et MCU présent dans l'IMM. La proximité entre les canaux calciques VDAC1 et MCU sont aussi des acteurs importants dans l'entrée de calcium dans la mitochondrie, un non alignement de ces 2 canaux bloque l'arrivée du calcium au sein de la matrice mitochondriale et peut contribuer au défaut de transfert calcique (Rizzuto et al., 2012). L'ouverture du MCU est lui-même également contrôlée par différentes protéines (MICU, EREM) qui pourraient intervenir dans ce défaut de transfert calcique. De manière surprenante l'oxydation du MCU due à la présence de fortes concentrations de ROS dans la mitochondrie promeut son activité (Dong et al., 2017). Il est encore cependant difficile à ce jour de concilier les rôles bénéfiques et délétère des ROS, mais une activation prolongée des canaux MCU ou IP3Rs par les ROS pourrait contribuer à l'apoptose. Il n'est pas à exclure que la redistribution exacte des complexes IP3R-VDAC au sein des MAMs joue aussi sur les transferts calciques. Les MAMs sont des complexes multiprotéiques qui pourraient être fonctionnels ou non selon le degré de rapprochement des 2 organites. La gêne occasionnée

par une proximité trop importante pourrait ainsi bloquer par encombrement stérique les transferts plutôt que de les favoriser.

Stress du RE ou stress mitochondrial à qui la faute ?

Le stress du RE et le stress mitochondrial sont 2 facteurs clés impliqués dans la dysfonction de la sécrétion d'insuline par la cellule β au cours du diabète de type 2. Mais on ne peut pas encore dire clairement lequel de ces 2 organites est touché en premier lors du développement du diabète. Le RE est fortement sollicité en réponse à la glucotoxicité ou la lipotoxicité, sa capacité conformer correctement les protéines est rapidement dépassée et la réponse UPR protectrice devient délétère. De la même manière, la mitochondrie de par sa capacité à produire l'ATP est centrale dans la sécrétion d'insuline, l'activation répétée de la chaîne respiratoire provoque l'accumulation de ROS dans la matrice mitochondriale et à terme sa dysfonction. Nos données (**Article 1**) montrent que le stress du RE et l'altération mitochondriale sont tous deux présents après 48h et sont accentuées après 72h de glucotoxicité. D'autre part comme décrit précédemment, les ROS mitochondriaux facilitent l'ouverture du MCU et de la même manière les ROS réticulaires favorisent l'activation du transfert calcique par l'IP3R (Dong et al., 2017; Paula-Lima et al., 2014). Dans cet ordre d'idée, nous avons utilisé la tunicamycine pour induire un stress du RE et l'oligomycine pour mimer un stress mitochondrial dans notre modèle INS-1E et observer les conséquences sur les contacts RE-mitochondrie. Les deux stress augmentent les contacts entre le RE et la mitochondrie et favorisent les transferts calciques, des résultats déjà trouvés par d'autres équipes dans les hépatocytes et les cellules HeLa (Arruda et al., 2014; Bravo et al., 2011). Le calcium transféré à la mitochondrie depuis le RE peut avoir une double fonction, il peut faciliter la production d'ATP mais une exposition prolongée à de fortes concentrations de calcium provoquent également l'apoptose via l'ouverture du PTP et le relargage du cytochrome C. Enfin la mitochondrie est capable d'échanger des ROS aux MAMs. Le RE et la mitochondrie sont tous les 2 capables de produire des ROS, la mitochondrie principalement via la chaîne respiratoire et le RE par différentes protéines, comme Ero1- α . Les MAMs sont le siège de nanodomains d' H_2O_2 qui peuvent influencer les transferts calciques aussi bien côté RE que mitochondrie (Booth et al., 2016). De plus le stress du RE facilite les échanges de ROS entre les organites, comme démontré par le modèle PERK-/-, une protéine clé du stress du RE qui a un rôle de tether aux MAMs. Dans ce modèle, les contacts RE-mitochondries sont

rompus et le transfert de ROS du RE à la mitochondrie est fortement diminué (Verfaillie et al., 2012). Il reste donc toujours difficile de déterminer lequel des 2 organites est touché le premier. Mais il serait intéressant d'inhiber pharmacologiquement chaque stress de manière indépendante, par exemple le TUDCA (Tauroursodeoxycholic Acid) pour le stress du RE, des antioxydants pour le stress mitochondrial, et d'étudier l'effet de la glucotoxicité sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, afin d'appréhender l'implication de chaque organite dans la dysfonction de la cellule β .

Glucolipotoxicité des mécanismes similaires ou pas ?

La glucolipotoxicité se réfère à la combinaison des effets délétères des concentrations élevées de glucose et d'AG sur la sécrétion d'insuline par la cellule β . De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la dysfonction β inhérente à la glucolipotoxicité (Fontés et al., 2010; Hansen et al., 2018; Karunakaran et al., 2012; Poitout et al., 2010). La glucolipotoxicité provoque l'altération de la sécrétion d'insuline, la diminution de l'expression des gènes codant l'insuline et à terme l'apoptose. Au sein de notre équipe, nous avons pu observer qu'indépendamment, la glucotoxicité et la lipotoxicité provoquent les mêmes altérations, à savoir un stress du RE et une dysfonction mitochondriale à l'origine de l'altération de la sécrétion d'insuline dans la cellule β (Cassel et al., 2016; Madec et al., 2013; Thivolet et al., 2017). Bien que l'altération des organites soit la même, de manière étonnante, l'effet sur les contacts entre le RE et la mitochondrie sont différents (**Figure 42**). En réponse à la glucotoxicité, nous observons une régulation positive des MAMs (par PLA et MET) mais un défaut de transfert calcique, alors qu'en réponse à la lipotoxicité les contacts RE-mitochondries sont diminués (par PLA seulement). Cependant, nous n'avons pas d'information concernant l'effet de la lipotoxicité sur les transferts calciques, mais nous observons également une déplétion calcique réticulaire associée à la lipotoxicité qui pourrait y contribuer. Il semblerait donc que la perturbation de l'homéostasie calcique du RE soit un événement commun à la glucotoxicité et la lipotoxicité, et en fait un acteur central dans la dysfonction de la cellule β . Il est important de noter néanmoins que les 2 études ont été faites dans 2 modèles différents, INS-1E (poussent à 11mM Glc, isolées) et MIN6B1 (poussent à 22,5mM Glc, en amas) ; de plus l'isoforme d'IP3R étudiée n'a pas été le même (glucotoxicité : IP3R2, lipotoxicité : IP3R1). Ces discordances peuvent expliquer les

différences de phénotype des MAMs, mais on ne peut pas exclure également la possibilité que ces discordances soient dues aux voies de signalisations différentes empruntées par le glucose ou les lipides. En effet les AG libres comme le palmitate peuvent agir soit en activant des récepteurs aux AGs comme FFA1R (GPCRs) ou après transport dans la cellule par des transporteurs d'AG (comme [FATP1 : Fatty Acid Transporter Protein 1](#)). Après être entrés dans la cellule, les AG sont métabolisés, puis sont stockés ou alors ils activent des cascades de signalisation dépendantes de protéines kinases, comme la PKC. Le glucose lui entre dans la cellule par l'intermédiaire des transporteurs GLUT et il subit la glycolyse et permet à terme la production d'énergie par la cellule. Le glucose peut également potentialiser, en présence d'AG, l'accumulation de lipides dans la cellule β . En effet, une augmentation simultanée des concentrations de lipides et de glucides favorise l'accumulation de molécules dérivées des lipides comme les céramides, les diglycérides, les triglycérides, le PA ou encore des phospholipides (Poitout et al., 2010). Le rôle de la glucolipotoxicité chez l'homme reste encore débattu à ce jour, mais les effets délétères de la glucotoxicité et de la lipotoxicité sont néanmoins démontrés, tout du moins chez les individus présentant des prédispositions au développement du diabète de type 2. Dans notre équipe, nous avons observé que les patients atteints d'un diabète avancé présentent une diminution des contacts entre le RE et la mitochondrie dans les cellules β . Il n'est à ce pas jour possible de déterminer si ces patients ont développé un diabète dont l'origine est la glucotoxicité, la lipotoxicité ou la glucolipotoxicité. Néanmoins, la rupture des contacts entre la mitochondrie et le RE peut s'inscrire dans une dynamique temporelle. Provoquant dans un premier temps une augmentation des contacts entre le RE et la mitochondrie pour compenser la surcharge énergétique et à terme la rupture des contacts par défaut de compensation. On ne peut pas non plus exclure que certaines sous-populations de cellules β soient plus sensibles à l'action de la glucotoxicité (comme les « pacemakers ») et que ces cellules entrent en apoptose plus vite via l'accumulation de calcium dans la mitochondrie, ce qui pourrait expliquer la perte importante de la masse β lors du diabète de type 2. Des études plus poussées sur le rôle des MAMs dans la dysfonction β pancréatique sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents au développement du diabète de type 2 et permettre de mettre à jour de nouvelles cibles thérapeutiques.

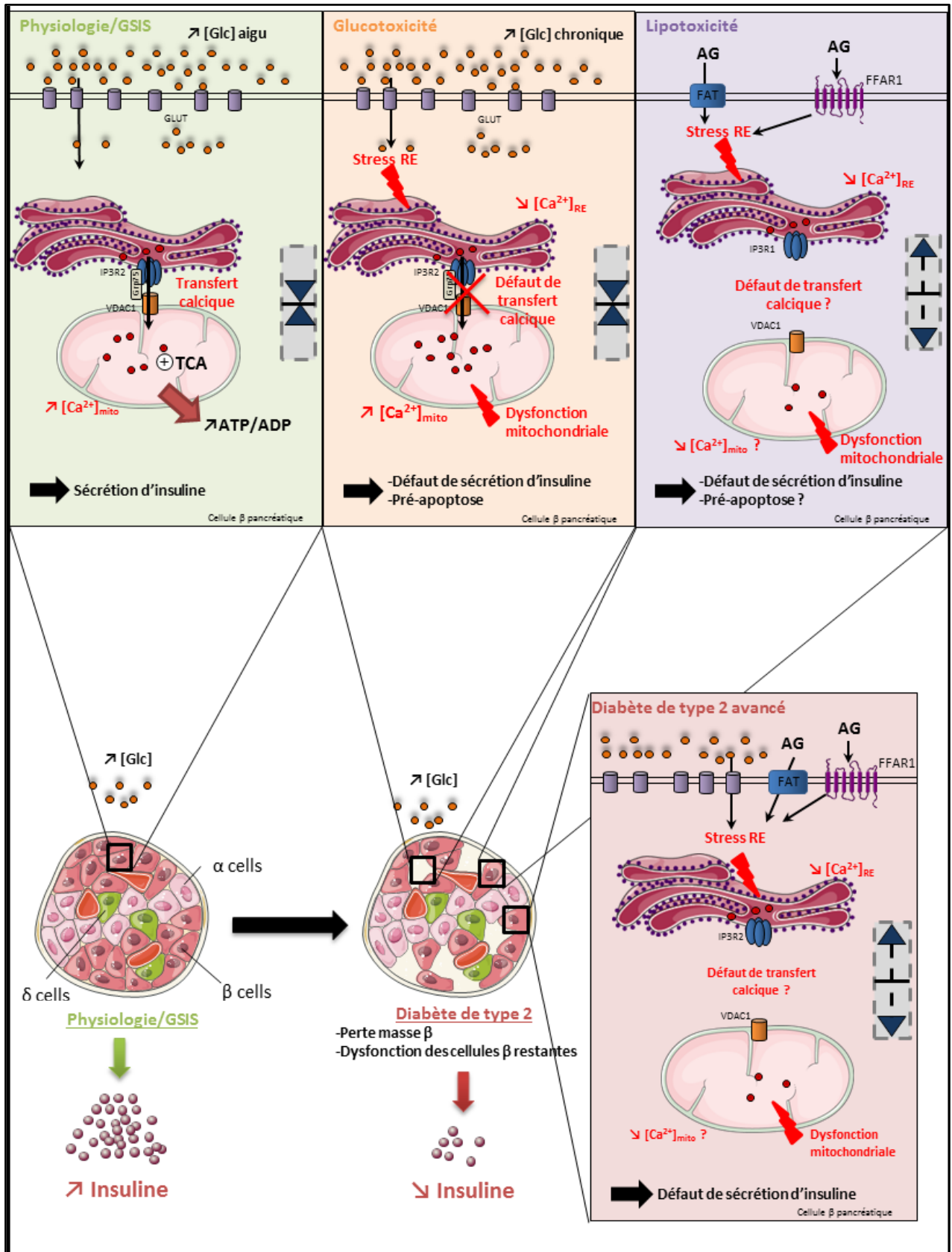


Figure 42: Modèle du rôle des MAMs dans la glucotoxicité, la lipotoxicité et le développement du diabète de type 2.

