



**HAL**  
open science

# Modifications métaboliques et fonctionnelles des cellules $\beta$ pancréatiques au cours du diabète de type 2

Johan Perrier

► **To cite this version:**

Johan Perrier. Modifications métaboliques et fonctionnelles des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète de type 2. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1283 . tel-03891065

**HAL Id: tel-03891065**

**<https://theses.hal.science/tel-03891065v1>**

Submitted on 9 Dec 2022

**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 : 2021LYSE1283

## **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 Santé**

**Spécialité de doctorat** : Biologie, Sciences, Santé  
**Discipline** : Métabolisme

Soutenue publiquement le 08/12/2021, par :

**Johan Perrier**

---

# **Modifications métaboliques et fonctionnelles des cellules $\beta$ pancréatiques au cours du diabète de type 2**

---

Devant le jury composé de :

Fabien VAN COPPENOLLE  
Bénédicte ELENA-HERRMANN  
Laetitia SHINTU

Professeur des Universités  
Chargée de Recherche CNRS  
Maître de Conférences

CarMeN UMR1060  
IAB UMR 5309  
ISM2 UMR 7313

Président  
Examinatrice  
Examinatrice

Magalie RAVIER  
Sergio POLAKOF  
Domenico BOSCO

Chargée de Recherche INSERM  
Directeur de Recherche INRAE  
Professeur

IGF UMR5203  
UNH UMR1019  
CEED

Rapporteuse  
Rapporteur  
Rapporteur

Charles THIVOLET  
Baptiste PANTHU

Professeur des Universités  
Maître de Conférences

CarMeN UMR1060  
CarMeN UMR1060

Directeur de thèse  
Co-directeur de thèse



# Remerciements

## **A Monsieur Hubert Vidal**

Merci de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire pendant ces 3 années de recherche et de m'avoir aidé à mener à bien cette thèse jusqu'au bout.

## **A Madame Jennifer Rieusset**

Merci beaucoup de m'avoir accueilli dans votre équipe et de m'avoir permis de finir ces travaux dans les meilleures conditions. Merci de plus pour vos conseils et vos encouragements.

## **A Monsieur Charles Thivolet**

C'est avec grand plaisir que je vous remercie d'avoir été mon directeur de thèse et d'avoir permis la réalisation de ces travaux.

## **A Monsieur Baptiste Panthu**

Je te remercie tout particulièrement pour avoir été mon professeur, mon maître de stage et finalement mon co-directeur de thèse, pour m'avoir fait connaître et apprécier la métabolomique, pour m'avoir soutenu et aiguillé tout au long de ma thèse et surtout pour m'avoir permis de grandes opportunités de collaborations européennes et de présentations de mes résultats. Merci sincèrement pour tous tes conseils et pour la confiance que tu m'as accordé afin de mener à bien mes expériences, mes cours et mes formations.

## **A mon jury de thèse**

Je tiens également à tous vous remercier, la Docteure Magalie Ravier, les Professeurs Domenico Bosco et Sergio Polakof qui m'avez fait l'honneur d'être mes rapporteurs pour ce travail de thèse. Merci aussi aux Docteurs Bénédicte Eléna-Herrmann et Laetitia Shintu ainsi qu'au Professeur Fabien Van Coppenolle d'avoir accepté d'être examinateurs lors de ma soutenance de thèse.

## **A mon équipe**

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe MERISM, MAC pour tes conseils aiguisés et nos longues discussions dans la salle western sous les doux sons de Nostalgie, Nadia, pour m'avoir aidé quand j'en avais besoin, tu m'as aussi accueilli dans ton bureau et merci pour nos échanges et ta sympathie, Christine et Jiji, merci pour vos conseils et votre gentillesse de tous les jours.

## **Aux doctorants et stagiaires du laboratoire CarMeN**

Bien sûr que je vous remercie tous ! Julien pour nos coups de folie « BAM BAM BAM », nos discussions interminables, tout le reste. Tu es en plus d'être le meilleur collègue un ami et un compagnon de voyage inoubliable, si je devais refaire ma thèse maintenant, la seule demande que j'aurais serait de ne pas la refaire sans toi ! Pauline, toi qui es passée du « simple grade » de stagiaire au graal du doctorat, merci aussi d'avoir été là pour ne pas forcément « être qu'amour » avec tes avis cinglants ! Anaïs, je suis vraiment heureux d'être parti en Pologne avec toi, même si... TU NE M'AS PASTOUT DIT !! Ce qui me fait d'ailleurs une transition parfaite pour te remercier François, bon ok, tu n'es pas doctorant ni stagiaire mais t'as bossé ici quand même ! Merci à Rémy, Alexandre et Paloma (le 2.55 au final) pour ces cafés et... ces sucreries

volées (désolé Julien j'ai lâché le morceau !). Merci à Anne-Esther, Agathe et Camille de m'avoir soutenu tout au long de ma thèse, pour vos conseils et ces folles soirées. Florian pour m'avoir refile ce sujet de thèse passionnant, pour ta motivation dans le travail et... le reste aussi... « BELLONA !! BELLONA !! ». Mister Bassot, le 117, pour nos discussions et ta sincérité, tu as la passion et ça se voit ! Merci à Kate et Béryl pour votre « amusant » (promis je ne me moque plus après !), toujours un plaisir d'aller au bar avec vous. Merci Tiphaine pour ton soutien sur la fin de thèse, un plaisir pour un prof de voir son étudiante finir brillamment en thèse !

### **A Gilles Rautureau**

Merci beaucoup Gilles, de m'avoir accompagné jusqu'à ma thèse, pour m'avoir fait découvrir et adorer la RMN. Merci aussi pour ta confiance sans faille, ta sincérité et ta détermination qui m'ont servi d'exemple depuis ma L3. Si j'ai pu réaliser ces recherches et écrire ce manuscrit c'est aussi grâce à toi.

### **A Madame et Monsieur Fabienne et Christian Dambon**

Je tiens sincèrement à te remercier Christian, pour m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire à Liège. Et je vous remercie tous les deux pour ce magnifique accueil en Belgique, j'en garde un fort souvenir et j'ai hâte de revenir vous voir et frotter mon palais à de nouvelles saveurs. Encore merci pour tout.

### **A mes amis**

Merci à toi Quentin, je sais que je ne serais pas là sans toi, depuis la 5<sup>ème</sup> et jusqu'à maintenant tu m'as gardé motivé. Nos différences ont permis de nous amener là où nous en sommes maintenant ! T'es vraiment un ami en or, dans la tristesse et le bonheur tu ne m'as jamais lâché et je pense que ça n'arrivera jamais. Merci à Rémy et Julien sans qui ces années d'études auraient été bien moins mouvementées. Merci aussi à Margot et Sophie qui m'ont toujours donné de précieux conseils. Merci à tous mes amis de l'université et l'ENS, Julien mon colocataire dans l'enfer mais aussi Paul, Cédric, Augustin, Thomas, Grégoire, Mathieu, Jimmy, Pierre pour ces années passées ensemble et ce groupe de choc. Merci Baptiste de m'avoir tant aidé à progresser au cours de ces années mais aussi pour m'avoir accompagné dans beaucoup d'aventures depuis cette coloc de L3. Merci à Sylvain d'avoir été mon meilleur concurrent en cours mais aussi un magnifique compagnon d'escalade et de levé de coude lors de mon entrée dans le monde académique à Chambéry ! Merci à la JRF sans qui ce confinement ne se serait pas passé comme ça !

### **A mes professeurs**

Merci Michel Ganser de m'avoir permis de renouer avec les maths et la physique en terminale. Merci à Madame Michele Ottmann de m'avoir fait confiance, encouragé et recommandé pour intégrer l'ENS de Lyon à la fin de ma seconde année de Licence.

### **A Jessica et sa famille**

Merci Jessica d'avoir été là, de m'avoir accompagné et aidé pendant ces années pas toujours faciles. Merci aussi à ta famille pour m'avoir soutenu et motivé au cours de ma thèse.

## A ma soeur

Laurène, il est temps que tu le saches, c'est en suivant ton exemple et tes conseils que j'ai pu réaliser ces 8 années d'études. Merci d'avoir été là depuis que nous sommes tout petits (malgré le coup de balançoire !!) et de m'épauler pour toujours aller plus loin. Je suis fier d'être ton frère.

## A mes parents

Merci pour TOUT, non seulement pour la relecture de ce manuscrit mais aussi pour m'avoir toujours soutenu dans mes décisions, mes rêves et m'avoir poussé à aller plus loin pour les réaliser. Merci d'avoir toujours été là dans les bons et les mauvais moments, si j'en suis là c'est grâce à vous, et ce, depuis toujours, je vous aime.





# **Liste des publications & participations aux congrès**

## Publications

### **Towards an innovative anti-infectious pharmacopoeia: highlights from current research**

*Léo Bertrand\**, *Sarah Bonhomme\**, *Florence Brun\**, *Auriane Carcone\**, *Lucie Fallone\**, *Marie-Charlotte Jaeger\**, *Marie Naoumenko\**, *Kamela Nikolla\**, *Laurine Noblecourt\**, *Audrey Page\**, *Johan Perrier\**, *Christophe Gilbert*, *Aurélien Schwob*

\* These authors contributed equally to the work  
m/s n° 10, vol. 33, octobre 2017

DOI : 10.1051/medsci/20173310018

---

### **Cell-Free Protein Synthesis Enhancement from Real-Time NMR Metabolite Kinetics: Redirecting Energy Fluxes in Hybrid RRL Systems**

*Baptiste Panthu*, *Théophile Ohlmann*, *Johan Perrier*, *Uwe Schlattner*, *Pierre Jalinot*, *Bénédicte Elena-Herrmann*, *Gilles J P Rautureau*

ACS Synth Biol. 2018 Jan 19;7(1):218-226.

PMID: 28915016

---

### **Dietary obesity in mice is associated with lipid deposition and metabolic shifts in the lungs sharing features with the liver**

*Gilles Rautureau\**, *Béatrice Morio\**, *Sylvie Guibert*, *Camille Lefevre*, *Johan Perrier*, *Anais Alves*, *Marie-Agnès Chauvin*, *Claudie Pinteur*, *Marie-Ambre Monet*, *Murielle Godet*, *Anne-Marie Madec*, *Jennifer Rieusset*, *Anne Mey*, *Baptiste Panthu*

\* These authors contributed equally to the work  
Sci Rep. 2021 Apr 22;11(1):8712.

PMID: 33888788

---

### **Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAMs) interactions and calcium exchange in the development of type 2 diabetes**

*Anne-Marie Madec*, *Johan Perrier*, *Baptiste Panthu*, *Florian Dingreville*

Int Rev Cell Mol Biol. 2021;363:169- 202.

PMID: 34392929

---

**Loss and gain of function of Grp75 or mitofusin 2 distinctly alter cholesterol metabolism, but all promote triglyceride accumulation in hepatocytes**

*Arthur Bassot, Carina Prip-Buus, Anaïs Alves, Olivier Berdeaux, Johan Perrier, Véronique Lenoir, Jingwei Ji-Cao, Marie-Agnès Berger, Emmanuelle Loizon, Stephanie Cabaret, Baptiste Panthu, Jennifer Rieusset, Béatrice Morio*

Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2021 Dec;1866(12):159030. PMID: 34419589

---

**Metabolite exposome and secretome profiling of human pancreatic islets under glucolipotoxicity reveals pyruvate and citrate hub for key mitochondrial metabolism rerouting**

*Johan Perrier, Anne-Marie Madec, Karim Chick, Marie-Agnès Chauvin, Christian Damblon, Charles Thivolet, Jennifer Rieusset, Gilles JP Rautureau and Baptiste Panthu*

Submitted

---

# Participations au congrès

## ICSB 2018 – 19th International Conference on Systems Biology

Lyon  
Octobre 2018

Poster : « *Cell-Free Protein Synthesis Enhancement from Real-Time NMR Metabolite Kinetics: Redirecting Energy Fluxes in Hybrid RRL Systems Guillemets* »

---

## 4<sup>ème</sup> Assises de Nutrition et Santé 2019

Lyon  
Septembre 2019

Présentation orale : « *Devenir des métabolites mitochondriaux et glucolipotoxicité dans les cellules  $\beta$  pancréatiques* »

---

## JEDISS 2019 – 24<sup>ème</sup> Journée Scientifique de l'EDISS

Lyon  
Octobre 2019

Présentation orale : « *Devenir des métabolites mitochondriaux et glucolipotoxicité dans les cellules  $\beta$  pancréatiques* »

Prix du jury

---

## MDD 2019 – 3<sup>ème</sup> Montpellier Diabetes Day

Montpellier  
Novembre 2019

Short talk et Poster : « *Citrate, a central hub of  $\beta$  cell failure during type II diabetes* »

---

## SFD 2020 – Société Francophone du Diabèteociété

Virtuel  
Septembre 2020

e-Poster : « *Etude des modifications de l'exométabolome et de l'endométabolome des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours de la glucolipotoxicité* »

---

**EASD 2021 – European Association for the Study of Diabetes**

Virtuel  
Septembre 2021

Short talk : « *Metabolite secretome profiling of human pancreatic islets and rodent  $\beta$  cells under glucolipotoxicity reveals key mitochondrial metabolism rerouting* »

---



# Résumés

# Modifications métaboliques et fonctionnelles des cellules $\beta$ pancréatiques au cours du diabète de type 2

**Mots clés :** Diabète de type 2, Métabolomique, Résonance Magnétique Nucléaire, îlots pancréatiques, cellules  $\beta$ , Glucolipotoxicité, Déshydrogénases mitochondriales, Cycle du citrate