Conclusions et perspectives

Ce travail montre l'importance d'étudier la mitochondrie et le RE non pas indépendamment mais conjointement. Ma thèse a pu permettre de montrer que les MAMs jouent un rôle important dans le contrôle de la sécrétion d'insuline et la dysfonction β pancréatique associée à la glucolipotoxicité au cours du diabète de type 2. Des études plus poussées sur les mécanismes moléculaires impliqués dans cette dysfonction devrait nous permettre de mettre à jour de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre du traitement ou de la prévention du diabète de type 2.

Plusieurs questions restent cependant en suspend et nécessiteraient d'être approfondies. La suite de ce travail pourrait être:

- D'identifier les mécanismes par lesquels le glucose stimule en aigu les interactions et les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie.
- De déterminer le ou les acteurs impliqués dans le défaut de transfert calcique lors de la glucotoxicité dans la cellule β .
- D'étudier le rôle concret de la Mfn2 dans les contacts entre le RE et la mitochondrie et dans la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique.
- De regarder les conséquences de la glucolipotoxicité sur la structure et la fonction des MAMs dans la cellule β .
- De trouver des acteurs protéiques aux MAMs qui permettraient de restaurer une sécrétion correcte d'insuline dans les contextes de glucotoxicité ou de lipotoxicité.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaltonen, M.J., Friedman, J.R., Osman, C., Salin, B., di Rago, J.-P., Nunnari, J., Langer, T., Tatsuta, T., 2016. MICOS and phospholipid transfer by Ups2-Mdm35 organize membrane lipid synthesis in mitochondria. *J. Cell Biol.* 213, 525–534. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602007>
- Abu-Hamad, S., Sivan, S., Shoshan-Barmatz, V., 2006. The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5787–5792. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600103103>
- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S.D., Perktold, A., Zellnig, G., Daum, G., 1999. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* 264, 545–553.
- Adam, J., Ramracheya, R., Chibalina, M.V., Ternette, N., Hamilton, A., Tarasov, A.I., Zhang, Q., Rebelato, E., Rorsman, N.J.G., Martín-Del-Río, R., Lewis, A., Özkan, G., Do, H.W., Spégel, P., Saitoh, K., Kato, K., Igarashi, K., Kessler, B.M., Pugh, C.W., Tamarit-Rodriguez, J., Mulder, H., Clark, A., Frizzell, N., Soga, T., Ashcroft, F.M., Silver, A., Pollard, P.J., Rorsman, P., 2017. Fumarate Hydratase Deletion in Pancreatic β Cells Leads to Progressive Diabetes. *Cell Rep.* 20, 3135–3148. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.093>
- Ahrén, B., 2015. Glucagon--Early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides* 67, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.011>
- Ahrén, B., 2000. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43, 393–410. <https://doi.org/10.1007/s001250051322>
- Aizawa, T., Komatsu, M., Asanuma, N., Sato, Y., Sharp, G.W., 1998. Glucose action “beyond ionic events” in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 496–499.
- Alam, M.R., Groschner, L.N., Parichatikanond, W., Kuo, L., Bondarenko, A.I., Rost, R., Waldeck-Weiermair, M., Malli, R., Graier, W.F., 2012. Mitochondrial Ca^{2+} uptake 1 (MICU1) and mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 287, 34445–34454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.392084>
- Alberts, B., 2000. *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion médecine-sciences, Paris.
- Alford, S.C., Ding, Y., Simmen, T., Campbell, R.E., 2012. Dimerization-dependent green and yellow fluorescent proteins. *ACS Synth. Biol.* 1, 569–575. <https://doi.org/10.1021/sb300050j>
- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., Langer, T., 2014. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* 204, 919–929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308006>
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Murphy, A.N., Starkov, A.A., 2015. Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochem. Biokhimiia* 80, 517–531. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050028>
- Anelli, T., Bergamelli, L., Margittai, E., Rimessi, A., Fagioli, C., Malgaroli, A., Pinton, P., Ripamonti, M., Rizzuto, R., Sitia, R., 2012. Ero1 α regulates Ca^{2+} fluxes at the endoplasmic reticulum-mitochondria interface (MAM). *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1077–1087. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4004>
- Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A.M., Purrello, F., Marchetti, P., 2005. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48, 282–289. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1627-9>
- Annunziata, I., Sano, R., d’Azzo, A., 2018. Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and lysosomal storage diseases. *Cell Death Dis.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0025-4>

- Arasaki, K., Shimizu, H., Mogari, H., Nishida, N., Hirota, N., Furuno, A., Kudo, Y., Baba, M., Baba, N., Cheng, J., Fujimoto, T., Ishihara, N., Ortiz-Sandoval, C., Barlow, L.D., Raturi, A., Dohmae, N., Wakana, Y., Inoue, H., Tani, K., Dacks, J.B., Simmen, T., Tagaya, M., 2015. A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev. Cell* 32, 304–317. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.011>
- Arbel, N., Shoshan-Barmatz, V., 2010. Voltage-dependent anion channel 1-based peptides interact with Bcl-2 to prevent antiapoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 285, 6053–6062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082990>
- Archibald, J.M., 2015. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Curr. Biol.* 25, R911–R921. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
- Ardail, D., Lerme, F., Louisot, P., 1991. Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266, 7978–7981.
- Area-Gomez, E., de Groof, A.J.C., Boldogh, I., Bird, T.D., Gibson, G.E., Koehler, C.M., Yu, W.H., Duff, K.E., Yaffe, M.P., Pon, L.A., Schon, E.A., 2009. Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am. J. Pathol.* 175, 1810–1816. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090219>
- Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M., Demaurex, N., 2002. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 46696–46705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202395200>
- Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakgöl, G., Güney, E., Inouye, K., Hotamisligil, G.S., 2014. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat. Med.* 20, 1427–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.3735>
- Aspinwall, C.A., Qian, W.J., Roper, M.G., Kulkarni, R.N., Kahn, C.R., Kennedy, R.T., 2000. Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells. *J. Biol. Chem.* 275, 22331–22338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909647199>
- Austin, S., Tavakoli, M., Pfeiffer, C., Seifert, J., Mattarei, A., De Stefani, D., Zoratti, M., Nowikovsky, K., 2017. LETM1-Mediated K⁺ and Na⁺ Homeostasis Regulates Mitochondrial Ca²⁺ Efflux. *Front. Physiol.* 8, 839. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00839>
- Bachar, E., Ariav, Y., Ketzinel-Gilad, M., Cerasi, E., Kaiser, N., Leibowitz, G., 2009. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PloS One* 4, e4954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004954>
- Bannwarth, S., Procaccio, V., Lebre, A.S., Jardel, C., Chaussonot, A., Hoarau, C., Maoulida, H., Charrier, N., Gai, X., Xie, H.M., Ferre, M., Fragaki, K., Hardy, G., Mousson de Camaret, B., Marlin, S., Dhaenens, C.M., Slama, A., Rocher, C., Paul Bonnefont, J., Rötig, A., Aoutil, N., Gilleron, M., Desquirit-Dumas, V., Reynier, P., Ceresuela, J., Jonard, L., Devos, A., Espil-Taris, C., Martinez, D., Gagnard, P., Le Quan Sang, K.-H., Amati-Bonneau, P., Falk, M.J., Florentz, C., Chabrol, B., Durand-Zaleski, I., Paquis-Flucklinger, V., 2013. Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders. *J. Med. Genet.* 50, 704–714. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101604>
- Bánsághi, S., Golenár, T., Madesh, M., Csordás, G., RamachandraRao, S., Sharma, K., Yule, D.I., Joseph, S.K., Hajnóczky, G., 2014. Isoform- and species-specific control of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 289, 8170–8181. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504159>

- Barlow, J., Hirschberg Jensen, V., Affourtit, C., 2014. Uncoupling protein-2 attenuates palmitoleate protection against the cytotoxic production of mitochondrial reactive oxygen species in INS-1E insulinoma cells. *Redox Biol.* 4, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.009>
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P., 2005. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* 280, 18558–18561. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500089200>
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., Kotliansky, V., Mootha, V.K., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Baumann, O., Walz, B., 2001. Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int. Rev. Cytol.* 205, 149–214.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., Rossignol, R., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838–848. <https://doi.org/10.1242/jcs.03381>
- Bendayan, M., 1993. Pathway of insulin in pancreatic tissue on its release by the B-cell. *Am. J. Physiol.* 264, G187-194. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1993.264.2.G187>
- Bendayan, M., 1989. Ultrastructural localization of insulin and C-peptide antigenic sites in rat pancreatic B cell obtained by applying the quantitative high-resolution protein A-gold approach. *Am. J. Anat.* 185, 205–216. <https://doi.org/10.1002/aja.1001850213>
- Benham, A.M., van Lith, M., Sitia, R., Braakman, I., 2013. Ero1–PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0403>
- Benninger, R.K.P., Hutchens, T., Head, W.S., McCaughey, M.J., Zhang, M., Le Marchand, S.J., Satin, L.S., Piston, D.W., 2014. Intrinsic islet heterogeneity and gap junction coupling determine spatiotemporal Ca²⁺ wave dynamics. *Biophys. J.* 107, 2723–2733. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.048>
- Benninger, R.K.P., Zhang, M., Head, W.S., Satin, L.S., Piston, D.W., 2008. Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet. *Biophys. J.* 95, 5048–5061. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.140863>
- Ben-Othman, N., Vieira, A., Courtney, M., Record, F., Gjernes, E., Avolio, F., Hadzic, B., Druelle, N., Napolitano, T., Navarro-Sanz, S., Silvano, S., Al-Hasani, K., Pfeifer, A., Lacas-Gervais, S., Leuckx, G., Marroquí, L., Thévenet, J., Madsen, O.D., Eizirik, D.L., Heimberg, H., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Mansouri, A., Collombat, P., 2017. Long-Term GABA Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell* 168, 73-85.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.002>
- Bensellam, M., Jonas, J.-C., Laybutt, D.R., 2018. Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *J. Endocrinol.* 236, R109–R143. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0516>
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., Jonas, J.-C., 2012. The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 364, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.003>
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Blalchy-Dyson, E., Di Lisa, F., Forte, M.A., 2006. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 273, 2077–2099. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x>