L'insuline est une hormone contribuant à l'homéostasie du glucose dans le sang en favorisant son absorption par les cellules cibles des tissus insulino-sensibles tels que : le foie, le muscle et le tissu adipeux. Lors d'un diabète de type 2 (DT2) les tissus insulino-sensibles voient diminuer leur capacité à répondre à l'insuline mettant progressivement en place une hyperglycémie chronique. Pour répondre à la demande accrue en insuline découlant de l'insensibilité des tissus cibles, les cellules  $\beta$  pancréatiques insulino-sécrétrices libèrent davantage d'insuline jusqu'à s'épuiser. L'excès de substrats énergétiques circulants sous forme de glucose et de lipides, induisant respectivement une gluco- et une lipotoxicité, mène à un défaut de renouvellement de l'ATP. Cet ATP est un substrat crucial pour la synthèse et la sécrétion régulée d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Les modifications de l'homéostasie métabolique intracellulaire sont des marqueurs du remodelage du métabolisme des cellules  $\beta$  au cours du DT2 mais les échanges entre ces cellules et leur environnement restent mal connus. En vue d'étudier la nature métabolique de ces échanges, nous avons soumis des îlots pancréatiques humains et un modèle de cellules  $\beta$  murines INS-1E à différentes concentrations de glucose et de palmitate pendant 48h afin de mimer les conséquences de la gluco- et/ou lipotoxicité associée au DT2. Une étude de métabolomique par résonance magnétique nucléaire du proton en complément d'analyses biochimiques nous ont permis de révéler des modifications majeures du métabolisme énergétique. Ces modifications sont associées à des altérations d'expressions et de régulations de déshydrogénases mitochondriales perturbant le cycle du citrate. La signature métabolomique en condition de glucolipotoxicité est proche entre les îlots humains et les INS-1E. Cependant, alors que le citrate est directement sécrété hors de la cellule dans le modèle des îlots humains, il apparaît utilisé au profit de la synthèse de lipides supportant une sécrétion de triglycérides dans le modèle INS-1E. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédemment réalisés par notre équipe montrant que des modifications des contacts entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique sont associées à une diminution de la respiration mitochondriale lors de conditions mimant la glucotoxicité. Ainsi nous proposons un modèle où, comme lors du DT2, les cellules  $\beta$  pancréatiques sont soumises à de fortes quantités de glucose et de lipides induisant un stress mitochondrial. Ce stress conduit à l'altération de l'axe glycolyse-cycle du citrate-sécrétion d'insuline associée à une sécrétion importante de pyruvate, de citrate ou de triglycérides, ne permettant plus le renouvellement d'ATP nécessaire à la sécrétion d'insuline.



# $\beta$ pancreatic cell metabolic and functional modifications during type 2 diabetes

**Key words:** Type 2 diabetes, Metabolomic, Nuclear Magnetic Resonance, Pancreatic islets,  $\beta$  cells, Glucolipotoxicity, Mitochondrial dehydrogenases, Citric acid cycle

Insulin is a hormone contributing to blood glucose homeostasis by promoting its absorption by targeted cells from insulin-sensitive tissues, in particular the liver, muscle, and adipose tissue. During type 2 diabetes (T2D), the capacity of insulin-sensitive tissues to respond to insulin decreases leading to the progressive development of chronic hyperglycemia. This creates a vicious cycle contributes to the insulin-secreting  $\beta$  cells releasing more insulin to compensate for the lack of glycemic regulation until there are exhausted. Chronic hyperglycemia brings an excess of energetic substrate in form of circulating glucose, inducing a glucotoxicity but also into lipids, inducing a lipotoxicity. Altogether this results in a defect in ATP turnover defect which is crucial for  $\beta$  cell insulin synthesis and secretion. Intracellular metabolism homeostasis modifications are key markers of  $\beta$  cell metabolism reshaping occurring during T2D but the exchanges of metabolites between cells and their environment remain unknown. To characterize these exchanges, we have cultured for 48 h human pancreatic islets and INS-1E murine  $\beta$  cell line with different glucose and palmitate concentrations to mimic T2D-associated glucolipotoxicity. A metabolomic study through high-resolution proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) completed with biochemical analysis allowed us to reveal key energetic metabolism modifications. These modifications were associated with alterations in the mitochondrial dehydrogenase expression and regulation perturbing the citric acid cycle (TCA). Human islets and INS-1E cells show a similar metabolomic signature led by glucolipotoxicity. However, citrate is directly secreted out of the cell in a human islets model while this metabolite may be used for lipid synthesis supporting a higher triglyceride secretion in the INS-1E model. These results are consistent with previous works done by our team showing modifications of mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites associated with a decrease of mitochondrial respiration during chronic exposure to high glucose concentration. Thus, we propose a model where, as in T2D,  $\beta$  pancreatic cells exposition to high glucose and lipid concentrations lead to mitochondrial stress. This stress leads to a modification of glycolysis-TCA cycle-insulin secretion axes where islets and  $\beta$  cells oversecrete pyruvate, citrate, or triglycerides, limiting ATP renewing required for insulin secretion.

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS &amp; PARTICIPATIONS AUX CONGRES</b> .....	<b>8</b>
<b>Publications</b> .....	<b>9</b>
<b>Participations au congrès</b> .....	<b>11</b>
<b>RESUMES</b> .....	<b>14</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>17</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>21</b>
<b>TABLE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>23</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>28</b>
<b>CHAPITRE I La cellules <math>\beta</math> et la régulation de la glycémie</b> .....	<b>30</b>
<b>PARTIE A La cellules <math>\beta</math> et son environnement</b> .....	<b>30</b>
I. A. 1 Les grandes fonctions du pancréas.....	30
I. A. 1.1 Les îlots pancréatiques et la fonction endocrine du pancréas .....	30
Les cellules $\alpha$ et $\beta$ .....	33
Autres cellules composant les îlots pancréatiques.....	33
Régulation paracrine de la sécrétion d'insuline et de glucagon .....	34
I. A. 1.2 Les modèles d'étude des cellules $\beta$ .....	35
Les modèles <i>in vitro</i> .....	35
La lignée cellulaire INS-1E.....	36
Autres modèles cellulaires non utilisés dans ces travaux .....	36
Les modèles <i>ex vivo</i> .....	37
Les îlots murins.....	37
Les îlots humains.....	38
<b>PARTIE B L'insuline et sa sécrétion régulée</b> .....	<b>38</b>
I. B. 1 L'historique de la découverte de l'insuline .....	38
I. B. 2 Le rôle clef de l'insuline dans la régulation glycémique.....	43
I. B. 3 La traduction du signal de l'insuline et le mécanisme de régulation de la glycémie par les cellules cibles 45	
I. B. 4 La synthèse et la sécrétion régulée d'insuline .....	49
I. B. 4.1 La biosynthèse de l'insuline.....	49
I. B. 4.2 Le stockage de l'insuline .....	49
I. B. 4.3 La sécrétion de l'insuline .....	50
Le rôle majeur du glucose dans la sécrétion d'insuline.....	53
D'autres facteurs métaboliques sont des sécrétagogues efficaces.....	53
Le $Ca^{2+}$ et la communication entre RE et mitochondries sont nécessaires à la sécrétion d'insuline. 58	
Le stockage du $Ca^{2+}$ est permis grâce au RE.....	58
Renouvellement de l'ATP et $Ca^{2+}$ mitochondrial .....	59
Les transferts calciques entre la mitochondrie et le RE sont nécessaires à la sécrétion régulée d'insuline.....	61
<b>CHAPITRE II Le diabète et la cellule <math>\beta</math> pancréatique</b> .....	<b>65</b>
<b>PARTIE A Les diabètes de type 1 et 2</b> .....	<b>65</b>
II. A. 1 L'histoire du diabète .....	65

II. A. 2	Le diabète, un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.....	68
II. A. 3	Qu'est ce que le diabète ?.....	70
II. A. 3.1	Le diabète de type 1 ou auto-immun .....	70
II. A. 3.2	Le diabète de type 2.....	70
	L'insulino-résistance des tissus périphériques au cours du DT2 .....	71
	Les complications au cours du DT2.....	72
<b>PARTIE B</b>	<b>Dysfonction de la cellule <math>\beta</math></b> .....	<b>74</b>
II. B. 1	La glucolipotoxicité est une combinaison de la gluco- et de la lipotoxicité.....	74
II. B. 2	La gluco- lipotoxicité cause des altérations au niveau physiologique.....	75
II. B. 2.1	L'inflammation des îlots pancréatiques réduit la fonction des cellules $\beta$ .....	75
II. B. 2.2	Diminution de la masse de cellules $\beta$ .....	77
II. B. 3	La gluco- lipotoxicité cause des altérations au niveau subcellulaire.....	78
II. B. 3.1	Le stress du réticulum endoplasmique diminue la sécrétion d'insuline .....	78
II. B. 3.2	L'induction de ROS affecte la sécrétion d'insuline .....	78
II. B. 3.3	L'homéostasie calcique et son implication dans la perte de fonction des cellules $\beta$ .....	79
<b>CHAPITRE III</b>	<b>Le métabolisme cellulaire et la sécrétion d'insuline</b> .....	<b>81</b>
<b>PARTIE A</b>	<b>Le métabolisme énergétique et son étude</b> .....	<b>81</b>
III. A. 1	Le métabolisme énergétique.....	81
III. A. 1.1	Un peu d'Histoire .....	82
	Auparavant.....	82
	De nos jours.....	83
III. A. 1.2	Les approches analytiques en métabolomique .....	85
III. A. 2	L'identification et la quantification des métabolites en métabolomique.....	87
III. A. 2.1	La spectrométrie de masse (MS).....	87
	Bases de la MS.....	87
	Les avantages et limites de la MS .....	88
III. A. 2.2	La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	90
	Le principe de la RMN.....	90
	Les avantages et limites de la RMN appliquée à la métabolomique.....	92
III. A. 2.3	Pourquoi la RMN est la technique la plus adaptée à notre étude ?.....	92
III. A. 2.4	Les différentes étapes lors d'une analyse métabolomique par RMN du proton .....	93
	La préparation de l'échantillon biologique .....	93
	L'identification et la quantification des métabolites.....	96
<b>PARTIE B</b>	<b>Les grandes voies du métabolisme énergétique des cellules <math>\beta</math> et leurs altérations par la glucolipotoxicité</b> .....	<b>99</b>
III. B. 1	L'entrée du glucose dans la cellule .....	99
III. B. 2	La glycolyse, point d'entrée du glucose dans le catabolisme .....	102
III. B. 2.1	La glycolyse dans les cellules $\beta$ .....	102
III. B. 2.2	Altération de la glycolyse par la glucotoxicité.....	104
III. B. 3	Le cycle de l'acide citrique, une voie métabolique complexe mais essentiel à la cellule $\beta$ ....	105
III. B. 3.1	Le cycle du citrate est une voie catabolique complexe .....	105
III. B. 3.2	L'entrée des carbones venant du glucose dans le cycle du citrate est nécessaire au GSIS108	108
III. B. 3.3	Une régulation fine du cycle de l'acide citrique est nécessaire à la sécrétion régulée d'insuline	110
	Les oscillations de la quantité des métabolites mitochondriaux.....	110
	Le $Ca^{2+}$ joue un rôle primordial dans la régulation du cycle du citrate et la chaîne respiratoire en lien avec la sécrétion d'insuline .....	111
	La régulation indirecte de la PDH par le $Ca^{2+}$ mitochondrial.....	112
	La régulation directe des IDHs et de l'OGDH par le $Ca^{2+}$ mitochondrial .....	113
	La modulation de l'activité de la chaîne respiratoire par le $Ca^{2+}$ .....	115
III. B. 3.4	Les navettes mitochondriales, une autre manière de régénérer des cofacteurs et potentialiser la réponse des cellules $\beta$ lors d'une stimulation au glucose.....	116
	La navette pyruvate/malate .....	116
	La navette pyruvate/citrate et acyl-CoAs.....	117
	La navette pyruvate/isocitrate .....	117

Le cycle du phosphoénolpyruvate via la mitochondrie.....	119
III. B. 3.5 Le métabolisme mitochondrial est très impacté par la glucolipotoxicité .....	119
III. B. 4 La synthèse de lipides, une voie impliquée dans la fonction de la cellule $\beta$ .....	121
III. B. 4.1 Les différentes étapes de la lipogénèse .....	122
III. B. 4.2 La glucolipotoxicité altère la synthèse de lipides des cellules $\beta$ pancréatiques.....	125
<b>RESULTATS.....</b>	<b>129</b>
<b>Etude des flux énergétiques par une approche de Résonance Magnétique Nucléaire en temps réel dans des systèmes acellulaires eucaryotes pour la synthèse de protéines .....</b>	<b>130</b>
<b>Revue sur le rôle des interactions MAMs et des échanges calciques dans le développement du diabète de type 2 .....</b>	<b>142</b>
<b>Etude par RMN de l'influence d'un régime obésogène sur le métabolisme et l'accumulation lipidique dans différents organes chez la souris.....</b>	<b>178</b>
<b>Etude par RMN d'îlots pancréatiques humains et de lignée murine lors de conditions pathologiques mimant le diabète de type 2 .....</b>	<b>196</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>233</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>244</b>