- Bernhard, W., Haguenu, F., Gautier, A., Oberling, C., 1952. [Submicroscopical structure of cytoplasmic basophils in the liver, pancreas and salivary gland; study of ultrafine slices by electron microscope]. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* 1948 37, 281–300.
- Berridge, M.J., 2016. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 96, 1261–1296. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2016>
- Berridge, M.J., 2007. Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochem. Soc. Symp.* 1–7. <https://doi.org/10.1042/BSS0740001>
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Bertholet, A.M., Delerue, T., Millet, A.M., Moulis, M.F., David, C., Daloyau, M., Arnauné-Pelloquin, L., Davezac, N., Mils, V., Miquel, M.C., Rojo, M., Belenguer, P., 2016. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol. Dis.* 90, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.011>
- Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demareux, N., Hall, M.N., 2013. Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12526–12534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302455110>
- Biamonti, G., Maita, L., Montecucco, A., 2018. The Krebs Cycle Connection: Reciprocal Influence Between Alternative Splicing Programs and Cell Metabolism. *Front. Oncol.* 8, 408. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00408>
- Biden, T.J., Boslem, E., Chu, K.Y., Sue, N., 2014. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 25, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.02.003>
- Bolte, S., Cordelières, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Bononi, A., Bonora, M., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Giorgi, C., Pandolfi, P.P., Pinton, P., 2013. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca(2+) signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. *Cell Death Differ.* 20, 1631–1643. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.77>
- Booth, D.M., Enyedi, B., Geiszt, M., Várnai, P., Hajnóczky, G., 2016. Redox Nanodomains Are Induced by and Control Calcium Signaling at the ER-Mitochondrial Interface. *Mol. Cell* 63, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.040>
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., Berney, T., 2010. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202–1210. <https://doi.org/10.2337/db09-1177>
- Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A.K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D., Gasser, T., Augustin, R., Trümbach, D., Irrcher, I., Park, D.S., Wurst, W., Kilberg, M.S., Tatzelt, J., Winklhofer, K.F., 2011. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* 18, 769–782. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.142>
- Bouzakri, K., Ribaux, P., Halban, P.A., 2009. Silencing mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) protects beta cells from tumor necrosis factor-alpha-induced decrease of IRS-2 and inhibition of glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 284, 27892–27898. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048058>
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., Quiroga, C., Rodriguez, A.E., Verdejo, H.E., Ferreira, J., Iglewski, M., Chiong, M., Simmen, T., Zorzano, A., Hill, J.A., Rothermel, B.A., Szabadkai, G., Lavandro, S., 2011.

- Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J. Cell Sci.* 124, 2143–2152. <https://doi.org/10.1242/jcs.080762>
- Brelje, T.C., Bhagroo, N.V., Stout, L.E., Sorenson, R.L., 2008. Beneficial effects of lipids and prolactin on insulin secretion and beta-cell proliferation: a role for lipids in the adaptation of islets to pregnancy. *J. Endocrinol.* 197, 265–276. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0657>
- Brereton, M.F., Rohm, M., Shimomura, K., Holland, C., Tornovsky-Babeay, S., Dadon, D., Iberl, M., Chibalina, M.V., Lee, S., Glaser, B., Dor, Y., Rorsman, P., Clark, A., Ashcroft, F.M., 2016. Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic β -cells. *Nat. Commun.* 7, 13496. <https://doi.org/10.1038/ncomms13496>
- Brereton, M.F., Vergari, E., Zhang, Q., Clark, A., 2015. Alpha-, Delta- and PP-cells. *J. Histochem. Cytochem.* 63, 575–591. <https://doi.org/10.1369/0022155415583535>
- Briaud, I., Rouault, C., Reach, G., Poitout, V., 1999. Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels. *Metabolism.* 48, 319–323.
- Brun, T., Maechler, P., 2016. Beta-cell mitochondrial carriers and the diabetogenic stress response. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2540–2549. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.012>
- Busardò, F.P., Kyriakou, C., Marchei, E., Pacifici, R., Pedersen, D.S., Pichini, S., 2017. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for determination of GHB, precursors and metabolites in different specimens: Application to clinical and forensic cases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 137, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.01.022>
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., Caicedo, A., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2334–2339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>
- Calì, T., Ottolini, D., Negro, A., Brini, M., 2013. Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca^{2+} transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 495–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.01.004>
- Calì, T., Ottolini, D., Negro, A., Brini, M., 2012. α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* 287, 17914–17929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302794>
- Callegari, S., Dennerlein, S., 2018. Sensing the Stress: A Role for the UPRmt and UPRam in the Quality Control of Mitochondria. *Front. Cell Dev. Biol.* 6, 31. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00031>
- Carlsson, C., Borg, L.A., Welsh, N., 1999. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140, 3422–3428. <https://doi.org/10.1210/endo.140.8.6908>
- Carré, M., André, N., Carles, G., Borghi, H., Bricchese, L., Briand, C., Braguer, D., 2002. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J. Biol. Chem.* 277, 33664–33669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203834200>
- Cartoni, R., Léger, B., Hock, M.B., Praz, M., Crettenand, A., Pich, S., Ziltener, J.-L., Luthi, F., Dériaz, O., Zorzano, A., Gobelet, C., Kralli, A., Russell, A.P., 2005. Mitofusins 1/2

- and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J. Physiol.* 567, 349–358. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.092031>
- Cassel, R., Ducreux, S., Alam, M.R., Dingreville, F., Berlé, C., Burda-Jacob, K., Chauvin, M.A., Chikh, K., Païta, L., Al-Mawla, R., Crola Da Silva, C., Rieusset, J., Thivolet, C., Van Coppenolle, F., Madec, A.M., 2016. Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. *PloS One* 11, e0148686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148686>
- Chakrabarti, R., Ji, W.-K., Stan, R.V., de Juan Sanz, J., Ryan, T.A., Higgs, H.N., 2018. INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J. Cell Biol.* 217, 251–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709111>
- Chan, C.B., De Leo, D., Joseph, J.W., McQuaid, T.S., Ha, X.F., Xu, F., Tsushima, R.G., Pennefather, P.S., Salapatek, A.M., Wheeler, M.B., 2001. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50, 1302–1310.
- Charles, M.A., Eschwège, E., Thibult, N., Claude, J.R., Warnet, J.M., Rosselin, G.E., Girard, J., Balkau, B., 1997. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 40, 1101–1106.
- Chen, C., Xie, Z., Shen, Y., Xia, S.F., 2018. The Roles of Thyroid and Thyroid Hormone in Pancreas: Physiology and Pathology. *Int. J. Endocrinol.* 2018, 2861034. <https://doi.org/10.1155/2018/2861034>
- Chen, H., Chomyn, A., Chan, D.C., 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* 280, 26185–26192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503062200>
- Chen, S., Novick, P., Ferro-Novick, S., 2013. ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.02.006>
- Chen, Y.-F., Kao, C.-H., Chen, Y.-T., Wang, C.-H., Wu, C.-Y., Tsai, C.-Y., Liu, F.-C., Yang, C.-W., Wei, Y.-H., Hsu, M.-T., Tsai, S.-F., Tsai, T.-F., 2009. Cisd2 deficiency drives premature aging and causes mitochondria-mediated defects in mice. *Genes Dev.* 23, 1183–1194. <https://doi.org/10.1101/gad.1779509>
- Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F., 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21, 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
- Cho, B., Cho, H.M., Jo, Y., Kim, H.D., Song, M., Moon, C., Kim, Hyongbum, Kim, K., Sesaki, H., Rhyu, I.J., Kim, Hyun, Sun, W., 2017. Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat. Commun.* 8, 15754. <https://doi.org/10.1038/ncomms15754>
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., Frohman, M.A., 2006. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 1255–1262. <https://doi.org/10.1038/ncb1487>
- Cieri, D., Vicario, M., Giacomello, M., Vallese, F., Filadi, R., Wagner, T., Pozzan, T., Pizzo, P., Scorrano, L., Brini, M., Cali, T., 2018. SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ.* 25, 1131–1145. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0033-z>
- Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J.Y., Ohmura, Y., Sandoval, P.R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L.E., Marchetti, P., Accili, D., 2016. Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1044–1054. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2860>

- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L., De Strooper, B., 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.021>
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Ciregia, F., Bugliani, M., Ronci, M., Giusti, L., Boldrini, C., Mazzoni, M.R., Mossuto, S., Grano, F., Cnop, M., Marselli, L., Giannaccini, G., Urbani, A., Lucacchini, A., Marchetti, P., 2017. Palmitate-induced lipotoxicity alters acetylation of multiple proteins in clonal β cells and human pancreatic islets. *Sci. Rep.* 7, 13445. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13908-w>
- Cnop, M., Toivonen, S., Igoillo-Esteve, M., Salpea, P., 2017. Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells. *Mol. Metab.* 6, 1024–1039. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.001>
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., Hajnóczky, G., 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* 174, 915–921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604016>
- Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T.G., Balla, T., Hajnóczky, G., 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell* 39, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.029>
- Da Silva Xavier, G., 2018. The Cells of the Islets of Langerhans. *J. Clin. Med.* 7. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- D'Alessandris, C., Andreozzi, F., Federici, M., Cardellini, M., Brunetti, A., Ranalli, M., Del Guerra, S., Lauro, D., Del Prato, S., Marchetti, P., Lauro, R., Sesti, G., 2004. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 959–961. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0725fje>
- Darling, N.J., Cook, S.J., 2014. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res., Calcium Signaling in Health and Disease* 1843, 2150–2163. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.009>
- de Brito, O.M., Scorrano, L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610. <https://doi.org/10.1038/nature07534>
- De Pinto, V., Guarino, F., Guarnera, A., Messina, A., Reina, S., Tomasello, F.M., Palermo, V., Mazzoni, C., 2010. Characterization of human VDAC isoforms: a peculiar function for VDAC3? *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.031>
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., Rizzuto, R., 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230>
- De Stefani, D., Rizzuto, R., Pozzan, T., 2016. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 161–192. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034216>
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., Schuit, F., 1995. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J. Clin. Invest.* 96, 2489–2495. <https://doi.org/10.1172/JCI118308>

- Dejeans, N., Tajeddine, N., Beck, R., Verrax, J., Taper, H., Gailly, P., Calderon, P.B., 2010. Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1221–1230. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.12.009>
- Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., Del Prato, S., Marchetti, P., 2005. Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 727–735.
- Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., Julier, C., 2000. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* 25, 406–409. <https://doi.org/10.1038/78085>
- Deluca, H.F., Engstrom, G.W., 1961. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 1744–1750.
- Denzel, M.S., Antebi, A., 2015. Hexosamine pathway and (ER) protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.10.001>
- Dhayal, S., Welters, H.J., Morgan, N.G., 2008. Structural requirements for the cytoprotective actions of mono-unsaturated fatty acids in the pancreatic beta-cell line, BRIN-BD11. *Br. J. Pharmacol.* 153, 1718–1727. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.43>
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., Raptis, S.A., 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93 Suppl 1, S52-59. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6)
- Dimmer, K.S., Navoni, F., Casarin, A., Trevisson, E., Ende, S., Winterpacht, A., Salvati, L., Scorrano, L., 2008. LETM1, deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome is required for normal mitochondrial morphology and cellular viability. *Hum. Mol. Genet.* 17, 201–214. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm297>
- Ding, H., Jiang, N., Liu, H., Liu, X., Liu, D., Zhao, F., Wen, L., Liu, S., Ji, L.L., Zhang, Y., 2010. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.08.007>
- Doghman-Bouguerra, M., Granatiero, V., Sbiera, S., Sbiera, I., Lacas-Gervais, S., Brau, F., Fassnacht, M., Rizzuto, R., Lalli, E., 2016. FATE1 antagonizes calcium- and drug-induced apoptosis by uncoupling ER and mitochondria. *EMBO Rep.* 17, 1264–1280. <https://doi.org/10.15252/embr.201541504>
- Dong, Z., Shanmughapriya, S., Tomar, D., Siddiqui, N., Lynch, S., Nemani, N., Breves, S.L., Zhang, X., Tripathi, A., Palaniappan, P., Riitano, M.F., Worth, A., Seelam, A., Carvalho, E., Subbiah, R., Jaña, F., Soboloff, J., Peng, Y., Cheung, J.Y., Joseph, S.K., Caplan, J., Rajan, S., Stathopoulos, P.B., Madesh, M., 2017. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor That Augments MCU Channel Activity. *Mol. Cell* 65, 1014-1028.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.032>
- Echtay, K.S., Bienengraeber, M., Mayinger, P., Heimpel, S., Winkler, E., Druhm, D., Frischmuth, K., Kamp, F., Huang, S.-G., 2018. Uncoupling proteins: Martin Klingenberg's contributions for 40 years. *Arch. Biochem. Biophys.* 657, 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.09.006>
- Ehse, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K.J., Biollaz, G., Fontana, A., Reinecke, M., Hom-Delarche, F., Donath, M.Y., 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356–2370. <https://doi.org/10.2337/db06-1650>
- Elgass, K.D., Smith, E.A., LeGros, M.A., Larabell, C.A., Ryan, M.T., 2015. Analysis of ER-mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray

- tomography of mammalian cells. *J. Cell Sci.* 128, 2795–2804.
<https://doi.org/10.1242/jcs.169136>
- Engin, F., Nguyen, T., Yermalovich, A., Hotamisligil, G.S., 2014. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 4, 4054.
<https://doi.org/10.1038/srep04054>
- Filadi, R., Greotti, E., Pizzo, P., 2018a. Highlighting the endoplasmic reticulum-mitochondria connection: Focus on Mitofusin 2. *Pharmacol. Res.* 128, 42–51.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.003>
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., Pizzo, P., 2017a. On the role of Mitofusin 2 in endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2266–E2267. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616040114>
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., Pizzo, P., 2015. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E2174–2181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504880112>
- Filadi, R., Pendin, D., Pizzo, P., 2018b. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis.* 9, 330. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0023-6>
- Filadi, R., Theurey, P., Pizzo, P., 2017b. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* 62, 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.003>
- Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R., Prevarskaya, N., 2006. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1215–1217. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5254fje>
- Fontés, G., Zarrouki, B., Hagman, D.K., Latour, M.G., Semache, M., Roskens, V., Moore, P.C., Prentki, M., Rhodes, C.J., Jetton, T.L., Poitout, V., 2010. Glucolipotoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 53, 2369–2379. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1850-5>
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.-H., Mak, D.-O.D., 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol. Rev.* 87, 593–658.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2006>
- Foyer, C.H., 2018. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* 154, 134–142.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S.M., Ostman, A., Landegren, U., 2002. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* 20, 473–477. <https://doi.org/10.1038/nbt0502-473>
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., Voeltz, G.K., 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334, 358–362.
<https://doi.org/10.1126/science.1207385>
- Friedman, J.R., Nunnari, J., 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343.
<https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Gabaldón, T., Huynen, M.A., 2004. Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim. Biophys. Acta* 1659, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.07.011>
- Gandre-Babbe, S., van der Blik, A.M., 2008. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 2402–2412. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1287>
- Gao, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., Yang, C., Pannikar, A., Doliba, N., Zhang, T., Stoffers, D.A., Edlund, H., Matschinsky, F., Stein, R., Stanger, B.Z., 2014. Pdx1 maintains β cell identity and function by repressing an α cell program. *Cell Metab.* 19, 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.002>

- Gelmetti, V., De Rosa, P., Torosantucci, L., Marini, E.S., Romagnoli, A., Di Rienzo, M., Arena, G., Vignone, D., Fimia, G.M., Valente, E.M., 2017. PINK1 and BECN1 relocalize at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. *Autophagy* 13, 654–669. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1277309>
- Ghadially, F.N., 1975. Ultrastructural pathology of the cell: a text and atlas of physiological and pathological alterations in cell fine structure. Butterworths, London ; Boston.
- Giacomello, M., Pellegrini, L., 2016. The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* 23, 1417–1427. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.52>
- Gincel, D., Silberberg, S.D., Shoshan-Barmatz, V., 2000. Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 571–583.
- Giorgi, C., Bonora, M., Sorrentino, G., Missioli, S., Poletti, F., Suski, J.M., Galindo Ramirez, F., Rizzuto, R., Di Virgilio, F., Zito, E., Pandolfi, P.P., Wieckowski, M.R., Mammano, F., Del Sal, G., Pinton, P., 2015. p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1779–1784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410723112>
- Giorgi, C., Ito, K., Lin, H.-K., Santangelo, C., Wieckowski, M.R., Lebedzinska, M., Bononi, A., Bonora, M., Duszynski, J., Bernardi, R., Rizzuto, R., Tacchetti, C., Pinton, P., Pandolfi, P.P., 2010. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science* 330, 1247–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1189157>
- Goyal, R., Jialal, I., 2018. Diabetes Mellitus, Type 2, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J.S., Sander, M., Robertson, R.P., Powers, A.C., Stein, R., 2013. Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 123, 3305–3316. <https://doi.org/10.1172/JCI65390>
- Gutiérrez, T., Simmen, T., 2018. Endoplasmic reticulum chaperones tweak the mitochondrial calcium rheostat to control metabolism and cell death. *Cell Calcium* 70, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.015>
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., Yoshimori, T., 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature11910>
- Hammadi, M., Oulidi, A., Gackière, F., Katsogiannou, M., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Dewailly, E., Delcourt, P., Lepage, G., Lotteau, S., Ducreux, S., Prevarskaya, N., Van Coppenolle, F., 2013. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 1600–1609. <https://doi.org/10.1096/fj.12-218875>
- Hansen, J.B., Dos Santos, L.R.B., Liu, Y., Prentice, K.J., Teudt, F., Tonnesen, M., Jonas, J.-C., Wheeler, M.B., Mandrup-Poulsen, T., 2018. Glucolipotoxic conditions induce β -cell iron import, cytosolic ROS formation and apoptosis. *J. Mol. Endocrinol.* 61, 69–77. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0262>
- Hara, T., Mahadevan, J., Kanekura, K., Hara, M., Lu, S., Urano, F., 2014. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to β -cell death. *Endocrinology* 155, 758–768. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1519>
- Hayashi, T., Su, T.-P., 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>

- Hellman, B., 1959. The frequency distribution of the number and volume of the islets Langerhans in man. I. Studies on non-diabetic adults. *Acta Soc. Med. Ups.* 64, 432–460.
- Henquin, J.C., 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52, 739–751. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1314-y>
- Higo, T., Hamada, K., Hisatsune, C., Nukina, N., Hashikawa, T., Hattori, M., Nakamura, T., Mikoshiba, K., 2010. Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron* 68, 865–878. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.010>
- Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K., 2005. Subtype-specific and ER luminal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 120, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.048>
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G., 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90–94. <https://doi.org/10.1038/nm1168>
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J., 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3633–3638.
- Hirschberg Jensen, V., Affourtit, C., 2015. Mitochondrial uncoupling protein-2 is not involved in palmitate-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E insulinoma cells and is not needed for the amplification of insulin release. *Biochem. Biophys. Rep.* 1, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.03.008>
- Hodson, D.J., Mitchell, R.K., Bellomo, E.A., Sun, G., Vinet, L., Meda, P., Li, D., Li, W.-H., Bugliani, M., Marchetti, P., Bosco, D., Piemonti, L., Johnson, P., Hughes, S.J., Rutter, G.A., 2013. Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human β cell connectivity. *J. Clin. Invest.* 123, 4182–4194. <https://doi.org/10.1172/JCI68459>
- Hom, J.R., Gewandter, J.S., Michael, L., Sheu, S.-S., Yoon, Y., 2007. Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 212, 498–508. <https://doi.org/10.1002/jcp.21051>
- Homo-Delarche, F., Calderari, S., Irminger, J.-C., Gangnerau, M.-N., Coulaud, J., Rickenbach, K., Dolz, M., Halban, P., Portha, B., Serradas, P., 2006. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes* 55, 1625–1633. <https://doi.org/10.2337/db05-1526>
- Hraha, T.H., Bernard, A.B., Nguyen, L.M., Anseth, K.S., Benninger, R.K.P., 2014. Dimensionality and size scaling of coordinated Ca(2+) dynamics in MIN6 β -cell clusters. *Biophys. J.* 106, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.026>
- Huang, P., Galloway, C.A., Yoon, Y., 2011. Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PloS One* 6, e20655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020655>
- Ikeda, H., 1994. KK mouse. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 24 Suppl, S313-316.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P., Rogers, D., Mikuni, M., Kumashiro, H., Higashi, K., Sobue, G., Oka, Y., Permutt, M.A., 1998. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.* 20, 143–148. <https://doi.org/10.1038/2441>
- Ishihara, N., Eura, Y., Mihara, K., 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 117, 6535–6546. <https://doi.org/10.1242/jcs.01565>

- Ishikawa, H., Barber, G.N., 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678. <https://doi.org/10.1038/nature07317>
- Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J., 2012. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 18, 759–765. <https://doi.org/10.1038/nm.2736>
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173–176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
- Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A.-L., Datler, C., Pazarentzos, E., Grimm, S., 2011. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* 30, 556–568. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.346>
- Jakupciak, J.P., Maragh, S., Markowitz, M.E., Greenberg, A.K., Hoque, M.O., Maitra, A., Barker, P.E., Wagner, P.D., Rom, W.N., Srivastava, S., Sidransky, D., O’Connell, C.D., 2008. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. *BMC Cancer* 8, 285. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-285>
- Jaques, F., Jousset, H., Tomas, A., Prost, A.-L., Wollheim, C.B., Irminger, J.-C., Demaurex, N., Halban, P.A., 2008. Dual effect of cell-cell contact disruption on cytosolic calcium and insulin secretion. *Endocrinology* 149, 2494–2505. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0974>
- Jhun, B.S., Lee, H., Jin, Z.-G., Yoon, Y., 2013. Glucose stimulation induces dynamic change of mitochondrial morphology to promote insulin secretion in the insulinoma cell line INS-1E. *PloS One* 8, e60810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060810>
- Johnston, N.R., Mitchell, R.K., Haythorne, E., Pessoa, M.P., Semplici, F., Ferrer, J., Piemonti, L., Marchetti, P., Bugliani, M., Bosco, D., Berishvili, E., Duncanson, P., Watkinson, M., Broichhagen, J., Trauner, D., Rutter, G.A., Hodson, D.J., 2016. Beta Cell Hubs Dictate Pancreatic Islet Responses to Glucose. *Cell Metab.* 24, 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.020>
- Jonikas, M.C., Collins, S.R., Denic, V., Oh, E., Quan, E.M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J.S., Schuldiner, M., 2009. Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 323, 1693–1697. <https://doi.org/10.1126/science.1167983>
- Kabra, U.D., Pfuhlmann, K., Migliorini, A., Keipert, S., Lamp, D., Korsgren, O., Gegg, M., Woods, S.C., Pfluger, P.T., Lickert, H., Affourtit, C., Tschöp, M.H., Jastroch, M., 2017. Direct Substrate Delivery Into Mitochondrial Fission-Deficient Pancreatic Islets Rescues Insulin Secretion. *Diabetes* 66, 1247–1257. <https://doi.org/10.2337/db16-1088>
- Kainu, V., Hermansson, M., Hänninen, S., Hokynar, K., Somerharju, P., 2013. Import of phosphatidylserine to and export of phosphatidylethanolamine molecular species from mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.11.003>
- Kalwat, M.A., Cobb, M.H., 2017. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. *Pharmacol. Ther.* 179, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.003>
- Kaneto, H., Suzuma, K., Sharma, A., Bonner-Weir, S., King, G.L., Weir, G.C., 2002. Involvement of protein kinase C beta 2 in c-myc induction by high glucose in

- pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 277, 3680–3685.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109647200>
- Karunakaran, U., Kim, H.-J., Kim, J.-Y., Lee, I.-K., 2012. Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and β -cell failure in type II diabetes. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 639762. <https://doi.org/10.1155/2012/639762>
- Katayama, T., Imaizumi, K., Manabe, T., Hitomi, J., Kudo, T., Tohyama, M., 2004. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* 28, 67–78.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.12.004>
- Kaufman, R.J., Back, S.H., Song, B., Han, J., Hassler, J., 2010. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in β -cells. *Diabetes Obes. Metab.* 12 Suppl 2, 99–107. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01281.x>
- Keane, D.C., Takahashi, H.K., Dhayal, S., Morgan, N.G., Curi, R., Newsholme, P., 2011. Arachidonic acid actions on functional integrity and attenuation of the negative effects of palmitic acid in a clonal pancreatic β -cell line. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 120, 195–206. <https://doi.org/10.1042/CS20100282>
- Kebede, M.A., Alquier, T., Latour, M.G., Poitout, V., 2009. Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes. Metab.* 11 Suppl 4, 10–20.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01114.x>
- Khan, F.A., Goforth, P.B., Zhang, M., Satin, L.S., 2001. Insulin activates ATP-sensitive K(+) channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* 50, 2192–2198.
- Kieffer, T.J., Woltjen, K., Osafune, K., Yabe, D., Inagaki, N., 2017. Beta-cell replacement strategies for diabetes. *J. Diabetes Investig.* <https://doi.org/10.1111/jdi.12758>
- Kim-Muller, J.Y., Zhao, S., Srivastava, S., Mugabo, Y., Noh, H.-L., Kim, Y.R., Madiraju, S.R.M., Ferrante, A.W., Skolnik, E.Y., Prentki, M., Accili, D., 2014. Metabolic inflexibility impairs insulin secretion and results in MODY-like diabetes in triple FoxO-deficient mice. *Cell Metab.* 20, 593–602.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.012>
- King, G.L., 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J. Periodontol.* 79, 1527–1534. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080246>
- Knutson, K.L., Hoenig, M., 1994. Identification and subcellular characterization of protein kinase-C isoforms in insulinoma beta-cells and whole islets. *Endocrinology* 135, 881–886. <https://doi.org/10.1210/endo.135.3.8070382>
- Kopec, K.O., Alva, V., Lupas, A.N., 2010. Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 1927–1931.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq326>
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., Walter, P., 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477–481. <https://doi.org/10.1126/science.1175088>
- Kornmann, B., Walter, P., 2010. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* 123, 1389–1393.
<https://doi.org/10.1242/jcs.058636>
- Koya, D., Jirousek, M.R., Lin, Y.W., Ishii, H., Kuboki, K., King, G.L., 1997. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 100, 115–126. <https://doi.org/10.1172/JCI119503>

- Kristinsson, H., Smith, D.M., Bergsten, P., Sargsyan, E., 2013. FFAR1 is involved in both the acute and chronic effects of palmitate on insulin secretion. *Endocrinology* 154, 4078–4088. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1352>
- Kulkarni, R.N., Brüning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., Kahn, C.R., 1999a. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329–339.
- Kulkarni, R.N., Winnay, J.N., Daniels, M., Brüning, J.C., Flier, S.N., Hanahan, D., Kahn, C.R., 1999b. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J. Clin. Invest.* 104, R69-75. <https://doi.org/10.1172/JCI8339>
- Kumarswamy, R., Chandna, S., 2009. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2008.10.003>
- Kuznetsov, A.V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., Margreiter, R., 2009. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1928–1939. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.03.007>
- Lahiri, S., Chao, J.T., Tavassoli, S., Wong, A.K.O., Choudhary, V., Young, B.P., Loewen, C.J.R., Prinz, W.A., 2014. A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol.* 12, e1001969. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001969>
- Lang, A., John Peter, A.T., Kornmann, B., 2015. ER-mitochondria contact sites in yeast: beyond the myths of ERMES. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.03.002>
- Lang, S., Pfeiffer, S., Lee, P.-H., Cavalié, A., Helms, V., Förster, F., Zimmermann, R., 2017. An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front. Physiol.* 8, 887. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00887>
- Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A., Robinson, D.G., 2012. ERES (ER exit sites) and the “Secretory Unit Concept.” *J. Microsc.* 247, 48–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2011.03597.x>
- Lawrence, M., Shao, C., Duan, L., McGlynn, K., Cobb, M.H., 2008. The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 192, 11–17. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01785.x>
- Lax, N.Z., Turnbull, D.M., Reeve, A.K., 2011. Mitochondrial Mutations. *The Neuroscientist* 17, 645–658. <https://doi.org/10.1177/1073858411385469>
- Lee, B., Jonas, J.C., Weir, G.C., Laychock, S.G., 1999. Glucose regulates expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology* 140, 2173–2182. <https://doi.org/10.1210/endo.140.5.6738>
- Lee, B., Laychock, S.G., 2001. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform expression in mouse pancreatic islets: effects of carbachol. *Biochem. Pharmacol.* 61, 327–336.
- Lee, B., Laychock, S.G., 2000. Regulation of inositol trisphosphate receptor isoform expression in glucose-desensitized rat pancreatic islets: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and calcium. *Endocrinology* 141, 1394–1402. <https://doi.org/10.1210/endo.141.4.7421>
- Lee, T.G., Tang, N., Thompson, S., Miller, J., Katze, M.G., 1994. The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide repeat family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2331–2342.
- Leibiger, I.B., Leibiger, B., Berggren, P.-O., 2002. Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett.* 532, 1–6.

- Leifke, E., Naik, H., Wu, J., Viswanathan, P., Demanno, D., Kipnes, M., Vakilynejad, M., 2012. A multiple-ascending-dose study to evaluate safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a novel GPR40 agonist, TAK-875, in subjects with type 2 diabetes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 29–39. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.43>
- Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.-L., Ktorza, A., Casteilla, L., Pénicaud, L., 2009. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58, 673–681. <https://doi.org/10.2337/db07-1056>
- Lemaire, K., Granvik, M., Schraenen, A., Goyvaerts, L., Van Lommel, L., Gómez-Ruiz, A., In 't Veld, P., Gilon, P., Schuit, F., 2017. How stable is repression of disallowed genes in pancreatic islets in response to metabolic stress? *PloS One* 12, e0181651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181651>
- Lenzen, S., 2017. Chemistry and biology of reactive species with special reference to the antioxidative defence status in pancreatic β -cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861, 1929–1942. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.05.013>
- Lenzen, S., 2008. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 343–347. <https://doi.org/10.1042/BST0360343>
- Li, F., Munsey, T.S., Sivaprasadarao, A., 2017. TRPM2-mediated rise in mitochondrial Zn²⁺ promotes palmitate-induced mitochondrial fission and pancreatic β -cell death in rodents. *Cell Death Differ.* 24, 1999–2012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.118>
- Li, N., Brun, T., Cnop, M., Cunha, D.A., Eizirik, D.L., Maechler, P., 2009. Transient oxidative stress damages mitochondrial machinery inducing persistent beta-cell dysfunction. *J. Biol. Chem.* 284, 23602–23612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024323>
- Li, N., Karaca, M., Maechler, P., 2017. Upregulation of UCP2 in beta-cells confers partial protection against both oxidative stress and glucotoxicity. *Redox Biol.* 13, 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.012>
- Li, X., Zhong, K., Guo, Z., Zhong, D., Chen, X., 2015. Fasiglifam (TAK-875) Inhibits Hepatobiliary Transporters: A Possible Factor Contributing to Fasiglifam-Induced Liver Injury. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 43, 1751–1759. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064121>
- Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J., Chen, Z., 2014. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 46, 629–640. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu048>
- Li, Z., Xu, X., Huang, W., Qian, H., 2018. Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) as an Emerging Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus: Recent Progress and Prevailing Challenges. *Med. Res. Rev.* 38, 381–425. <https://doi.org/10.1002/med.21441>
- Lièvremon, J.P., Rizzuto, R., Hendershot, L., Meldolesi, J., 1997. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* 272, 30873–30879.
- Liew, C.W., Bochenski, J., Kawamori, D., Hu, J., Leech, C.A., Wanic, K., Malecki, M., Warram, J.H., Qi, L., Krolewski, A.S., Kulkarni, R.N., 2010. The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse beta cells. *J. Clin. Invest.* 120, 2876–2888. <https://doi.org/10.1172/JCI36849>
- Lin, N., Zhang, H., Su, Q., 2012. Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress. *Diabetes Metab.* 38, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2012.01.003>

- Liu, Y., Zhu, X., 2017. Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Transl. Neurodegener.* 6, 21. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0092-6>
- Lo, M.-C., Chen, M.-H., Lee, W.-S., Lu, C.-I., Chang, C.-R., Kao, S.-H., Lee, H.-M., 2015. N ϵ -(carboxymethyl) lysine-induced mitochondrial fission and mitophagy cause decreased insulin secretion from β -cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309, E829-839. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00151.2015>
- Logan, C.V., Szabadkai, G., Sharpe, J.A., Parry, D.A., Torelli, S., Childs, A.-M., Kriek, M., Phadke, R., Johnson, C.A., Roberts, N.Y., Bonthron, D.T., Pysden, K.A., Whyte, T., Munteanu, I., Foley, A.R., Wheway, G., Szymanska, K., Natarajan, S., Abdelhamed, Z.A., Morgan, J.E., Roper, H., Santen, G.W.E., Nicks, E.H., van der Pol, W.L., Lindhout, D., Raffaello, A., De Stefani, D., den Dunnen, J.T., Sun, Y., Ginjaar, I., Sewry, C.A., Hurler, M., Rizzuto, R., UK10K Consortium, Duchon, M.R., Muntoni, F., Sheridan, E., 2014. Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nat. Genet.* 46, 188–193. <https://doi.org/10.1038/ng.2851>
- Lombardi, A., Ulianich, L., Treglia, A.S., Nigro, C., Parrillo, L., Lofrumento, D.D., Nicolardi, G., Garbi, C., Beguinot, F., Miele, C., Di Jeso, B., 2012. Increased hexosamine biosynthetic pathway flux dedifferentiates INS-1E cells and murine islets by an extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2-mediated signal transmission pathway. *Diabetologia* 55, 141–153. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2315-1>
- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., Chan, D.C., 2013. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* 24, 659–667. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>
- Lynes, E.M., Raturi, A., Shenkman, M., Ortiz Sandoval, C., Yap, M.C., Wu, J., Janowicz, A., Myhill, N., Benson, M.D., Campbell, R.E., Berthiaume, L.G., Lederkremer, G.Z., Simmen, T., 2013. Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER Ca²⁺ signaling. *J. Cell Sci.* 126, 3893–3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.125856>
- Ma, Z.A., Zhao, Z., Turk, J., 2012. Mitochondrial dysfunction and β -cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 703538. <https://doi.org/10.1155/2012/703538>
- MacDonald, P.E., Joseph, J.W., Rorsman, P., 2005. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic β -cells. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 2211–2225. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1762>
- Madec, A.-M., Cassel, R., Dubois, S., Ducreux, S., Vial, G., Chauvin, M.-A., Mesnier, A., Chikh, K., Bosco, D., Rieusset, J., Van Coppenolle, F., Thivolet, C., 2013. Losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, protects human islets from glucotoxicity through the phospholipase C pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 5122–5130. <https://doi.org/10.1096/fj.13-234104>
- Maedler, K., Oberholzer, J., Bucher, P., Spinas, G.A., Donath, M.Y., 2003. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52, 726–733.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., Donath, M.Y., 2002. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 110, 851–860. <https://doi.org/10.1172/JCI15318>
- Magnan, C., Ktorza, A., 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinol.* 2, 241–264. <https://doi.org/10.1016/j.emcend.2005.07.001>
- Mahadevan, J., Parazzoli, S., Oseid, E., Hertzog, A.V., Bernlohr, D.A., Vallerie, S.N., Liu, C., Lopez, M., Harmon, J.S., Robertson, R.P., 2013. Ebselen treatment prevents islet

- apoptosis, maintains intranuclear Pdx-1 and MafA levels, and preserves β -cell mass and function in ZDF rats. *Diabetes* 62, 3582–3588. <https://doi.org/10.2337/db13-0357>
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mayhew, D., 1967. A possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 46, 1724–1734. <https://doi.org/10.1172/JCI105663>
- Mammucari, C., Raffaello, A., Vecellio Reane, D., Gherardi, G., De Mario, A., Rizzuto, R., 2018. Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models. *Pflugers Arch.* 470, 1165–1179. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2123-2>
- Mannella, C.A., Buttle, K., Rath, B.K., Marko, M., 1998. Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *BioFactors Oxf. Engl.* 8, 225–228.
- Marchi, S., Giorgi, C., Oparka, M., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., Pinton, P., 2014. Oncogenic and oncosuppressive signal transduction at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *Mol. Cell. Oncol.* 1, e956469. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.956469>
- Masini, M., Martino, L., Marselli, L., Bugliani, M., Boggi, U., Filipponi, F., Marchetti, P., De Tata, V., 2017. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 33. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2894>
- Matsumoto, M., Minami, M., Takeda, K., Sakao, Y., Akira, S., 1996. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett.* 395, 143–147.
- McCulloch, L.J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K.N., Clark, A., Gloyn, A.L., 2011. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol. Genet. Metab.* 104, 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.026>
- McKenzie, M.D., Jamieson, E., Jansen, E.S., Scott, C.L., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Allison, J., Kay, T.W.H., Strasser, A., Thomas, H.E., 2010. Glucose induces pancreatic islet cell apoptosis that requires the BH3-only proteins Bim and Puma and multi-BH domain protein Bax. *Diabetes* 59, 644–652. <https://doi.org/10.2337/db09-1151>
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J., 2006. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.021>
- Mehmeti, I., Lortz, S., Elsner, M., Lenzen, S., 2014. Peroxiredoxin 4 improves insulin biosynthesis and glucose-induced insulin secretion in insulin-secreting INS-1E cells. *J. Biol. Chem.* 289, 26904–26913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.568329>
- Meier, P.J., Spycher, M.A., Meyer, U.A., 1981. Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 646, 283–297.
- Mellor, H., Parker, P.J., 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332 (Pt 2), 281–292.
- Men, X., Wang, H., Li, M., Cai, H., Xu, S., Zhang, W., Xu, Y., Ye, L., Yang, W., Wollheim, C.B., Lou, J., 2009. Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 879–890. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.031>
- Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Löwer, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.-C., Waisman, A., Westermann, B., Langer, T., 2008. Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae

- morphogenesis in mitochondria. *Genes Dev.* 22, 476–488.
<https://doi.org/10.1101/gad.460708>
- Miriyala, S., Spasojevic, I., Tovmasyan, A., Salvemini, D., Vujaskovic, Z., Clair, D.S., Batinic-Haberle, I., 2012. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 794. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.002>
- Missiroli, S., Patergnani, S., Caroccia, N., Pedriali, G., Perrone, M., Previati, M., Wieckowski, M.R., Giorgi, C., 2018. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis.* 9, 329. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0027-2>
- Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., Lippincott-Schwartz, J., 2009. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11960–11965.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904875106>
- Miyazono, Y., Hirashima, S., Ishihara, N., Kusukawa, J., Nakamura, K.-I., Ohta, K., 2018. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Sci. Rep.* 8, 350.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18582-6>
- Molina, A.J.A., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2009. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58, 2303–2315.
<https://doi.org/10.2337/db07-1781>
- Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R., McKillop, A.M., 2014. Evaluation of the insulin-releasing and glucose-lowering effects of GPR120 activation in pancreatic β -cells. *Diabetes Obes. Metab.* 16, 1128–1139. <https://doi.org/10.1111/dom.12330>
- Muñoz, J.P., Ivanova, S., Sánchez-Wandelmer, J., Martínez-Cristóbal, P., Noguera, E., Sancho, A., Díaz-Ramos, A., Hernández-Alvarez, M.I., Sebastián, D., Mauvezin, C., Palacín, M., Zorzano, A., 2013. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J.* 32, 2348–2361.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2013.168>
- Murphy, E., Pan, X., Nguyen, T., Liu, J., Holmström, K.M., Finkel, T., 2014. Unresolved questions from the analysis of mice lacking MCU expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449, 384–385. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.144>
- Nagashima, S., Tokuyama, T., Yonashiro, R., Inatome, R., Yanagi, S., 2014. Roles of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL/MARCH5 in mitochondrial dynamics and diseases. *J. Biochem. (Tokyo)* 155, 273–279. <https://doi.org/10.1093/jb/mvu016>
- Nagasumi, K., Esaki, R., Iwachidow, K., Yasuhara, Y., Ogi, K., Tanaka, H., Nakata, M., Yano, T., Shimakawa, K., Taketomi, S., Takeuchi, K., Odaka, H., Kaisho, Y., 2009. Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes* 58, 1067–1076. <https://doi.org/10.2337/db08-1233>
- Naon, D., Scorrano, L., 2014. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2184–2194.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.011>
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernández-Alvarez, M.I., Zorzano, A., De Stefani, D., Dorn, G.W., Scorrano, L., 2016. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 11249–11254. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606786113>
- Neumann, D., Bückers, J., Kastrup, L., Hell, S.W., Jakobs, S., 2010. Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the

- three human VDAC isoforms. *PMC Biophys.* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1757-5036-3-4>
- Newsholme, P., Morgan, D., Rebelato, E., Oliveira-Emilio, H.C., Procopio, J., Curi, R., Carpinelli, A., 2009. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia* 52, 2489–2498. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1536-z>
- Ngoh, G.A., Papanicolaou, K.N., Walsh, K., 2012. Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 287, 20321–20332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359174>
- Nguyen, T.T., Lewandowska, A., Choi, J.-Y., Markgraf, D.F., Junker, M., Bilgin, M., Ejsing, C.S., Voelker, D.R., Rapoport, T.A., Shaw, J.M., 2012. Gem1 and ERMES do not directly affect phosphatidylserine transport from ER to mitochondria or mitochondrial inheritance. *Traffic Cph. Den.* 13, 880–890. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01352.x>
- Nouette-Gaulain, K., Robin, F., Semjen, F., Obre, É., Bellance, N., Biais, M., Rossignol, R., 2016. Cytopathies mitochondriales et anesthésie. *Anesth. Réanimation* 2, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.anrea.2016.08.006>
- Noushmehr, H., D'Amico, E., Farilla, L., Hui, H., Wawrowsky, K.A., Mlynarski, W., Doria, A., Abumrad, N.A., Perfetti, R., 2005. Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. *Diabetes* 54, 472–481.
- Oh, Y.S., Bae, G.D., Baek, D.J., Park, E.-Y., Jun, H.-S., 2018. Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Front. Endocrinol.* 9, 384. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00384>
- Ohta, K., Okayama, S., Togo, A., Nakamura, K.-I., 2014. Three-dimensional organization of the endoplasmic reticulum membrane around the mitochondrial constriction site in mammalian cells revealed by using focused-ion beam tomography. *Microsc. Oxf. Engl.* 63 Suppl 1, i34. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfu076>
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., Ducommun, B., Lenaers, G., Belenguer, P., 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523, 171–176.
- Opie, E.L., 1901. ON THE RELATION OF CHRONIC INTERSTITIAL PANCREATITIS TO THE ISLANDS OF LANGERHANS AND TO DIABETES MELUTUS. *J. Exp. Med.* 5, 397–428.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., Mihara, K., 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 191, 1141–1158. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007152>
- Ouyang, Y.-B., Xu, L.-J., Emery, J.F., Lee, A.S., Giffard, R.G., 2011. Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress. *Mitochondrion* 11, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.10.007>
- Pagliuso, A., Cossart, P., Stavru, F., 2018. The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 355–374. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2603-0>
- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P.-A., Gomez, L., Fauconnier, J., Da Silva, C.C., Teixeira, G., Mewton, N., Belaidi, E., Durand, A., Abrial, M., Lacampagne, A., Rieusset, J., Ovize, M., 2013. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 128, 1555–1565. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001225>

- Palmer, A.E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S.A., Lev-Ram, V., Baker, D., Tsien, R.Y., 2006. Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem. Biol.* 13, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.03.007>
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D., Sekler, I., 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 436–441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>
- Pang, X., Zhang, Y., Shi, X., Li, D., Han, J., 2018. ERp44 depletion exacerbates ER stress and aggravates diabetic nephropathy in db/db mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504, 921–926. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.037>
- Pascal, S.M.A., Veiga-da-Cunha, M., Gilon, P., Van Schaftingen, E., Jonas, J.C., 2010. Effects of fructosamine-3-kinase deficiency on function and survival of mouse pancreatic islets after prolonged culture in high glucose or ribose concentrations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E586–596. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00503.2009>
- Pascoe, J., Hollern, D., Stamateris, R., Abbasi, M., Romano, L.C., Zou, B., O'Donnell, C.P., Garcia-Ocana, A., Alonso, L.C., 2012. Free fatty acids block glucose-induced β -cell proliferation in mice by inducing cell cycle inhibitors p16 and p18. *Diabetes* 61, 632–641. <https://doi.org/10.2337/db11-0991>
- Paula-Lima, A.C., Adasme, T., Hidalgo, C., 2014. Contribution of Ca²⁺ release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 892–914. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5796>
- Pénicaud, L., 2017. Autonomic nervous system and pancreatic islet blood flow. *Biochimie* 143, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.001>
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., Frey, T., 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J. Struct. Biol.* 119, 260–272. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3885>
- Pi, J., Bai, Y., Daniel, K.W., Liu, D., Lyght, O., Edelstein, D., Brownlee, M., Corkey, B.E., Collins, S., 2009. Persistent Oxidative Stress Due to Absence of Uncoupling Protein 2 Associated with Impaired Pancreatic β -Cell Function. *Endocrinology* 150, 3040–3048. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1642>
- Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L.M., Daniel, K., Reece, J.M., Deeney, J.T., Andersen, M.E., Corkey, B.E., Collins, S., 2007. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56, 1783–1791. <https://doi.org/10.2337/db06-1601>
- Picard, M., Turnbull, D.M., 2013. Linking the metabolic state and mitochondrial DNA in chronic disease, health, and aging. *Diabetes* 62, 672–678. <https://doi.org/10.2337/db12-1203>
- Pinaud, F., Dahan, M., 2011. Targeting and imaging single biomolecules in living cells by complementation-activated light microscopy with split-fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E201–210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101929108>
- Pino, M.F., Ye, D.Z., Linning, K.D., Green, C.D., Wicksteed, B., Poitout, V., Olson, L.K., 2005. Elevated glucose attenuates human insulin gene promoter activity in INS-1 pancreatic beta-cells via reduced nuclear factor binding to the A5/core and Z element. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 1343–1360. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0493>
- Pitts, K.R., Yoon, Y., Krueger, E.W., McNiven, M.A., 1999. The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 10, 4403–4417. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.12.4403>

- Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., Fontés, G., 2010. Glucolipototoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.08.006>
- Politi, A., Gaspers, L.D., Thomas, A.P., Höfer, T., 2006. Models of IP3 and Ca²⁺ oscillations: frequency encoding and identification of underlying feedbacks. *Biophys. J.* 90, 3120–3133. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072249>
- Ponsero, A.J., Igbaria, A., Darch, M.A., Miled, S., Outten, C.E., Winther, J.R., Palais, G., D'Autréaux, B., Delaunay-Moisan, A., Toledano, M.B., 2017. Endoplasmic Reticulum Transport of Glutathione by Sec61 Is Regulated by Ero1 and Bip. *Mol. Cell* 67, 962–973.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.012>
- Pougovkina, O., te Brinke, H., Ofman, R., van Cruchten, A.G., Kulik, W., Wanders, R.J.A., Houten, S.M., de Boer, V.C.J., 2014. Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3513–3522. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu059>
- Puddu, A., Storace, D., Odetti, P., Viviani, G.L., 2010. Advanced glycation end-products affect transcription factors regulating insulin gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.152>
- Quan, X., Nguyen, T.T., Choi, S.-K., Xu, S., Das, R., Cha, S.-K., Kim, N., Han, J., Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., Park, K.-S., 2015. Essential role of mitochondrial Ca²⁺ uniporter in the generation of mitochondrial pH gradient and metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *J. Biol. Chem.* 290, 4086–4096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.632547>
- Quirós, P.M., Ramsay, A.J., Sala, D., Fernández-Vizorra, E., Rodríguez, F., Peinado, J.R., Fernández-García, M.S., Vega, J.A., Enríquez, J.A., Zorzano, A., López-Otín, C., 2012. Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *EMBO J.* 31, 2117–2133. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.70>
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., Henquin, J.C., 2008. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 10 Suppl 4, 32–42. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x>
- Ravier, M.A., Daro, D., Roma, L.P., Jonas, J.-C., Cheng-Xue, R., Schuit, F.C., Gilon, P., 2011. Mechanisms of Control of the Free Ca²⁺ Concentration in the Endoplasmic Reticulum of Mouse Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 60, 2533–2545. <https://doi.org/10.2337/db10-1543>
- Reinhardt, F., Schultz, J., Waterstradt, R., Baltrusch, S., 2016. Drp1 guarding of the mitochondrial network is important for glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.142>
- Rieusset, J., Fauconnier, J., Paillard, M., Belaidi, E., Tubbs, E., Chauvin, M.-A., Durand, A., Bravard, A., Teixeira, G., Bartosch, B., Michelet, M., Theurey, P., Vial, G., Demion, M., Blond, E., Zoulim, F., Gomez, L., Vidal, H., Lacampagne, A., Ovize, M., 2016. Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia* 59, 614–623. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3829-8>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., Mammucari, C., 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., Pozzan, T., 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763–1766.

- Roderick, H.L., Lechleiter, J.D., Camacho, P., 2000. Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J. Cell Biol.* 149, 1235–1248.
- Rodríguez-Prados, M., Rojo-Ruiz, J., Aulestia, F.J., García-Sancho, J., Alonso, M.T., 2015. A new low-Ca²⁺ affinity GAP indicator to monitor high Ca²⁺ in organelles by luminescence. *Cell Calcium* 58, 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.09.002>
- Rojansky, R., Cha, M.-Y., Chan, D.C., 2016. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17896>
- Rorsman, P., Ashcroft, F.M., 2018. Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: of Mice and Men. *Physiol. Rev.* 98, 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
- Rorsman, P., Braun, M., 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
- Rorsman, P., Huisling, M.O., 2018. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 404–414. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0020-6>
- Rorsman, P., Renström, E., 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029–1045. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>
- Rosengren, A.H., Braun, M., Mahdi, T., Andersson, S.A., Travers, M.E., Shigeto, M., Zhang, E., Almgren, P., Ladenvall, C., Axelsson, A.S., Edlund, A., Pedersen, M.G., Jonsson, A., Ramracheya, R., Tang, Y., Walker, J.N., Barrett, A., Johnson, P.R.V., Lyssenko, V., McCarthy, M.I., Groop, L., Salehi, A., Gloyn, A.L., Renström, E., Rorsman, P., Eliasson, L., 2012. Reduced insulin exocytosis in human pancreatic β -cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Diabetes* 61, 1726–1733. <https://doi.org/10.2337/db11-1516>
- Rostovtseva, T., Colombini, M., 1997. VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys. J.* 72, 1954–1962. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78841-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78841-6)
- Rovira-Llopis, S., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Hernandez-Mijares, A., Rocha, M., Victor, V.M., 2017. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 11, 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.013>
- Rusiñol, A.E., Cui, Z., Chen, M.H., Vance, J.E., 1994. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 269, 27494–27502.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.-H., 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303, 1007–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>
- Rutter, G.A., Tsuboi, T., Ravier, M.A., 2006. Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* 40, 539–551. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.015>
- Santos, C.X.C., Tanaka, L.Y., Wosniak, J., Laurindo, F.R.M., 2009. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2409–2427. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2625>
- Satrústegui, J., Pardo, B., Del Arco, A., 2007. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 87, 29–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2006>

- Saxena, G., Chen, J., Shalev, A., 2010. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein. *J. Biol. Chem.* 285, 3997–4005.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.034421>
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, Ö., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., Paton, A.W., Paton, J.C., Cavalié, A., Zimmermann, R., 2012. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J.* 31, 3282–3296. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.189>
- Schisano, B., Harte, A.L., Lois, K., Saravanan, P., Al-Daghri, N., Al-Attas, O., Knudsen, L.B., McTernan, P.G., Ceriello, A., Tripathi, G., 2012. GLP-1 analogue, Liraglutide protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose induced endoplasmic reticulum stress. *Regul. Pept.* 174, 46–52.
<https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.11.008>
- Schmitz-Peiffer, C., Laybutt, D.R., Burchfield, J.G., Gurisik, E., Narasimhan, S., Mitchell, C.J., Pedersen, D.J., Braun, U., Cooney, G.J., Leitges, M., Biden, T.J., 2007. Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab.* 6, 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.08.012>
- Schon, E.A., Area-Gomez, E., 2010. Is Alzheimer's disease a disorder of mitochondria-associated membranes? *J. Alzheimers Dis. JAD* 20 Suppl 2, S281-292.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100495>
- Schuit, F.C., In't Veld, P.A., Pipeleers, D.G., 1988. Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 3865–3869.
- Schuit, F.C., Kiekens, R., Pipeleers, D.G., 1991. Measuring the balance between insulin synthesis and insulin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1182–1187.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Sorianello, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., Orešič, M., Pich, S., Burcelin, R., Palacín, M., Zorzano, A., 2012. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5523–5528.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1108220109>
- Sharma, R.B., Alonso, L.C., 2014. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr. Diab. Rep.* 14, 492.
<https://doi.org/10.1007/s11892-014-0492-2>
- Shiao, Y.J., Lupo, G., Vance, J.E., 1995. Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 270, 11190–11198.
- Shioda, N., Ishikawa, K., Tagashira, H., Ishizuka, T., Yawo, H., Fukunaga, K., 2012. Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein, σ 1 receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 23318–23331. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349142>
- Shoshan-Barmatz, V., De, S., Meir, A., 2017. The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca²⁺ Transport, Apoptosis, and Their Regulation. *Front. Oncol.* 7, 60.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00060>
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 47, R1-10. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0022>
- Silvander, J.S.G., Kvarnström, S.M., Kumari-Ilieva, A., Shrestha, A., Alam, C.M., Toivola, D.M., 2017. Keratins regulate β -cell mitochondrial morphology, motility, and homeostasis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31, 4578–4587.
<https://doi.org/10.1096/fj.201700095R>

- Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.-H., Crump, C.M., Thomas, G., 2005. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* 24, 717–729. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600559>
- Sogo, L.F., Yaffe, M.P., 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 126, 1361–1373.
- Sommerweiss, D., Gorski, T., Richter, S., Garten, A., Kiess, W., 2013. Oleate rescues INS-1E β -cells from palmitate-induced apoptosis by preventing activation of the unfolded protein response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 770–776. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.130>
- Song, G., Pacini, G., Ahrén, B., D'Argenio, D.Z., 2017. Glucagon increases insulin levels by stimulating insulin secretion without effect on insulin clearance in mice. *Peptides* 88, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.12.012>
- Sood, A., Jeyaraju, D.V., Prudent, J., Caron, A., Lemieux, P., McBride, H.M., Laplante, M., Tóth, K., Pellegrini, L., 2014. A Mitofusin-2-dependent inactivating cleavage of Opal links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16017–16022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408061111>
- Spanswick, D., Smith, M.A., Mirshamsi, S., Routh, V.H., Ashford, M.L., 2000. Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat. Neurosci.* 3, 757–758. <https://doi.org/10.1038/77660>
- Stanojevic, V., Habener, J.F., 2015. Evolving function and potential of pancreatic alpha cells. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.10.002>
- Stavru, F., Palmer, A.E., Wang, C., Youle, R.J., Cossart, P., 2013. Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 16003–16008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315784110>
- Steenbergen, R., Nanowski, T.S., Beigneux, A., Kulinski, A., Young, S.G., Vance, J.E., 2005. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *J. Biol. Chem.* 280, 40032–40040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506510200>
- Steil, G.M., Trivedi, N., Jonas, J.C., Hasenkamp, W.M., Sharma, A., Bonner-Weir, S., Weir, G.C., 2001. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E788–796. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E788>
- Stone, S.J., Vance, J.E., 2000. Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 34534–34540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002865200>
- Støy, J., Edghill, E.L., Flanagan, S.E., Ye, H., Paz, V.P., Pluzhnikov, A., Below, J.E., Hayes, M.G., Cox, N.J., Lipkind, G.M., Lipton, R.B., Greeley, S.A.W., Patch, A.-M., Ellard, S., Steiner, D.F., Hattersley, A.T., Philipson, L.H., Bell, G.I., Neonatal Diabetes International Collaborative Group, 2007. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15040–15044. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707291104>
- Subramanian, K., Meyer, T., 1997. Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell* 89, 963–971.
- Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H.M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Yanagi, S., 2013. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol. Cell* 51, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.023>