# Table des figures

Figure 1 : Les îlots pancréatiques humains.....	32
Figure 2 : Portraits des hommes ayant participé à la découverte de l'insuline. ....	40
Figure 3 : Activation du signal métabolique dans les cellules des organes cibles.....	44
Figure 4 : Action du signal métabolique sur les organes cibles de l'insuline. ....	46
Figure 5 : Synthèse et maturation de l'insuline.....	48
Figure 6 : Sécrétion d'insuline en réponse au glucose. ....	52
Figure 7 : Autres facteurs métaboliques stimulant la sécrétion d'insuline.....	56
Figure 8 : La phosphorylation oxydative permet le renouvellement de l'ATP par la mitochondrie. ....	60
Figure 9 : Les MAMs permettent les transferts calciques entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries.....	63
Figure 10 : Le diabète est un problème majeur et grandissant de santé publique à l'échelle globale.....	69
Figure 11: La glucolipotoxicité et son implication dans le développement du diabète de type 2. ....	73
Figure 12 : La biologie des systèmes est l'intégration des 4 « omiques » : Génomique, Transcriptomique, Protéomique et Métabolomique. ....	84
Figure 13 : Nombre de publications de 2001 à 2019 concernant la métabolomique utilisant la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. ....	86
Figure 14 : Les grandes étapes de la spectrométrie de masse (MS). ....	89
Figure 15 : Les grandes étapes de la résonance magnétique nucléaire (RMN). ....	95
Figure 16 : Les 3 voies métaboliques étudiées au cours de cette thèse sont toutes interconnectées. ....	98
Figure 17 : La glycolyse est une voie catabolique de réduction du glucose en pyruvate. ...	101
Figure 18 : Le cycle de l'acide citrique est une voie métabolique reliée à la glycolyse, la lipogenèse et la $\beta$ -oxydation. ....	106
Figure 19 : Des régulations des déshydrogénases mitochondriales par le $\text{Ca}^{2+}$ . ....	114

<b>Figure 20 : Représentation des navettes et cycles mitochondriaux présentés autour du cycle du citrate en lien avec la sécrétion d'insuline. ....</b>	<b>118</b>
<b>Figure 21 : La lipogénèse <i>de novo</i> permet la synthèse de palmitate à partir de citrate venant du cycle de l'acide citrique. ....</b>	<b>124</b>

# Table des abréviations

---

## 1

<sup>13</sup> C.....	Carbone 13
<sup>14</sup> C.....	Carbone 14

---

## 2

2MAG.....	2 MonoAcylGlycérol
-----------	--------------------

---

## 3

<sup>31</sup> P.....	Phosphore 31
----------------------	--------------

---

## A

ACAS.....	Amérique Centrale et Amérique du Sud
ACC.....	Acétyl-CoA Carboxylase
ACLY.....	ATP Citrate Lyase
ADN.....	Acide DéoxyriboNucléique
ADP.....	Adénosine DiPhosphate
AMP.....	Adénosine MonoPhosphate
ANC.....	Amérique du Nord et Caraïbes
ARN.....	Acide RiboNucléique
ASE.....	Asie du Sud Est
ATP.....	Adénosine TriPhosphate

---

## C

CCDV.....	Canaux Calciques Voltage Dépendants
CD36.....	Cluster de Différentiation 36
CFPS.....	Cell-Free Protein Synthesis (ou système de synthèse protéique acellulaire)
CoA.....	Coenzyme A
CPMG.....	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSPi.....	Cellule Souche Pluripotente induite

---

## D

D <sub>2</sub> O.....	eau deutérée
DAG.....	DiAcylGlycérol
DT2.....	Diabète de Type 2



---

**E**

EAAT ..... Excitatory Amino Acid Transporter  
EIM ..... Espace Inter Membranaire  
ERETIC ..... Electronic REference To access *In vivo* Concentrations

---

**F**

FAD+ ..... Flavine Adénine Dinucléotide  
FADH2 ..... Flavine Adénine Dinucléotide réduit  
FAS ..... Fatty Acid Synthase  
FASIS Fatty Acid Stimulated Insuline Secretion (ou sécrétion d'insuline stimulée par des acides gras)  
FFA 1 R ..... Free Fatty Acid 1 Receptor

---

**G**

G6P ..... Glucose-6-Phosphate  
GC ..... Gas Chromatography (ou chromatographie en phase gazeuse)  
GCK ..... GluCoKinase  
GDH ..... Glutamate DésHydrogénase  
GHIH ..... Growth Hormone Inhibiting Hormone (ou somatostatine)  
GIPR ..... Gastric Inhibitory Polypeptide Receptors  
GLPR ..... Glucagon-Like Peptides Receptor  
GLUT ..... GLUcose Transporteur (transporteur du glucose)  
GPR119 ..... G-Protein Coupled Receptor 119  
GPR40 ..... Free Fatty Acid 1 Receptor (ou FFA 1 R)  
GRP75 ..... Glucose Related Protein 75  
GSIS ..... Glucose Stimulated Insulin Secretion (ou sécrétion d'insuline stimulée par le glucose)

---

**H**

H ..... Hydrogène  
HMDB ..... Human Metabolome DataBase  
HSQC ..... Heteronuclear Single Quantum Coherence

---

**I**

IDH ..... Isocitrate Déshydrogénase  
IGF ..... Insulin-like Growth Factor  
IL ..... InterLeukine  
INSR ..... INSulin Receptor (ou récepteur à l'insuline)  
IP3R ..... Inositol 3 Phosphate Receptor  
IRS ..... Insulin Receptor Substrate

---

**J**

JRES.....J-RESolved Spectroscopy

---

**K**

K<sub>ATP</sub> .....Canaux potassiques ATP-dépendants

KD ..... Knock-Down

K<sub>m</sub> ..... Constantes de Michaelis

KO ..... Knock-Out

---

**L**

LADA ..... Latent Autoimmune Diabetes in Adults

LC.....Liquid Chromatography ( ou chromatographie en phase liquide)

LDH ..... Lactate DésHydrogénase

---

**M**

MAM..... Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane

MAPK..... Mitogen-Activated Protein Kinase

MCU..... Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter

MCU..... Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter

ME ..... Membrane Extracellulaire

MET..... Microscopie Electronique à Transmission

mGPDH .....mitochondrial Glycérol 3-Phosphate DésHydrogénase

MI ..... Membrane Interne

MOAN ..... Moyen-Orient et Afrique du Nord

MODY.....Maturity Onset Diabetes of the Young

MPC..... Mitochondrial Pyruvate Carrier

MS ..... Mass Spectrometry (ou spectrométrie de masse)

mTORC2 ..... mammalian Target Of Rapamycin Complex 2

---

**N**

NAD+..... Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NADH,H+ ..... Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit

NFκB ..... Nuclear Factor-kappa B

NMDA ..... N-Méthyl-D-Aspartique

NOESY ..... Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

---

**O**

OAA..... OxaloActétate

OGDH..... OxoGlutarate DésHydrogénase

---

**P**

pAKT	AKT phosphorylé
PC	Pyruvate Carboxylase
PC2	Prohormone Convertase 2
PCK2	Phosphoénolpyruvate CarboxyKinase 2, mitochondrial
PDH	Pyruvate DésHydrognase
PDK	Pyruvate Déshydrogénase Kinases
PDP	Pyruvate Déshydrogénase Phosphatase
PEP	PhosphoEnolPyruvate
PFK-1	PhosphoFructoKinase-1
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	PhosphoInositide-3-Kinase
PIPs	PhosphatidylInositol-tris-Phosphates
PK	Pyruvate Kinase
PO	Pacifique Ouest
PP	Polypeptide Pancréatique

---

**R**

RE	Réticulum Endoplasmique
REL	Réticulum Endoplasmique Lisse
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species (ou espèces réactives de l'oxygène)

---

**T**

TOCSY	Total COrrrelation Spectroscopy
-------	---------------------------------

---

**U**

UCP2	UnCoupling Protein 2 (ou protéine découplante 2)
UPR	Unfolded Protein Response

---

**V**

VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VGLUT3	Vesicular GLUtamate Transporter 3
Vmax	Vitesse initiale maximale

---

**W**

WB	Western Blot
----	--------------



# **Introduction**



# **CHAPITRE I La cellules $\beta$ et la régulation de la glycémie**

## **PARTIE A La cellules $\beta$ et son environnement**

### **I. A. 1 Les grandes fonctions du pancréas**

Le pancréas est un organe situé dans l'abdomen des vertébrés, sous le foie, devant l'estomac, entre le duodénum (à droite) et la rate (à gauche) (Figure 1 A). Chez l'homme, il mesure en moyenne 13 cm de long, 3 cm de large et 4 de haut et est composé de quatre différentes parties : la tête, le col, le corps et la queue. La tête est la partie la plus large du pancréas, située en contact avec le duodénum, elle est reliée au reste du pancréas par le col. La queue est située à l'opposé de la tête, en contact avec la rate. Le corps est la partie reliant le col à la queue. Le pancréas est un organe bénéficiant d'un fort apport de sang venant du tronc cœliaque ou de l'artère mésentérique supérieure tandis que les veines de l'organe convergent au niveau de la veine porte. De plus le pancréas est traversé sur sa longueur par le canal pancréatique finissant sa course dans le duodénum.

Le pancréas est un organe amphicrine signifiant qu'il a à la fois des fonctions exocrines et endocrines. La fonction exocrine, impliquée dans la digestion, est assurée par les cellules glandulaires organisées en acini et reliées au canal pancréatique par les canaux excréteurs. Ces cellules produisent des enzymes de type protéases, lipases, amylases, ribonucléases et désoxyribonucléases impliquées dans le processus de digestion. Les cellules épithéliales, formant la paroi des canaux excréteurs, sécrètent des ions bicarbonates neutralisant l'acidité du chyme stomacal dans le duodénum. Les enzymes et les ions bicarbonates sont déversés dans le canal pancréatique jusque dans le duodénum (Pandol, 2010). La fonction endocrine du pancréas assure le maintien de l'homéostasie glucidique. Cette fonction est assurée par des cellules regroupées en amas appelés îlots de Langerhans ou îlots pancréatiques.

#### **I. A. 1.1 Les îlots pancréatiques et la fonction endocrine du pancréas**

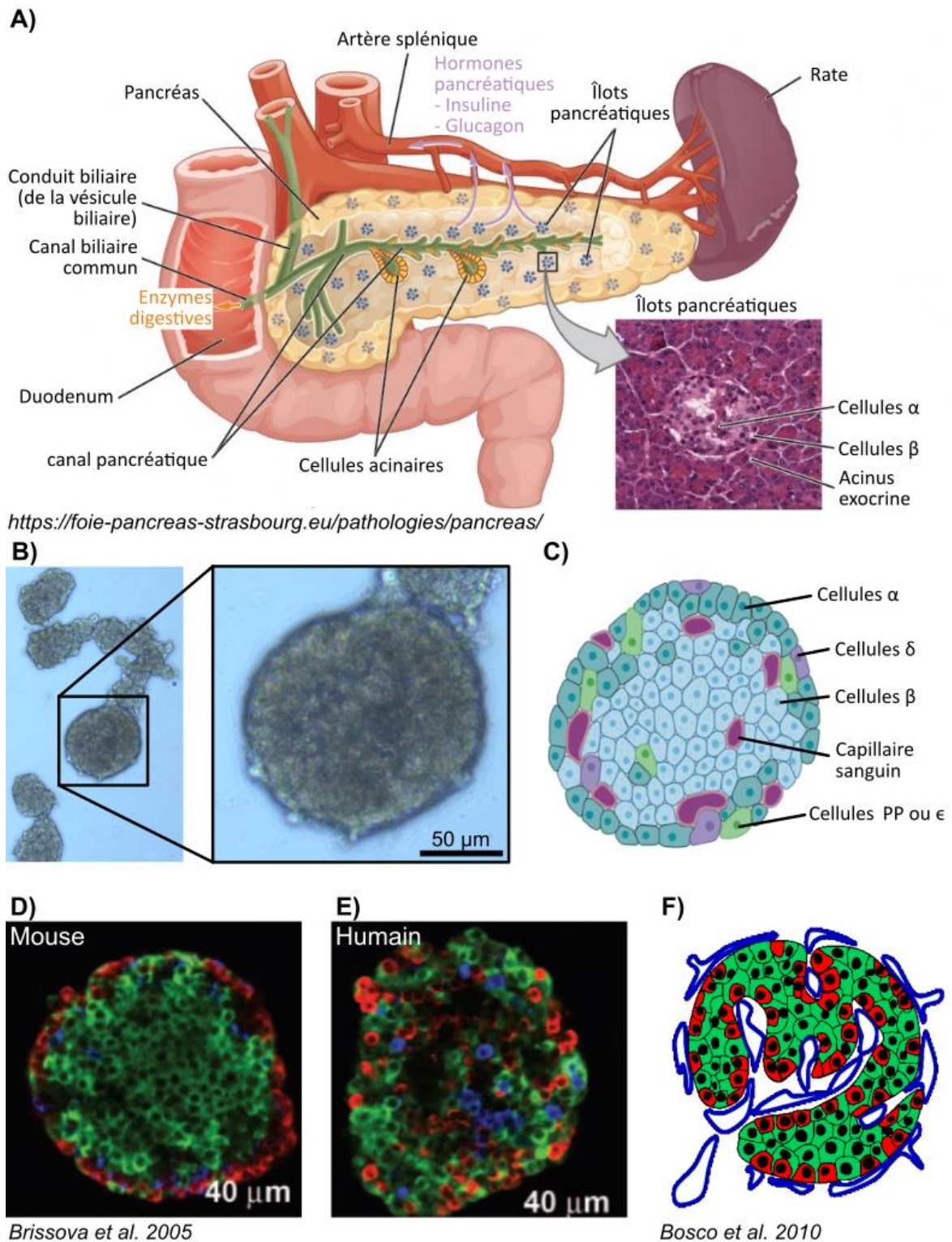
Les îlots sont disséminés dans le parenchyme exocrine pancréatique et richement vascularisés par les artères spléniques et mésentériques supérieures. Cet afflux sanguin spécifique permet de capter des stimuli et d'y répondre en libérant des hormones directement dans le système circulatoire. Les hormones produites par les cellules des îlots pancréatiques sont libérées dans

les veines pancréatiques et distribuées dans tout l'organisme par l'intermédiaire de la veine porte.

Les îlots pancréatiques ne représentent que 1% à 2% à des cellules pancréatiques mais bénéficient jusqu'à 20% de l'afflux sanguin de l'organe (Jansson and Hellerström, 1986). Ces îlots sont de forme sphérique et représentent 0.5 à 1.3 cm<sup>3</sup> du pancréas. Chez l'humain, il était considéré que leur nombre variait entre 3.6 et 14.8 million par pancréas en 1978 (Saito et al., 1978), mais des observations plus récentes ne prenant pas en compte les très petits îlots ajustent ce chiffre à environ 1,5 millions d'îlots pancréatiques de plus de 23 µm de diamètre en 2005 (Da Silva Xavier, 2018; Korsgren et al., 2005). En moyenne la taille d'un îlot humain est de 150 µm contenant environ 1000 cellules endocrines (Figure 1B).

Les îlots pancréatiques sont composés de 5 types de cellules endocrines chacune spécialisée dans la sécrétion d'une hormone spécifique ayant chacune un impact direct ou indirect sur la glycémie. Les cellules α et β sécrètent respectivement le glucagon et l'insuline, permettant la régulation de la glycémie. En plus de ces cellules, les îlots sont composés des cellules δ, ε et PP sécrétant respectivement la somatostatine, la ghréline et le polypeptide pancréatique (PP), des hormones n'ayant pas de lien direct avec la glycémie (Figure 1C). L'organisation des îlots pancréatiques varie selon l'espèce. Chez les rongeurs, les cellules β sont situées au cœur de l'îlot et sont entourées par un manteau constitué des autres types cellulaires (Orci and Unger, 1975) (Figure 1D). Chez d'autres espèces tel que l'homme, les îlots ont une organisation particulière à première vue aléatoire, pour permettre une meilleure vascularisation du micro-organe (Cabrera et al., 2006) (Figure 1E). Mais lorsque l'on regarde plus attentivement, ces îlots de plus grandes tailles disposent d'une structure cœur/manteau comparable à celle des rongeurs (Erlandsen et al., 1976) (Figure 1F). Dans ce cas, les cellules β sont entourées des autres cellules en formant un plan replié autour des capillaires sanguins sous la forme de lobules (Bosco et al., 2010) (Figure 1E 1F). Mais même chez les espèces plus grandes, les plus petits îlots eux gardent une structure similaire à celle des rongeurs (Bosco et al., 2010).





**Figure 1 : Les îlots pancréatiques humains.**

A) Représentation et localisation d'un pancréas humain. B) Image représentative de plusieurs îlots humains ainsi que le zoom sur un îlot (barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ ). C) Représentation et composition d'un îlot pancréatique. D) E) Sections optiques de microscopie confocale de 1 $\mu\text{m}$  à la profondeur indiquée (40 $\mu\text{m}$ ) à travers des îlots isolés murin (D) et humain (E) respectivement permettant d'observer leurs architectures spécifiques en fonction de l'espèce avec les cellules  $\alpha$  (en rouge),  $\beta$  (en vert) et  $\delta$  (en bleu) (G x 40). F) Modèle d'organisation cellulaire dans les îlots humains (cellules  $\beta$  en vert, autres cellules en rouge et vaisseaux sanguins en bleu).

## **Les cellules $\alpha$ et $\beta$**

Les deux types cellulaires majoritairement présents dans les îlots pancréatiques sont les cellules  $\beta$  et  $\alpha$ . Les cellules  $\beta$  pancréatiques sont capables de sécréter de l'insuline, une hormone dite hypoglycémisante permettant de diminuer la glycémie. L'impact de cette hormone sur la glycémie est détaillé en partie 2 de ce chapitre. Les cellules  $\beta$  représentent 48% à 59% des cellules des îlots chez l'humain (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006) et 60% à 80% chez la souris (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006; Quesada et al., 2008). Ces cellules sont vitales et leur absence ou dérégulation cause de sévères complications développées par la suite au chapitre II. Les cellules  $\alpha$  représentent elles entre 30% et 45% des cellules d'îlots dans le modèle humain et 15% à 20% dans le modèle murin (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006; Quesada et al., 2008). Les cellules  $\alpha$  sécrètent du glucagon, une hormone hyperglycémisante stimulant la glycogénolyse dans les hépatocytes, les myocytes ou les adipocytes par le biais d'une famille de récepteurs spécifiques comprenant les récepteurs au glucagon, les glucagon-like peptides 1 et 2 receptor (GLPR) et les gastric inhibitory polypeptide receptors (GIPR). Les cellules  $\alpha$  possèdent un récepteur spécifique générant un potentiel d'action en absence ou à de bas niveaux de glucose (Gromada et al., 1997). Ce potentiel d'action active un signal calcique permettant la libération de glucagon. Ce processus permet la sécrétion stimulée de l'hormone par l'hypoglycémie et inhibée par l'hyperglycémie. Chez l'homme et la souris, le glucose inhibe directement la sécrétion de glucagon des cellules  $\alpha$  (Gromada et al., 2004; MacDonald et al., 2007; Ravier and Rutter, 2005; Shiota et al., 2005; Vieira et al., 2007).

## **Autres cellules composant les îlots pancréatiques**

D'autres types cellulaires minoritaires composent les îlots pancréatiques. Les cellules  $\delta$  sécrètent la somatostatine, aussi appelée growth hormone inhibiting hormone (GHIH). La somatostatine a de multiples fonctions. Elle inhibe la sécrétion d'hormones gastro-intestinales, endocrines, exocrines, pancréatiques et pituitaires en plus de modifier la neurotransmission et la formation de la mémoire dans le système nerveux central, elle diminue aussi l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (O'Toole and Sharma, 2021). La localisation des cellules  $\delta$  ne se restreint pas uniquement aux îlots pancréatiques. Elles sont

présentes dans différents organes comme l'hypothalamus, le système nerveux central et périphérique, l'estomac ainsi que l'intestin (Arimura et al., 1975; Hökfelt et al., 1975). Les îlots pancréatiques humains comptent environ 5% de cellules  $\delta$  et les îlots murins 10% (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006; Quesada et al., 2008). Les cellules  $\delta$  sont équipées de canaux potassiques adénosine triphosphate (ATP) dépendants ouverts lorsque le glucose est bas, permettant le déclenchement d'un potentiel d'action et l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage. Une oscillation du  $\text{Ca}^{2+}$  est alors induite conduisant à la sécrétion de la somatostatine par la cellule (Berts et al., 1996; Braun et al., 2009; Grill and Efendić, 1984; Zhang et al., 2007). Les cellules  $\delta$  sécrètent aussi de la somatostatine en réponse à des nutriments semblables à ceux permettant la sécrétion d'insuline (glucose, acides aminés et lipides) (Rorsman and Huisin, 2018). Cette observation peut être expliquée par le fait que les cellules  $\delta$  et  $\beta$  partagent le même progéniteur endocrine immédiat (Sosa-Pineda et al., 1997). Les cellules  $\epsilon$  sécrètent la ghréline, une hormone régulant principalement la sécrétion de l'hormone de croissance, la prise de nourriture et l'homéostasie énergétique (Shi et al., 2017). Ces cellules  $\epsilon$  sont exprimées en périphérie des îlots pancréatiques de manière similaire chez l'homme, les rongeurs et les poissons (Wierup et al., 2014). Au cours du développement, la quantité de cellules  $\epsilon$  diminue dans les îlots pancréatiques, commençant aux alentours de 10% chez le fœtus et ne représenteraient plus que 1% des îlots à l'âge adulte (Wierup et al., 2014). Les cellules PP, sécrétant le PP, représentent elles moins de 2% des cellules des îlots pancréatiques humains et moins de 5% pour les rongeurs (Clark et al., 1988; Stefan et al., 1982; Sundler et al., 1977). La plus grande concentration de ces cellules se trouve dans les îlots situés au niveau de la tête du pancréas (Stefan et al., 1982). La sécrétion du PP est une étape importante de la communication entre l'intestin et le cerveau par le biais du nerf vague (Holzer et al., 2012; Schwartz, 1983). Cette sécrétion est induite de manière post prandiale (Schwartz, 1983) mais peut aussi être stimulée par l'arginine (Weir et al., 1979). Le PP a la propriété de réduire la « vidange » gastrique et les activités musculaires intestinales (Lin and Chance, 1974).

### **Régulation paracrine de la sécrétion d'insuline et de glucagon**

La somatostatine, le PP, la ghréline mais aussi le glucagon et l'insuline ont en plus de leurs propriétés décrites précédemment, la capacité de moduler les sécrétions d'insuline et glucagon, leurs permettant de participer à la régulation de la glycémie. En effet, la sécrétion

d'insuline est diminuée par l'action de la ghréline dans les îlots mais son action éventuelle sur la sécrétion d'autres hormones pancréatiques reste à définir (Wierup et al., 2014). La sécrétion de glucagon quant à elle est diminuée *in vitro* par le PP (Aragón et al., 2015) sans impacter la sécrétion d'insuline *in vivo* (Bastidas et al., 1990). Le rôle de la somatostatine dans le pancréas est encore mal connu. Celle-ci inhibe la sécrétion de glucagon (Hauge-Evans et al., 2009; Unger and Orci, 2010), d'insuline (Hauge-Evans et al., 2009), de PP ainsi que sa propre sécrétion par un mécanisme d'auto-inhibition (Ipp et al., 1979). Se faisant, la somatostatine agit comme une hormone tampon, prévenant la sursécrétion d'insuline ou de glucagon ou inhibant la sécrétion d'insuline avant la sécrétion de glucagon lors d'une transition de l'hyperglycémie à l'hypoglycémie. La somatostatine stimule des récepteurs spécifiques couplés à des protéines G des cellules  $\alpha$  et  $\beta$  induisant une inhibition paracrine de la sécrétion de glucagon et d'insuline (Rorsman and Husing, 2018). Les cellules  $\alpha$  possèdent elles aussi des fonctions paracrines. En effet la sécrétion de glucagon stimule la sécrétion d'insuline et de somatostatine en agissant sur les cellules  $\beta$  et  $\delta$  (Husing, 2020; Kieffer et al., 1996; Vuguin and Charron, 2011) mais stimule aussi sa propre sécrétion par un mécanisme d'auto activation démontré dans le modèle murin (Ma et al., 2005).

Je vais maintenant me focaliser sur les cellules  $\beta$ , faisant partie intégrante de mon sujet de thèse, et laisser les autres types cellulaires de côté.

### **I. A. 1.2 Les modèles d'étude des cellules $\beta$**

Il existe différents modèles d'étude de la sécrétion d'insuline *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. Je présente ici non-seulement les modèles utilisés lors de cette thèse (les cellules INS-1E et les îlots pancréatiques humains) mais aussi d'autres modèles intéressants ainsi que les raisons qui ont motivé ces choix.

#### **Les modèles *in vitro***

Les travaux sur l'insuline ont commencé il y a plus d'un siècle comme nous le verrons dans la partie suivante. Les modèles de lignées cellulaires  $\beta$  se sont vite révélés indispensables à la recherche dans le domaine d'étude de la sécrétion d'insuline, économisant la vie de nombreux

animaux. C'est pour cela que de multiples lignées de cellules  $\beta$  immortalisées ont vu le jour avec chacune leurs avantages et leurs inconvénients.

### **La lignée cellulaire INS-1E**

La lignée cellulaire utilisée lors de cette thèse est la lignée INS-1E. Celle-ci est originaire d'un insulinome (tumeur de cellules  $\beta$ ) de rat induit par rayons X dans les années 1990 par Asfari *et al.* (Asfari *et al.*, 1992). Les cellules de cette lignée ont des caractéristiques cruciales pour notre étude : ces cellules ont conservé leur fonction ainsi que leur capacité à proliférer à une vitesse adaptée pour notre étude sans nécessiter de concentrations de glucose 4 à 5 fois supérieures à la concentration physiologique. En effet, les INS-1E ont encore la capacité de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et ce même après plus de 80 passages indiquant un maintien de l'état différencié de la lignée. Ces cellules sont de plus cultivées à 10 mM de glucose ce qui permet d'étudier l'effet de concentration supraphysiologique de glucose à 25mM de manière aigue et chronique (Asfari *et al.*, 1992). Ces atouts font de cette lignée une des plus utilisées dans l'étude de pathologies liées à la sécrétion d'insuline.