- Supale, S., Li, N., Brun, T., Maechler, P., 2012. Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 477–487.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.002>
- Suyama, K., Watanabe, M., Sakabe, K., Okada, Y., Matsuyama, D., Kuroiwa, M., Mochida, J., 2011. Overexpression of GRP78 protects glial cells from endoplasmic reticulum stress. *Neurosci. Lett.* 504, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.045>
- Suzuki, J., Kanemaru, K., Ino, M., 2016. Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging. *Biophys. J.* 111, 1119–1131.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.054>
- Szado, T., Vanderheyden, V., Parys, J.B., De Smedt, H., Rietdorf, K., Kotelevets, L., Chastre, E., Khan, F., Landegren, U., Söderberg, O., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2008. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca^{2+} release and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2427–2432.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0711324105>
- Szymanowicz, A., 2012. Caractéristiques immuno-analytiques du peptide-C. *Immuno-Anal. Biol. Spéc.* 27, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2011.08.001>
- Tagaya, M., 2017. *Organelle contact sites: from molecular mechanism to disease.* Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.
- Tajeddine, N., Galluzzi, L., Kepp, O., Hangen, E., Morselli, E., Senovilla, L., Araujo, N., Pinna, G., Larochette, N., Zamzami, N., Modjtahedi, N., Harel-Bellan, A., Kroemer, G., 2008. Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. *Oncogene* 27, 4221–4232. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.63>
- Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y., Oka, Y., 2006. WFS1 protein modulates the free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 580, 5635–5640.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.007>
- Takeuchi, A., Kim, B., Matsuoka, S., 2015. The destiny of Ca^{2+} released by mitochondria. *J. Physiol. Sci. JPS* 65, 11–24. <https://doi.org/10.1007/s12576-014-0326-7>
- Tambini, M.D., Pera, M., Kanter, E., Yang, H., Guardia-Laguarta, C., Holtzman, D., Sulzer, D., Area-Gomez, E., Schon, E.A., 2016. ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep.* 17, 27–36.
<https://doi.org/10.15252/embr.201540614>
- Tan, T., Ozbalci, C., Brügger, B., Rapaport, D., Dimmer, K.S., 2013. Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J. Cell Sci.* 126, 3563–3574. <https://doi.org/10.1242/jcs.121244>
- Tarasov, A.I., Semplici, F., Li, D., Rizzuto, R., Ravier, M.A., Gilon, P., Rutter, G.A., 2013. Frequency-dependent mitochondrial Ca^{2+} accumulation regulates ATP synthesis in pancreatic β cells. *Pflugers Arch.* 465, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1177-9>
- Tasseva, G., Bai, H.D., Davidescu, M., Haromy, A., Michelakis, E., Vance, J.E., 2013. Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* 288, 4158–4173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.434183>
- Theurey, P., Tubbs, E., Vial, G., Jacquemetton, J., Bendridi, N., Chauvin, M.-A., Alam, M.R., Le Romancer, M., Vidal, H., Rieusset, J., 2016. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J. Mol. Cell Biol.* 8, 129–143.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw004>

- Thivolet, C., Vial, G., Cassel, R., Rieusset, J., Madec, A.-M., 2017. Reduction of endoplasmic reticulum- mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes. *PloS One* 12, e0182027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182027>
- Thomas, G., Aslan, J.E., Thomas, L., Shinde, P., Shinde, U., Simmen, T., 2017. Caught in the act - protein adaptation and the expanding roles of the PACS proteins in tissue homeostasis and disease. *J. Cell Sci.* 130, 1865–1876. <https://doi.org/10.1242/jcs.199463>
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S., 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733–1742.
- Topf, U., Wrobel, L., Chacinska, A., 2016. Chatty Mitochondria: Keeping Balance in Cellular Protein Homeostasis. *Trends Cell Biol.* 26, 577–586. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.002>
- Toulmay, A., Prinz, W.A., 2012. A conserved membrane-binding domain targets proteins to organelle contact sites. *J. Cell Sci.* 125, 49–58. <https://doi.org/10.1242/jcs.085118>
- Tsai, B., Ye, Y., Rapoport, T.A., 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 246–255. <https://doi.org/10.1038/nrm780>
- Tubbs, E., Chanon, S., Robert, M., Bendridi, N., Bidaux, G., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Durand, C., Gauvrit-Ramette, D., Vidal, H., Lefai, E., Rieusset, J., 2018. Disruption of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Contributes to Muscle Insulin Resistance in Mice and Humans. *Diabetes* 67, 636–650. <https://doi.org/10.2337/db17-0316>
- Tubbs, E., Rieusset, J., 2016. Study of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Interactions by In Situ Proximity Ligation Assay in Fixed Cells. *J. Vis. Exp. JoVE.* <https://doi.org/10.3791/54899>
- Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.-A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., Vidal, H., Rieusset, J., 2014. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 63, 3279–3294. <https://doi.org/10.2337/db13-1751>
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- van Huizen, R., Martindale, J.L., Gorospe, M., Holbrook, N.J., 2003. P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 α signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 15558–15564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212074200>
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Vance, J.E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248–7256.
- Vangaveti, V., Shashidhar, V., Jarrod, G., Baune, B.T., Kennedy, R.L., 2010. Free fatty acid receptors: emerging targets for treatment of diabetes and its complications. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* 1, 165–175. <https://doi.org/10.1177/2042018810381066>
- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A.D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuypere, J.-P., Piette, J., Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., Agostinis, P., 2012. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 19, 1880–1891. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.74>

- Vermassen, E., Parys, J.B., Mauger, J.-P., 2004. Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol. Cell* 96, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.004>
- Voelker, D.R., 2000. Interorganelle transport of aminoglycerophospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 97–107.
- Voelker, D.R., 1989. Reconstitution of phosphatidylserine import into rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264, 8019–8025.
- Vozza, A., Parisi, G., De Leonardis, F., Lasorsa, F.M., Castegna, A., Amorese, D., Marmo, R., Calcagnile, V.M., Palmieri, L., Ricquier, D., Paradies, E., Scarcia, P., Palmieri, F., Bouillaud, F., Fiermonte, G., 2014. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 960–965. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317400111>
- Wagner, R., Kaiser, G., Gerst, F., Christiansen, E., Due-Hansen, M.E., Grundmann, M., Machicao, F., Peter, A., Kostenis, E., Ulven, T., Fritsche, A., Häring, H.-U., Ullrich, S., 2013. Reevaluation of fatty acid receptor 1 as a drug target for the stimulation of insulin secretion in humans. *Diabetes* 62, 2106–2111. <https://doi.org/10.2337/db12-1249>
- Wallin, T., Ma, Z., Ogata, H., Jørgensen, I.H., Iezzi, M., Wang, H., Wollheim, C.B., Björklund, A., 2010. Facilitation of fatty acid uptake by CD36 in insulin-producing cells reduces fatty-acid-induced insulin secretion and glucose regulation of fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.11.002>
- Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- Wan, Q.-F., Dong, Y., Yang, H., Lou, X., Ding, J., Xu, T., 2004. Protein kinase activation increases insulin secretion by sensitizing the secretory machinery to Ca²⁺. *J. Gen. Physiol.* 124, 653–662. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409082>
- Wang, B., Nguyen, M., Chang, N.C., Shore, G.C., 2011. Fis1, Bap31 and the kiss of death between mitochondria and endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 30, 451–452. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.352>
- Wang, C.-H., Chen, Y.-F., Wu, C.-Y., Wu, P.-C., Huang, Y.-L., Kao, C.-H., Lin, C.-H., Kao, L.-S., Tsai, T.-F., Wei, Y.-H., 2014. Cisd2 modulates the differentiation and functioning of adipocytes by regulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4770–4785. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu193>
- Wang, J., Saul, A., Cui, X., Roon, P., Smith, S.B., 2017. Absence of Sigma 1 Receptor Accelerates Photoreceptor Cell Death in a Murine Model of Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 4545–4558. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-21947>
- Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S.K., Kayo, T., Lu, D., Takata, K., Koizumi, A., Izumi, T., 1999. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.* 103, 27–37. <https://doi.org/10.1172/JCI4431>
- Wang, J.-Z., Dehesh, K., 2018. ER: the Silk Road of interorganellar communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* 45, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.07.012>
- Wang, P.T.C., Garcin, P.O., Fu, M., Masoudi, M., St-Pierre, P., Panté, N., Nabi, I.R., 2015. Distinct mechanisms controlling rough and smooth endoplasmic reticulum contacts with mitochondria. *J. Cell Sci.* 128, 2759–2765. <https://doi.org/10.1242/jcs.171132>
- Wang, W.-A., Groenendyk, J., Michalak, M., 2012. Calreticulin signaling in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 842–846. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.009>

- Wasilewski, M., Chojnacka, K., Chacinska, A., 2017. Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 125–137.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.019>
- Weir, G.C., Aguayo-Mazzucato, C., Bonner-Weir, S., 2013. β -cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? *Islets* 5, 233–237.
<https://doi.org/10.4161/isl.27494>
- Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., Shaw, J., 2011. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 94, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>
- Widmaier, E.P., Raff, H., Strang, K.T., Widmaier, E.P., Vander, A.J., 2013. *Physiologie humaine: les mécanismes du fonctionnement de l'organisme* : Vander.
- Wieckowski, M.R., Giorgi, C., Lebedzinska, M., Duszynski, J., Pinton, P., 2009. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat. Protoc.* 4, 1582–1590. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.151>
- Wiederkehr, A., Szanda, G., Akhmedov, D., Matak, C., Heizmann, C.W., Schoonjans, K., Pozzan, T., Spät, A., Wollheim, C.B., 2011. Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell Metab.* 13, 601–611.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.015>
- Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., Ferrand, M., Prevarskaya, N., Simonnet, H., Vindrieux, D., Bernard, D., 2014. Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Commun.* 5, 3792.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4792>
- Wierup, N., Sundler, F., Heller, R.S., 2014. The islet ghrelin cell. *J. Mol. Endocrinol.* 52, R35–R49. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0122>
- Wollam, J., Mahata, S., Riopel, M., Hernandez-Carretero, A., Biswas, A., Bandyopadhyay, G.K., Chi, N.-W., Eiden, L.E., Mahapatra, N.R., Corti, A., Webster, N.J.G., Mahata, S.K., 2017. Chromogranin A regulates vesicle storage and mitochondrial dynamics to influence insulin secretion. *Cell Tissue Res.* 368, 487–501.
<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2580-5>
- Wright, J., Birk, J., Haataja, L., Liu, M., Ramming, T., Weiss, M.A., Appenzeller-Herzog, C., Arvan, P., 2013. Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 α (Ero1 α) improves folding and secretion of mutant proinsulin and limits mutant proinsulin-induced endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 288, 31010–31018.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510065>
- Xu, G.G., Gao, Z.Y., Borge, P.D., Jegier, P.A., Young, R.A., Wolf, B.A., 2000. Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression, Ca(2+) homeostasis, and insulin expression and secretion. *Biochemistry* 39, 14912–14919.
- Yamashita, S.-I., Jin, X., Furukawa, K., Hamasaki, M., Nezu, A., Otera, H., Saigusa, T., Yoshimori, T., Sakai, Y., Mihara, K., Kanki, T., 2016. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J. Cell Biol.* 215, 649–665. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605093>
- Yanagida, K., Maejima, Y., Santoso, P., Otgon-Uul, Z., Yang, Y., Sakuma, K., Shimomura, K., Yada, T., 2014. Hexosamine pathway but not interstitial changes mediates glucotoxicity in pancreatic β -cells as assessed by cytosolic Ca²⁺ response to glucose. *Aging* 6, 207–214. <https://doi.org/10.18632/aging.100647>
- Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F., Nawata, H., 2002. Glucosamine-induced beta-cell dysfunction: a possible involvement of glucokinase or glucose-transporter type 2. *Pancreas* 24, 228–234.

- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
- Zalk, R., Israelson, A., Garty, E.S., Azoulay-Zohar, H., Shoshan-Barmatz, V., 2005. Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.* 386, 73–83. <https://doi.org/10.1042/BJ20041356>
- Zampese, E., Fasolato, C., Kipanyula, M.J., Bortolozzi, M., Pozzan, T., Pizzo, P., 2011. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2777–2782. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100735108>
- Zatyka, M., Da Silva Xavier, G., Bellomo, E.A., Leadbeater, W., Astuti, D., Smith, J., Michelangeli, F., Rutter, G.A., Barrett, T.G., 2015. Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Hum. Mol. Genet.* 24, 814–827. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu499>
- Zhang, B., Yu, Q., Huo, D., Li, J., Liang, C., Li, H., Yi, X., Xiao, C., Zhang, D., Li, M., 2018. Arf1 regulates the ER-mitochondria encounter structure (ERMES) in a reactive oxygen species-dependent manner. *FEBS J.* 285, 2004–2018. <https://doi.org/10.1111/febs.14445>
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschopp, J., 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
- Zhu, Y., Shu, T., Lin, Y., Wang, H., Yang, J., Shi, Y., Han, X., 2011. Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.085>