### **Autres modèles cellulaires non utilisés dans ces travaux**

Miyazaki *et al.* dans les années 1990 travaillaient sur des souris transgéniques exprimant des gènes augmentant la génération de tumeurs dans certains types cellulaires (Paul *et al.*, 1988). L'expression de l'antigène SV40 T à la suite du promoteur de l'insuline permet à Miyazaki *et al.* de développer des insulinomes murins. La caractérisation de ces insulinomes permet de créer la lignée MIN6, sécrétant de l'insuline en réponse à une stimulation au glucose (Miyazaki *et al.*, 1990). Malgré tout, les MIN6 nécessitent l'utilisation d'un milieu contenant des concentrations supraphysiologiques de glucose (25 mM) pour se développer. Cette caractéristique ne permettant pas d'étudier l'impact de l'exposition chronique à des concentrations supraphysiologique de glucose, je ne l'ai pas utilisé au cours de ma thèse.

Cette même méthode a été utilisée dans les années 2010 pour créer une lignée de cellules  $\beta$  à partir d'un insulinome humain (Ravassard *et al.*, 2011). L'antigène SV40 T large a été exprimé sous le promoteur de l'insuline dans un tissu pancréatique fœtal greffé à des souris SCID. Plusieurs tumeurs de cellules  $\beta$  se sont développées menant à de nombreuses lignées. L'une d'entre elles, EndoC- $\beta$ H1, exprime de nombreux marqueurs spécifiques des cellules  $\beta$  en plus de sécréter de l'insuline en réponse à différents sécrétagogues dont le glucose (Ravassard *et*

al., 2011). Les EndoC- $\beta$ H1 sont de bons modèles, proches de l'humain et cultivables à 5mM glucose. Malgré tout, celles-ci prolifèrent environ 4 fois moins vite que les INS-1 en plus d'avoir un rythme métabolique plus faible, signifiant que les consommations et sécrétion des métabolites de la lignée EndoC- $\beta$ H1 sont plus faibles que celles des INS-1. Les travaux de ma thèse, axés sur l'étude du sécrétome métabolique des cellules  $\beta$  (développée dans le chapitre III), ne permettent pas l'utilisation de cette lignée humaine.

Les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) sont des cellules souches générées à partir de cellules somatiques développées en 2006 par Okita *et al.* (Okita and Yamanaka, 2006) sous la direction de Shinya Yamanaka lui ayant valu un prix Nobel de médecine en 2012. Ces cellules ont la particularité de pouvoir être différenciées en presque tous les types cellulaires, en utilisant des facteurs de transcription spécifiques. Plusieurs équipes ont travaillé sur le développement de cellules  $\beta$  à partir de cellules CSPi humaines (Chen *et al.*, 2009; D'Amour *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Kroon *et al.*, 2008; Kunisada *et al.*, 2012; Thatava *et al.*, 2011). Malgré tout, le taux de cellules positives à l'insuline après les différents protocoles proposés est relativement faible (de 0,8% à 15%), rendant pour l'instant ces lignées quasi inutilisables afin d'étudier la sécrétion d'insuline. Le développement d'un protocole simple, reproductible et versatile est encore nécessaire pour imaginer utiliser ce modèle très prometteur pour les études *in vitro* et la greffe de cellules  $\beta$  (Hosoya, 2012).

### **Les modèles *ex vivo***

Comme vu précédemment, les îlots pancréatiques sont constitués de multiples types cellulaires en plus des cellules  $\beta$ . C'est pour cela que le modèle *ex vivo* d'îlots pancréatiques, plus intégré que les modèles *in vitro*, jouent un rôle incontestable dans le domaine d'étude de la sécrétion d'insuline.

### **Les îlots murins**

Les îlots murins sont couramment utilisés dans les études sur le diabète. L'avantage de ce modèle provient de sa disponibilité dans la recherche. En effet un utilisateur expérimenté peut extraire entre 200 et 400 îlots pancréatiques par souris (Gotoh *et al.*, 1985; Shewade *et al.*, 1999) et de 600 jusqu'à 800 îlots par rat (de Groot *et al.*, 2004) correspondant à 10% à 30% des îlots totaux de l'animal (Carter *et al.*, 2009). Il existe différentes approches d'extraction de

ces îlots pancréatiques. La première méthode nécessite l'extraction du pancréas de l'animal et sa réduction mécanique en morceaux d'environ 1 à 2mm. Puis une solution de collagénase sur ces morceaux permet de séparer les îlots des cellules les entourants (Lacy and Kostianovsky, 1967; O'Dowd, 2009). La seconde méthode consiste à injecter directement la collagénase dans le conduit biliaire du pancréas. L'organe est ensuite excisé de l'animal et digéré à 37°C sans dégradation mécanique préalable (Gotoh et al., 1985).

### **Les îlots humains**

Les îlots pancréatiques humains sont des modèles intégrés et précieux. L'utilisation d'îlots pancréatiques humains dans la recherche a permis de nombreux projets et avancées dans la compréhension de la biologie de ces îlots (Hart and Powers, 2019). Ceux-ci proviennent de donneurs décédés la plupart du temps d'arrêt cérébral. Cette cause de mort permet de préserver les îlots pancréatiques de tout stress avant leur extraction. Afin de permettre leur utilisation dans la recherche ou le domaine médical, il est nécessaire d'isoler les îlots du reste du pancréas par microdissection (Hellerstroem, 1964). Ensuite des enzymes, comme la collagénase, sont utilisées afin d'isoler au mieux les îlots pancréatiques (Moskalewski, 1965). La perfusion du pancréas avec ces enzymes permet de dégrader la matrice extracellulaire et séparer les îlots du reste du pancréas (Shapiro et al., 2017). Une centrifugation sur gradients isole et purifie efficacement les îlots pancréatiques (Lindall et al., 1969; Shapiro et al., 2017).

Ces modèles d'études permettent d'étudier les mécanismes de la sécrétion d'insuline. Cette hormone fait l'objet de nombreuses études car la compréhension fine de sa sécrétion et de son mécanisme d'action ont permis et permettront des avancées majeures dans la vie de nombreuses personnes souffrants de pathologies liées à l'insuline.

## **PARTIE B L'insuline et sa sécrétion régulée**

### **I. B. 1 L'historique de la découverte de l'insuline**

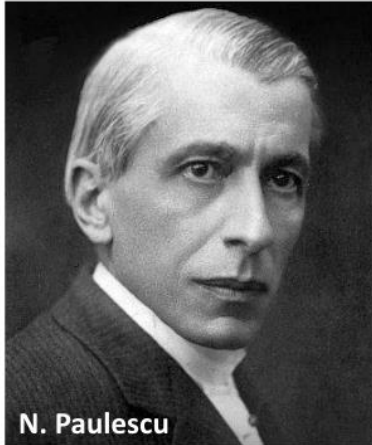
L'insuline n'a pas été la découverte d'une seule personne et fait suite à une plus longue histoire dont les implications par rapport au diabète sont développées au chapitre II et son origine au chapitre III. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, peu de choses sont connues sur l'insuline. Même le nom d'insuline, donné par Jean de Meyer, est alors utilisé pour décrire une sécrétion

« sûrement » pancréatique provenant « probablement » des îlots pancréatiques décrits par Paul Langerhans au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle (Bliss, 2019).

Entre 1900 et 1914, Georg Ludwig Zuelzer, un physicien allemand, travaillait sur les effets des extraits pancréatiques, réalisés à partir d'alcool, sur la survie de chiens et lapins avec une déficience pancréatique (Jörgens, 2021). Ses résultats lui permirent de traiter pendant plusieurs jours un patient atteint d'un diabète sévère, et ce, jusqu'à épuisement de son stock d'extraits pancréatiques (Karamitsos, 2011). Il conclut que ces extraits avaient un impact sur la quantité de glucose présente dans les urines des patients diabétiques. Malgré cela, l'utilisation de ces extraits était associée à des vomissements, de la fièvre ainsi que des convulsions (Pratt, 1989). Zuelzer mis un terme à ses recherches en 1914 à la suite de l'entrée dans la 1ere guerre mondiale (Bliss, 2019).



A)



N. Paulescu

B)



J.R. Macleod

C)



C.H. Best

F. Banting

D)



J.B. Collip

**Figure 2 : Portraits des hommes ayant participé à la découverte de l'insuline.**

A) N. Paulescu, B) J.R. Macleod, C) C. Best et F. Banting et D) J.B. Collip.

Indépendamment, Ernest Lyman Scott travaillait aussi sur des extraits pancréatiques administrés à des chiens dont le pancréas avait été ligaturé. Les résultats montraient des effets positifs sur la survie de ces animaux (Scott, 1912). Une correspondance avec le Professeur John James Rickard Macleod (Figure 2B) conclue au fait qu'il serait impossible d'isoler les sécrétions internes du pancréas en vue de les utiliser à des fins thérapeutiques. Cette nouvelle conduit au départ de Scott vers un autre domaine de recherche, abandonnant ses recherches sur les extraits pancréatiques (Bliss, 2019).

John Murlin et Benjamin Karmer observèrent une diminution du glucose dans les urines de chien après administration d'extraits pancréatiques mais leurs conclusions restèrent hésitantes (Murlin and Kramer, 1913). En 1915, Israel Kleiner confirma également ces résultats en montrant l'effet de ces extraits sur le glucose sanguin (Karamitsos, 2011). Il ne fut malheureusement pas en mesure de poursuivre ses recherches par manque de financement (Karamitsos, 2011).

Nicolae Paulescu (Figure 2A) étudia aussi en 1916 les extraits pancréatiques comme traitement contre l'obésité et le diabète, il publia ses recherches dans un journal francophone (Karamitsos, 2011). Les recherches de N. Paulescu étaient plus poussées comparées aux autres chercheurs de son temps et il est aujourd'hui considéré comme l'un des découvreurs de l'insuline (Martin, 1989). Malgré tout, la nécessité d'utiliser 20mL de sang pour doser le glucose a poussé Paulescu à utiliser des sujets non-humains pour ses expériences (Hegele and Maltman, 2020; Karamitsos, 2011).

En 1920, Frederick Banting (Figure 2C) a l'idée d'isoler la partie endocrine de la partie exocrine du pancréas afin d'étudier plus spécifiquement la ou les sécrétion(s) endocrine(s) de cet organe. Le Professeur Miller, chargé de son encadrement, lui conseille d'en parler au Professeur J.R Macleod, un spécialiste du métabolisme des carbohydrates. J.R. Macleod accepte et laisse son laboratoire sous la responsabilité de F. Banting. C'est avec l'aide de Charles Herbert Best (Figure 2C) que F. Banting, commence ses expériences en mai 1921 jusqu'en décembre 1921 où ils mettent au point une technique d'extraction pancréatique à partir d'alcool et réalisent de multiples tests avec ces extraits pancréatiques sur des chiens. Ils injectent ensuite ces extraits à des animaux ayant subi une ablation ou une ligature du pancréas et observèrent une plus longue survie de ceux-ci. Dès décembre 1921, avec l'aide du

Professeur James Bertram Collip (Figure 2D), ils mettent en évidence le caractère protéique de l'insuline et sa sécrétion par le pancréas. De plus, ils découvrent que l'insuline est sécrétée par plusieurs espèces, agissant de manière universelle et permettant de diminuer la glycémie et traiter le diabète d'une espèce à l'autre. Ils présentent leurs résultats en fin d'année 1921 et décident de traiter avec de l'insuline un enfant de 14 ans atteint d'un diabète dès janvier 1922 (Bliss, 2019; Hegele and Maltman, 2020). Les premières injections révélaient une diminution du sucre dans les urines mais le patient souffrait de signes d'infection au niveau des sites d'injections mettant en suspend les opérations (Bliss, 2019). J. B. Collip résolu ce problème en réalisant une extraction plus propre permettant de réduire l'infection suite aux injections d'extraits pancréatiques (Karamitsos, 2011; Martin, 1989).

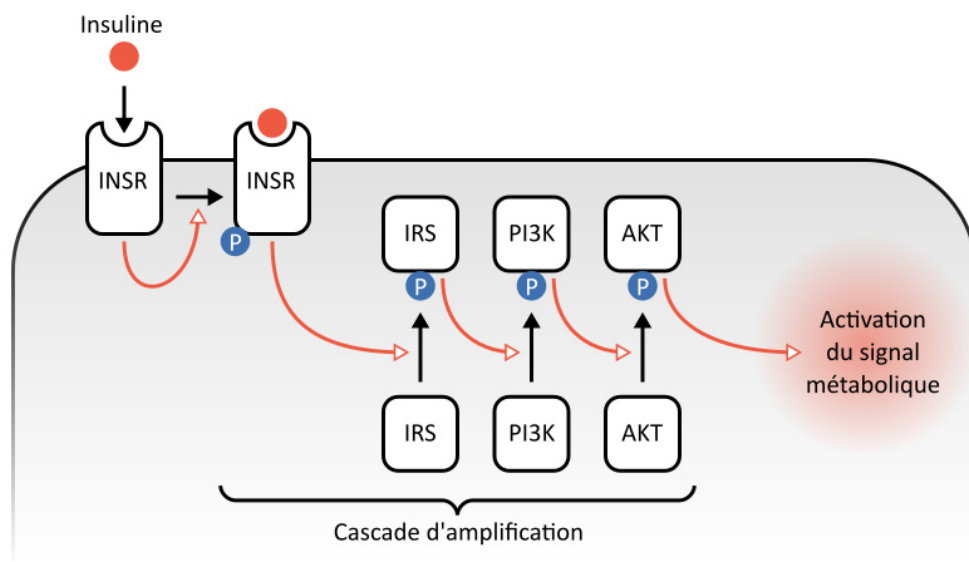
Dès février 1922, ces injections sont administrées à 6 patients (Banting and Best, 1963). Au départ appelée « pancréine », le nom « insuline » fut défini en hommage au nom que lui avait donné le Docteur belge J. Mayer travaillant quelques années avant sur les sécrétions internes du pancréas (Karamitsos, 2011). En février 1923, la compagnie pharmaceutique américaine Eli Lilly commença une production en masse d'insuline suivie par le Medical Research Council of London (Karamitsos, 2011) pour répondre à la demande grandissante. Le diabète juvénile, jusque-là incurable et rapidement fatal, devint traitable.

F. Banting et J.R. Macleod furent nobélisés en octobre 1923 pour leurs travaux sur l'insuline qu'ils partagèrent avec C.H. Best et J.B. Collip. N. Paulescu, revendiquant la paternité de la découverte, ne fut pas entendu à l'époque. Il fut cependant reconnu à titre posthume comme étant impliqué dans la découverte de l'insuline lors de la célébration des 50 ans de l'implémentation de la thérapie à l'insuline (Karamitsos, 2011).

Cette année 2021, nous célébrons le 100<sup>ème</sup> anniversaire de la découverte de l'insuline, la protéine qui révolutionna et révolutionnera la vie de centaines de millions de personnes diabétiques.

## **I. B. 2 Le rôle clef de l'insuline dans la régulation glycémique**

Nous allons maintenant nous intéresser au rôle de l'insuline dans l'organisme. Cette hormone est caractérisée d'hypoglycémiant, c'est-à-dire qui permet de réduire la quantité de glucose circulant. Elle intervient lors de situations d'hyperglycémie, après un repas par exemple, permettant de maintenir l'homéostasie glucidique autour de 1g/L de sang. C'est une hormone endocrine peptidique stimulant le métabolisme anabolique (Dimitriadis et al., 2011). Des peptides similaires à l'insuline ont été identifiés universellement dans le règne animal (Jin Chan and Steiner, 2000) mettant en avant l'importance de cette hormone. Des études phylogénétiques ont permis de mettre en évidence une similarité entre l'insuline et des insulin-like growth factor (IGF)-1 et 2 provenant d'une duplication et d'une dérive génétique au cours de l'évolution (Jin Chan and Steiner, 2000). La similarité structurale entre l'insuline et les IGFs explique leur capacité commune à stimuler le récepteur à l'insuline (INSR). Ce récepteur est exprimé de façon ubiquitaire mais seuls quelques types cellulaires, appartenant aux tissus dits périphériques, ont un rôle à jouer dans l'homéostasie glucidique en répondant à l'action directe de l'insuline. Il s'agit des rhabdomyocytes, des hépatocytes et des adipocytes du tissu adipeux blanc (Petersen and Shulman, 2018). Les effets physiologiques de l'insuline sont réalisés uniquement après son interaction avec l'INSR (Haeusler et al., 2018). À concentration physiologique, une seule molécule d'insuline se lie à un INSR (De Meyts, 2008; Hubbard, 2013). Cette interaction induit un changement conformationnel du récepteur permettant son autophosphorylation suivie d'une cascade d'activations intracellulaires (Hubbard et al., 1994; Wei et al., 1995). Deux types de signaux peuvent être déclenchés suite à cette interaction : un signal mitogénique passant par la voie de signalisation mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Bedinger and Adams, 2015) et un signal métabolique permettant la captation et la diminution du glucose circulant. Contrairement au signal mitogénique, le signal métabolique est déclenché par des concentrations plus basses d'insuline (Bedinger and Adams, 2015). Le signal mitogénique est en général stimulé par les IGFs (Bedinger and Adams, 2015). Du fait de son implication dans l'homéostasie glucidique, c'est le signal métabolique qui est développé dans ce manuscrit.

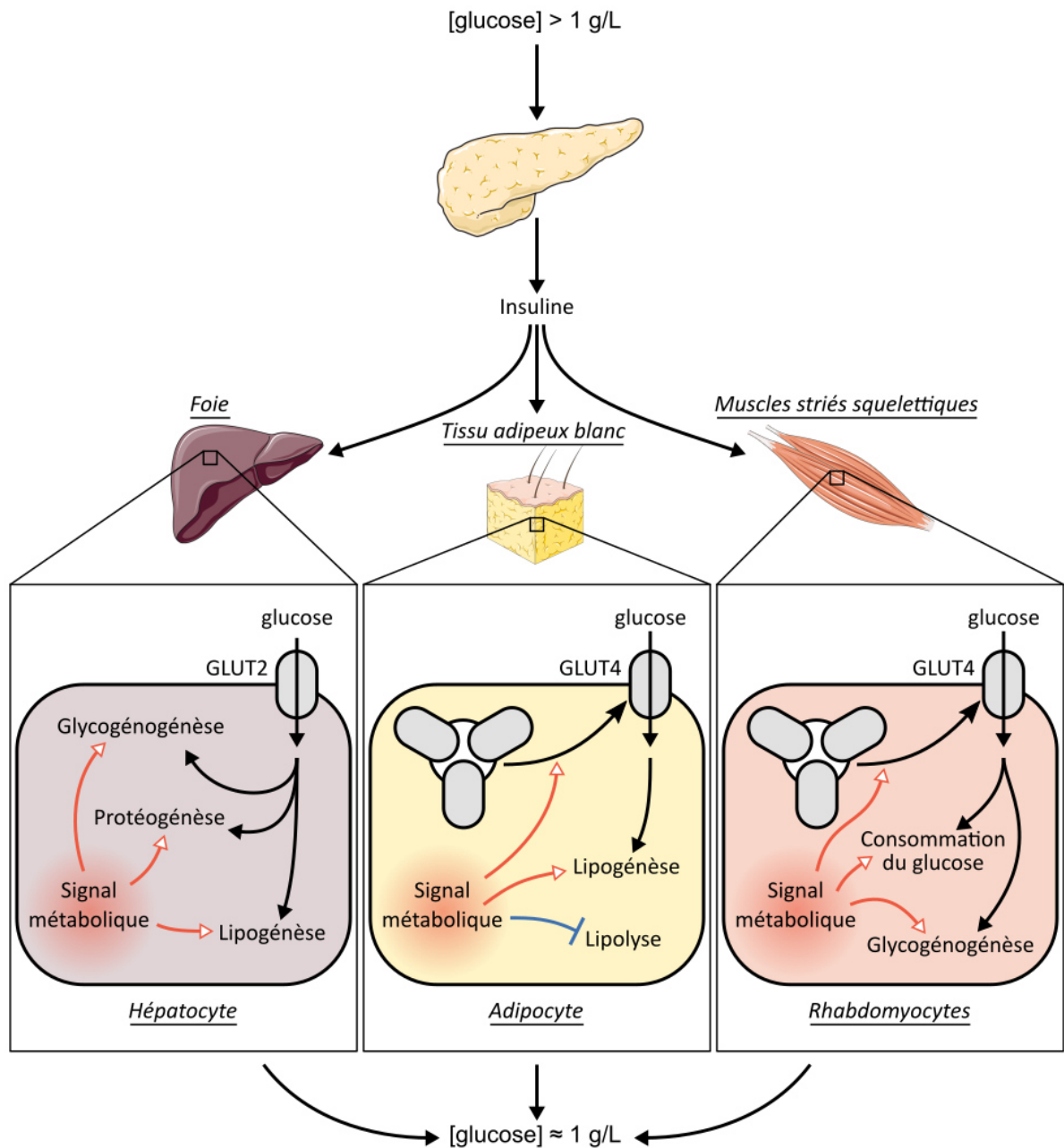


**Figure 3 : Activation du signal métabolique dans les cellules des organes cibles.**

Les flèches rouges représentent des inductions de phosphorylations créant une cascade d'amplification et menant au signal métabolique de l'insuline. P : phosphorylation, INSR : récepteur à l'insuline, IRS : substrat du récepteur à l'insuline, PI3K : phosphoinositide-3-kinase, AKT : protéine kinase B.

### **I. B. 3 La traduction du signal de l'insuline et le mécanisme de régulation de la glycémie par les cellules cibles**

L'interaction de l'insuline avec son récepteur déclenche une cascade de réactions enzymatiques permettant l'amplification du signal de l'insuline. Après son autophosphorylation, l'INSR phosphoryle plusieurs Insulin Receptor Substrate (IRS) (Hubbard, 2013) permettant le recrutement de phosphoinositide-3-kinase (PI3K) et l'activation par phosphorylation d'AKT (pAKT), appelée aussi protéine kinase B, par le biais de la production et l'accumulation de phosphatidylinositol-tris-phosphates (PIPs) (Alessi et al., 1996; Hodakoski et al., 2014; Stephens et al., 1998). La cascade d'activation de multiples protéines intermédiaires permet l'amplification du signal de l'insuline. Une fois la protéine AKT activée, celle-ci va directement induire le signal métabolique mais aussi activer le complexe mammalian Target Of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) (Sarbassov et al., 2005). Du fait de son implication majeure dans la stimulation du signal métabolique, la mesure du ratio pAKT/AKT est la donnée la plus utilisée pour quantifier le niveau d'activation de la cascade de phosphorylation induite par l'INSR (Petersen and Shulman, 2018). L'IRS, PI3K et AKT sont tous trois nécessaires à l'activation du signal métabolique dans les cellules sensibles à l'insuline (Figure 3).



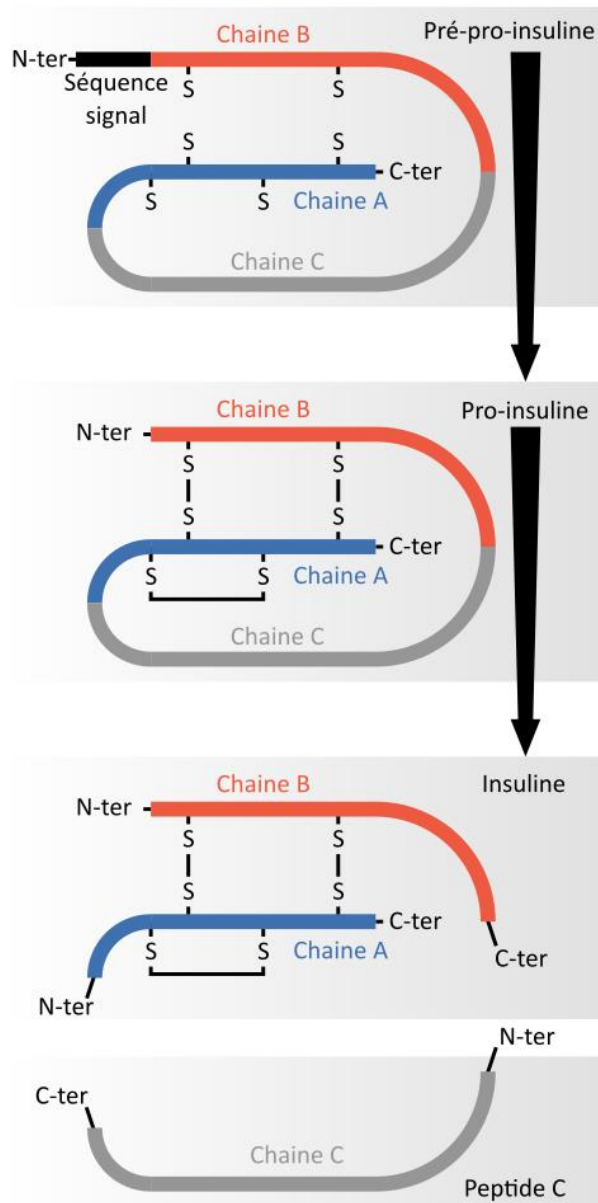
**Figure 4 : Action du signal métabolique sur les organes cibles de l'insuline.**

Lorsque le glucose circulant dépasse la concentration de 1 g/L, le pancréas sécrète de l'insuline, activant le signal métabolique dans les cellules composant les différents organes cibles : hépatocyte (foie), adipocyte (tissu adipeux blanc) et rhabdomyocytes (muscles striés squelettiques). Le signal métabolique aura différents rôles en fonction de l'organe cible d'appartenance des cellules, mais tous rôles permettront de réduire la concentration de glucose circulant jusqu'à atteindre environ 1 g/L. GLUT2-4 : transporteur du glucose 2-4.

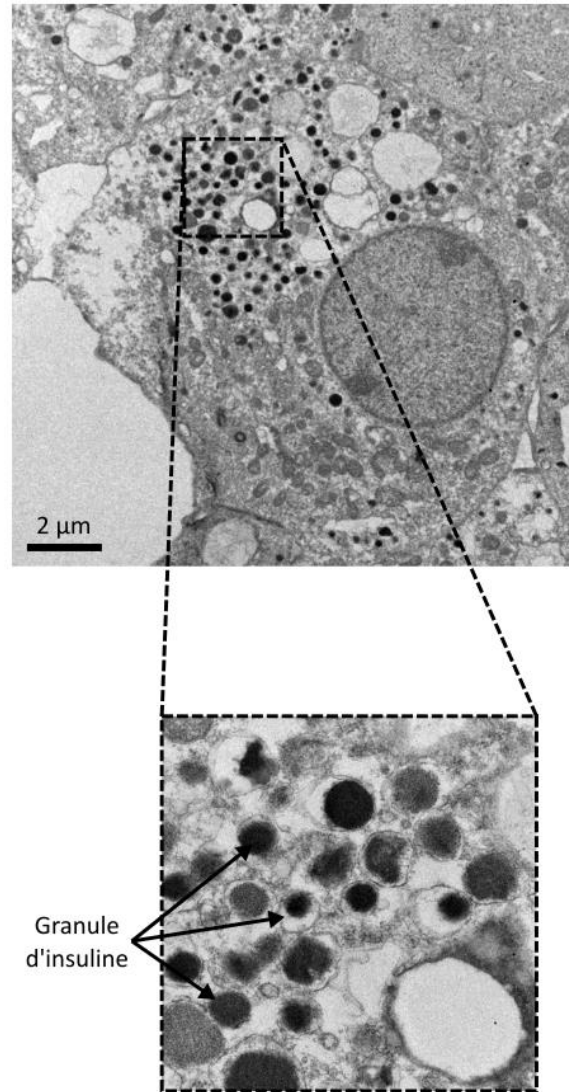
Malgré la similitude de la cascade d'amplification du signal de l'insuline, selon leur type, les cellules présenteront des réponses différentes permettant la régulation de l'homéostasie glucidique (Molinaro et al., 2019; Petersen and Shulman, 2018). Le pancréas est relié à la circulation sanguine par la veine porte exposant le foie à une concentration 2 à 3 fois plus élevée d'insuline que le reste de l'organisme (Cherrington et al., 1998). Dans cet organe, l'insuline permet aux hépatocytes de stimuler la synthèse de macromolécules endogènes comme le glycogène, des lipides et des protéines ainsi que de réduire la production de glucose hépatique (Cherrington et al., 1998). Indépendamment de l'insuline, une hyperglycémie est suffisante pour inhiber la glycogénolyse mais l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie combinées sont nécessaires pour augmenter la synthèse de glycogène dans le foie (Petersen et al., 1998). Dans le tissu adipeux blanc, l'activation du signal métabolique des adipocytes induit d'une part la suppression de la lipolyse (Perry et al., 2015; Reaven, 1988) ainsi que la translocation de transporteur au glucose GLUT4 à la membrane plasmique (Bogan, 2012; Cushman and Wardzala, 1980; Suzuki and Kono, 1980) et augmentant finalement la lipogénèse (Lewis et al., 1991). Ces trois mécanismes permettent respectivement de diminuer la sécrétion de glucose stocké sous forme de lipides, d'augmenter son absorption par le biais des GLUT4 et d'augmenter son stockage sous forme de lipides. Les muscles striés squelettiques sont aussi sensibles à l'insuline. Comme pour les adipocytes du tissu adipeux blanc, les rhabdomyocytes vont augmenter la quantité de transporteur GLUT4 à leur membrane plasmique (Leto and Saltiel, 2012). De plus, l'insuline induit dans la cellule musculaire une augmentation de la consommation du glucose et la stimulation de l'anabolisme par la synthèse de glycogène (Cline et al., 1999; Cohen, 2006; Ren et al., 1993; Shulman and Rothman, 1996) (Figure 4). Toutes ces fonctions ont pour objectif de capter et stocker ou consommer le glucose circulant afin de diminuer sa concentration dans le sang lors d'une hyperglycémie, ramenant ainsi sa concentration autour des 1g/L (Figure 4).



A)



B)



**Figure 5 : Synthèse et maturation de l'insuline.**

A) Maturation de l'insuline et du peptide C à partir de la pré-pro-insuline. B) Images d'une cellule  $\beta$  pancréatique en microscopie électronique ainsi qu'un zoom sur les granules d'insuline.

## **I. B. 4 La synthèse et la sécrétion régulée d'insuline**

Afin de maintenir l'organisme autour de 1g/L de glucose circulant, la sécrétion de l'insuline doit être finement régulée. C'est ce que nous allons chercher à comprendre dans cette partie en nous intéressant à la fonction de la cellule  $\beta$ , de la biosynthèse et stockage de l'insuline jusqu'à sa sécrétion régulée par le glucose ou d'autres sécrétagogues moins connus.

### **I. B. 4.1 La biosynthèse de l'insuline**

Les cellules  $\beta$  sont des usines sophistiquées destinées à produire de l'insuline. En effet, 6000 molécules de pré-pro-insuline sont produites par cellule  $\beta$  et par seconde, représentant 15% à 50% de la synthèse de protéines totales de la cellule (Schuit et al., 1991). Sur toutes ces molécules d'insuline produites, seul 1% est dégradé suite à des erreurs de traduction ou de modifications post-traductionnelles. Ce phénomène est bien en deçà des 30% de protéines dégradées à cause d'erreurs d'expression similaires dans la plupart des autres cellules (Gehart and Ricci, 2013; Schubert et al., 2000). La biosynthèse de l'insuline est un processus comptant plusieurs étapes (Vakilian et al., 2019) dynamiquement régulées permettant à la cellule  $\beta$  de toujours disposer d'une réserve d'insuline nécessaire à sa fonction (Liu et al., 2018). La synthèse de la pré-pro-insuline est initiée dans le cytosol, puis le polypeptide est transloqué dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) grâce à un peptide signal (Dodson and Steiner, 1998; Liu et al., 2014) (Figure 5A). Le clivage de la séquence signal située dans la partie N-terminale de la pré-pro-insuline permet la formation de la pro-insuline (Sun et al., 2015; Weiss et al., 2000). La formation de trois ponts disulfures permet à la chaîne polypeptidique de se replier sur elle-même (Liu et al., 2009; Weiss, 2009) (Figure 5A). La proinsuline est ensuite clivée à deux endroits formant un assemblage de deux chaînes polypeptidiques reliées entre elles par deux ponts disulfures. Un reste de séquence clivée forme le peptide-C (Sun et al., 2015; Weiss, 2009) (Figure 5A). Le peptide-C et l'insuline seront tous deux stockés à des concentrations équimolaires dans les granules d'insuline (Venugopal et al., 2021) (Figure 5A).

### **I. B. 4.2 Le stockage de l'insuline**

Dans la cellule  $\beta$ , l'insuline est stockée sous forme de granules observables en microscopie électronique à transmission (MET) (Figure 5B). Chez l'homme, on trouve environ 10 000

granules par cellule (Olofsson et al., 2002) contenant chacun jusqu'à 8 à 9 femtogrammes d'hormone soit une concentration d'environ 100mM d'insuline par granules (Huang et al., 1995; Rorsman and Renström, 2003). Ces granules ont un diamètre d'environ 300nm (Rorsman and Renström, 2003). L'insuline représente ainsi 5% à 10% de la quantité totale de protéines de la cellule. Des observations de microscopie électronique, montrent que 10% des granules d'insuline des cellules  $\beta$  d'îlots pancréatiques sont localisées à la membrane plasmique de la cellule et 30% à moins de 300nm de la membrane permettant à la cellule  $\beta$  de disposer de 40% de granules d'insuline immédiatement mobilisables (Rorsman et al., 2000) conformément à nos observations en MET.

La conversion de la pro-insuline en insuline est le point de départ de la formation des granules (Steiner, 1982; Weiss et al., 2000). Le clivage du peptide connectant les chaînes A et B est réalisé par la Prohormone Convertase 2 (PC2), une enzyme associée à la membrane de l'appareil de Golgi (Bennett et al., 1992). L'insuline est stockée dans les granules sous forme d'hexamères grâce à la présence de deux ions zinc et d'un pH inférieur à 6 favorisant des liaisons hydrogène entre les protéines d'insuline (Baker et al., 1988; Bentley et al., 1992; Nicolson et al., 2009). Ces hexamères sont aplatis et s'agrègent sous forme de cristaux (Michael et al., 1987) (Figure 5B). Cette organisation cristalline assure probablement la protection de l'insuline de sa dégradation par des enzymes protéolytiques (Dodson and Steiner, 1998) et augmenterait la stabilité de l'hormone (Coore et al., 1970). De plus, cette forme de stockage permettrait la sélection de l'insuline complètement convertie sans pour autant intervenir dans le processus de conversion (Dodson and Steiner, 1998).

#### **I. B. 4.3 La sécrétion de l'insuline**

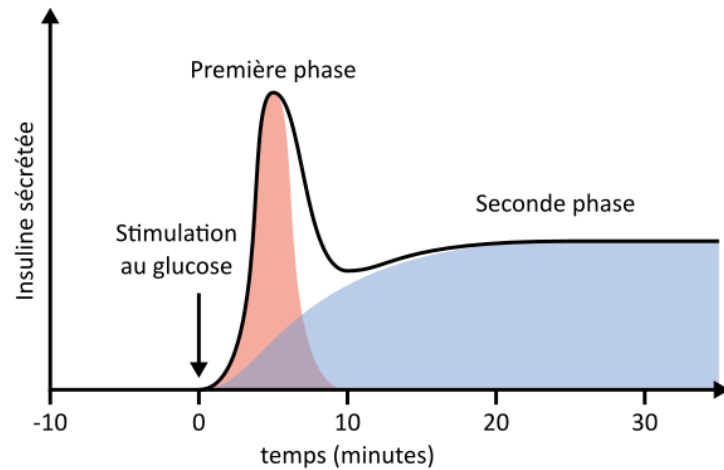
La biosynthèse et le stockage d'insuline sont tellement efficaces que même avec une forte stimulation au glucose, chaque cellule  $\beta$  ne sécrète que 1% de sa réserve d'insuline par heure (Rorsman and Renström, 2003). Lors de la sécrétion des cristaux dans le sérum, le pH passe de 5,5 à 7,4 réduisant les liaisons hydrogène redonnant des structures en hexamères maintenues par la présence de zinc. Ces derniers sont rapidement dilués dans le sérum. La forte répulsion qu'il existe entre les carboxylates des chaînes latérales des glutamates liant les molécules d'insuline entre elles prend alors le dessus en désintégrant le cristal et libérant

l'insuline sous sa forme monomérique dans la circulation (Bentley et al., 1992; Dodson and Steiner, 1998).

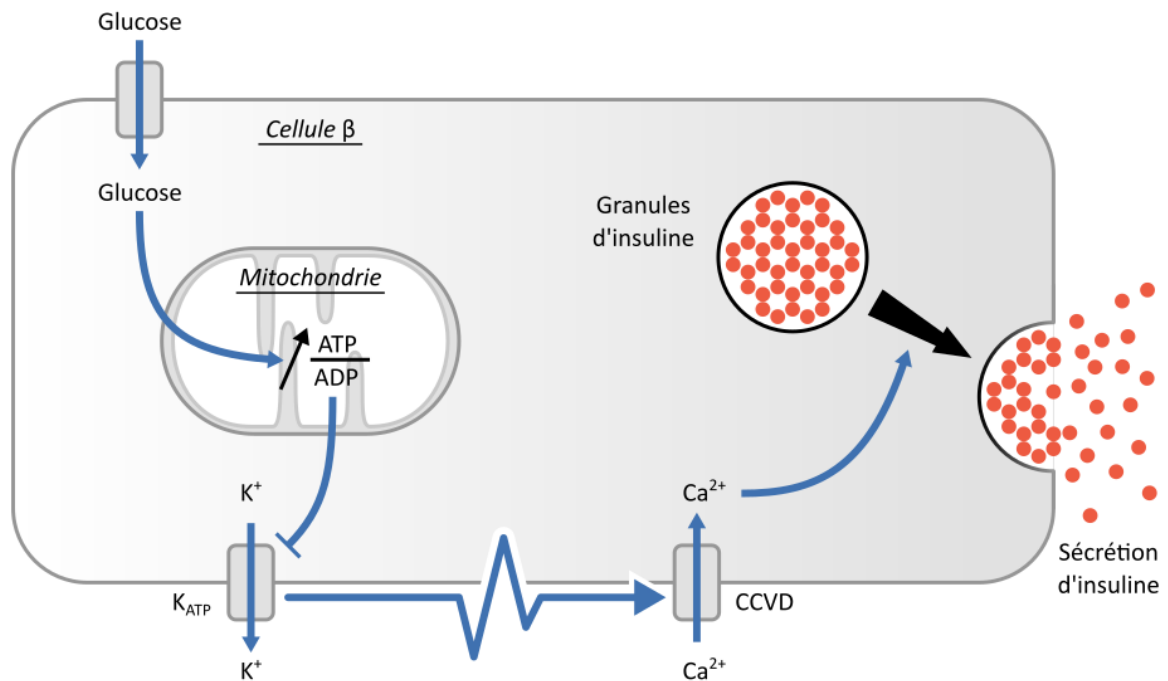
La sécrétion d'insuline est dite biphasique : la première phase de sécrétion à moins de 10 minutes après la stimulation au glucose puis la seconde durant tant que le stimulus reste appliqué (Magnan and Ktorza, 2005). Les observations de ces différentes phases de sécrétion d'insuline ont été réalisées sur différents modèles *in vivo* et *in vitro* (Cerasi and Luft, 1967; Curry et al., 1968; Henquin et al., 2002). Malgré tout, les études *in vitro* chez l'homme et la souris (Henquin et al., 2006b, 2006a) présentent des secondes phases moins développées que les modèles *in vivo* (Henquin et al., 2006b; Luzi and DeFronzo, 1989; Nesher and Cerasi, 2002; Nunemaker et al., 2006) (Figure 6A).

La première phase est une réponse rapide et intense des cellules  $\beta$  pancréatiques (Caumo and Luzi, 2004; Henquin et al., 2006b) ayant pour effet d'inhiber la néoglucogenèse hépatique (Cherrington et al., 2002; Luzi and DeFronzo, 1989) en plus d'atteindre rapidement une concentration d'insuline interstitielle suffisante à son action (Getty et al., 1998) (Figure 6A). Cette phase mobilise les granules d'insuline directement accolés à la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques (Rorsman et al., 2000). La seconde phase se traduit par une augmentation graduelle de la sécrétion d'insuline au cours de la stimulation par le glucose (Henquin et al., 2006b) permettant de maintenir l'état de diminution de glucose circulant (Figure 6A). Cette phase fait appelle aux autres granules d'insuline situés plus profondément dans la cellule  $\beta$  lors de la stimulation au glucose (Rorsman et al., 2000).

A)



B)



**Figure 6 : Sécrétion d'insuline en réponse au glucose.**

A) Représentation graphique des 2 phases de la sécrétion d'insuline. La première phase est représentée en rouge. La seconde est représentée en bleu. B) Représentation des événements impliqués dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate,  $K_{ATP}$  : canal potassique sensible à l'ATP, CCVD : canal calcique voltage dépendant.

## **Le rôle majeur du glucose dans la sécrétion d'insuline**

La sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) est permise grâce à différents acteurs métaboliques et protéiques comme représentés en figure 6B. Le métabolisme spécifique du glucose est développé dans le chapitre III. La cellule  $\beta$  capte le glucose grâce à des transporteurs de glucose : les GLUTs. Une fois dans la cellule, les carbones provenant du glucose sont orientés vers le cycle de l'acide citrique dans la mitochondrie pour produire de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi). L'ATP est le substrat énergétique de la cellule. Ainsi, lors de la stimulation au glucose, le rapport ATP/ADP augmente entraînant la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants ( $K_{ATP}$ ) (Ashcroft et al., 1984; Cook and Hales, 1984; Craig et al., 2008). Ceci génère un potentiel d'action qui permet l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants (CCDV) (Rorsman and Ashcroft, 2018). Ces derniers induisent un influx de  $Ca^{2+}$  à l'intérieur de la cellule qui déclenche à son tour l'exocytose des granules d'insuline (Jonas et al., 1998) situés directement sous la membrane plasmique. Cet enchainement de réactions résume la phase de sécrétion aigüe d'insuline (Straub and Sharp, 2002). La seconde phase est due à un mécanisme indépendant des canaux potassiques mais dont le mécanisme ne fait toujours pas consensus à ce jour. Celle-ci nécessite probablement d'autres messagers secondaires comme l'adénosine monophosphate (AMP) ou le DAG et solliciterait tous les types de granules d'insuline de la cellule  $\beta$  indépendamment de leur localisation (Straub and Sharp, 2002). La seconde phase de sécrétion d'insuline pourrait contribuer à plus de 70% de la sécrétion d'insuline lors d'une réponse à une stimulation au glucose (Henquin et al., 2003).

Le glucose est le principal déclencheur de la sécrétion d'insuline mais d'autres métabolites sont depuis longtemps reconnus comme étant impliqués dans sa sécrétion (McQuarrie, 1954).

## **D'autres facteurs métaboliques sont des sécrétagogues efficaces**

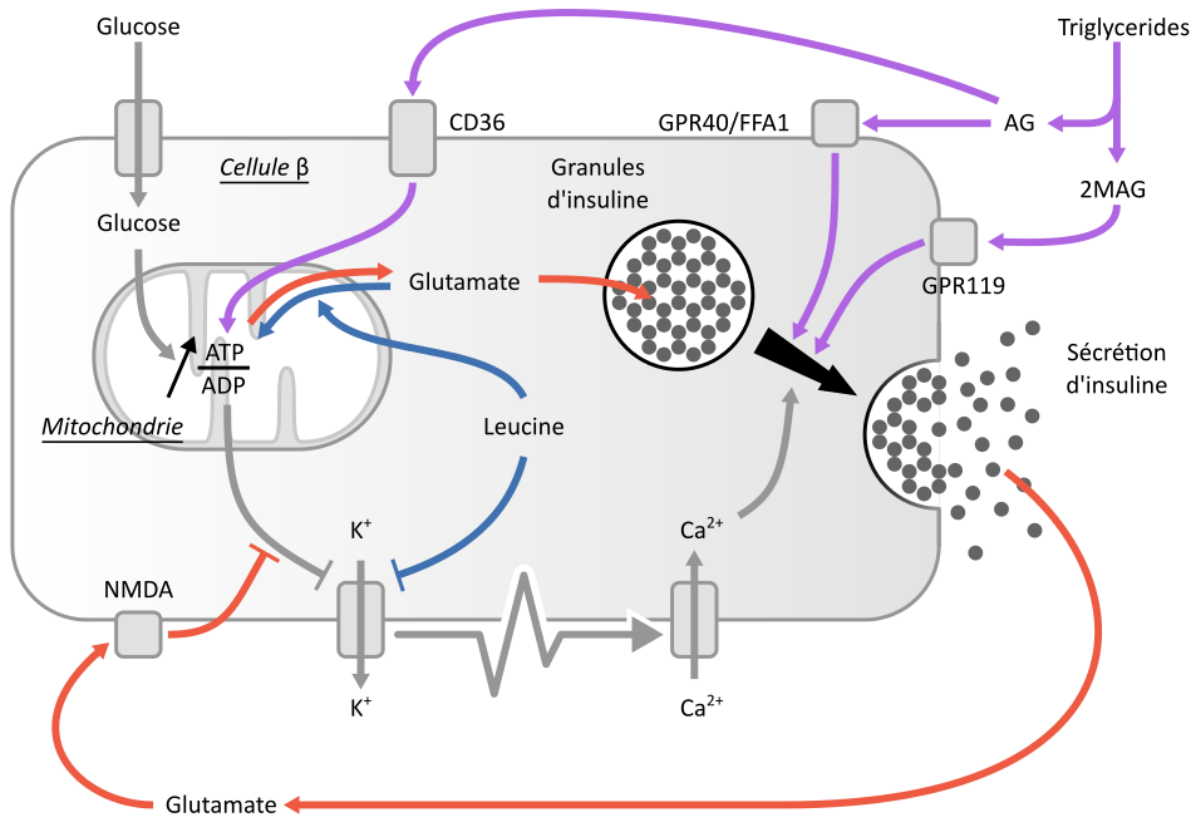
Certains acides aminés induisent ou potentialisent la sécrétion d'insuline de par le rôle de cofacteurs. Le glutamate est l'acide aminé le plus étudié comme facteur de couplage à la sécrétion d'insuline (Jitrapakdee et al., 2010; Maechler and Wollheim, 1999). En conditions spécifiques de perméabilisation membranaire et en présence de  $Ca^{2+}$ , le glutamate est décrit comme étant capable déclencher la sécrétion d'insuline *in vitro* (Høy et al., 2002; Maechler

and Wollheim, 1999). Malgré tout, son utilisation comme substrat énergétique carboné nécessaire à la sécrétion d'insuline est de nos jours encore discuté. En effet celui-ci a été décrit seulement comme un cofacteur de la sécrétion d'insuline agissant en aval de la mitochondrie (Maechler and Wollheim, 1999). De plus, des études de métabolomique plus récentes ont décrit une augmentation de la concentration intracellulaire de glutamate lors de la stimulation au glucose dans des modèles cellulaires (Gheni et al., 2014; Spéjel et al., 2015), d'îlots murins (Gheni et al., 2014; Spéjel et al., 2015) ou humains (Li et al., 2013). Cette augmentation est permise grâce à la glutamate déshydrogénase (GDH), catalysant dans les cellules  $\beta$  la formation de glutamate à partir d' $\alpha$ -ketoglutarate (un substrat du cycle de l'acide citrique) (Broca et al., 2003). La suppression de cette enzyme dans les cellules  $\beta$  de souris induit une diminution de la sécrétion d'insuline par un facteur 2 (Vetterli et al., 2012). La surexpression de GDH dans les INS-1E rend possible le déclenchement de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation de glutamine (Carobbio et al., 2004). Ces observations soulignent l'importance du glutamate en tant que cofacteur de la sécrétion en réponse au glucose en plus de mettre en avant l'importance de la régulation fine de la GDH pour éviter que les acides aminés comme la glutamine soient des sécrétagogues efficaces inappropriés. Le glutamate aurait un autre rôle à jouer dans les granules d'insuline permettant sa sécrétion. L'entrée et la sortie de glutamate dans les granules d'insuline est permise par vesicular glutamate transporters 3 (VGLUT3) et excitatory amino acid transporters (EAATs) respectivement. La modulation de l'expression de ces protéines induit la perturbation du flux de glutamate à l'intérieur des granules d'insuline réduisant la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques (Gammelsaeter et al., 2011). L'entrée du glutamate dans les granules d'insuline permet l'augmentation du pH (Eto et al., 2003), rendant ces granules compétents permettant la sécrétion d'insuline (Gammelsaeter et al., 2011; Høy et al., 2002). Ces observations sont une explication à l'implication de l'augmentation du glutamate intracellulaire lors de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Mais le glutamate a aussi un effet inattendu en fonction de sa localisation. En effet, s'il est extracellulaire, cet acide aminé est décrit comme inhibant la sécrétion d'insuline. L'activation du récepteur N-méthyl-d-aspartate (NMDA) des cellules  $\beta$  par le glutamate induit la réactivation du  $K_{ATP}$ , la repolarisation de la membrane plasmique, la régulation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire, diminuant l'exocytose des granules d'insuline (Marquard et al., 2015) (Figure 7). Finalement, le glutamate est décrit comme jouant un double rôle dans la

sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques en fonction de sa localisation. Au niveau intracellulaire, ce métabolite permet de rendre les granules d'insuline compétentes, permettant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Suite à cette sécrétion, le glutamate, contenu auparavant dans les granules d'insuline, devient extracellulaire et agit sur les récepteurs NMDA induisant un rétrocontrôle négatif stoppant la sécrétion d'insuline (Maechler, 2017).

Un autre acide aminé est décrit comme permettant le déclenchement de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  : la leucine. En effet, une forme non métabolisable de la leucine, le 2-aminobicyclo(2,2,1)heptane-2-carboxylic acid, est montrée comme stimulant la sécrétion d'insuline via l'activation des GDH dans le sens inverse de celui vu jusque-là, de la formation d' $\alpha$ -ketoglutarate à partir de glutamate (Gylfe, 1976; Sener et al., 1981; Sener and Malaisse, 1980). La glutamine peut alors alimenter le cycle de l'acide citrique en formant du glutamate, puis de l' $\alpha$ -ketoglutarate permettant d'alimenter la chaîne oxydative, augmentant la balance ATP/ADP induisant la sécrétion d'insuline (Pongratz et al., 2007) (Figure 7). La leucine a aussi une autre fonction que la modulation de l'activité de la GDH. En effet, la leucine, ou son analogue transaminé, l' $\alpha$ -ketoisocaproate, sont montrés comme régulant le  $K_{ATP}$ , augmentant l'entrée du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et permettant la sécrétion d'insuline (Henquin et al., 1994; Straub and Sharp, 2007). De manière intéressante, la leucine est capable de permettre la sécrétion d'insuline dans plusieurs modèles où la stimulation au glucose est diminuée comme dans des îlots de souris BTBR (Rabaglia et al., 2005) ou ob/ob (Bränström et al., 1998) (Figure 7).





**Figure 7 : Autres facteurs métaboliques stimulant la sécrétion d'insuline.**

Schéma représentant l'implication d'autres facteurs métabolique stimulant la sécrétion d'insuline. L'implication du glutamate est représentée en rouge, de la leucine en bleu et des triglycérides en violet. En gris est représentée la séquence d'évènements impliqués dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, NMDA : récepteurs à acide N-méthyl-D-aspartique, AG : acides gras, 2MAG : sn-2 monoacylglycerol, GPR40/FFA1 : récepteur 1 aux acides gras libres, CD36 : cluster de différenciation 36, GPR119 : récepteur 119 couplé aux protéines G.

Ces observations décrivent le glutamate et la leucine comme des cofacteurs nécessaires à la sécrétion d'insuline qui, dans certaines conditions, peuvent se substituer au glucose, devenant des sécrétagogues efficaces à la sécrétion d'insuline. L'étude de ces métabolites dans le cadre de la sécrétion d'insuline laisse espérer de nouvelles stratégies de prévention ou traitement de maladies liées au défaut de sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques (Marquard et al., 2015; Yang et al., 2010).

Les acides aminés ne sont en revanche pas les seuls métabolites autre que le glucose capable d'induire la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Les acides gras sont eux aussi des sécrétagogues efficaces de par leur implication à plusieurs niveaux dans le processus de sécrétion de l'insuline. Tout d'abord, les acides gras extracellulaires potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. En effet, dans les capillaires pancréatiques, les triglycérides sont clivés en 2-monoacylglycérol (2MAG) et acides gras (Cruz et al., 2001; Marshall et al., 1999; Nyrén et al., 2012; Winzell et al., 2006). Le 2MAG a la capacité d'interagir avec le G-Protein Coupled Receptor 119 (GPR119) des cellules  $\beta$  pancréatiques (Moran et al., 2014). Ces interactions augmentent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'utilisation d'agonistes du récepteur free fatty acid 1 Receptor (GPR40 ou FFA 1 R), normalement activé directement par les acides gras (Husted et al., 2017), augmente aussi la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques (Itoh et al., 2003). L'activation pharmacologique de GPR40 est de plus proposée comme thérapie potentialisant la sécrétion d'insuline dans les cas de diabète de type 2 (Mancini et al., 2015) car il est impliqué dans l'exocytose des granules d'insuline (Graciano et al., 2013; Hauge et al., 2015). Finalement, l'ablation ou la mutation ponctuelle de ce récepteur chez des souris inhibe la sécrétion d'insuline en réponse aux acides gras (FASIS) sans pour autant inhiber la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Sabrautzki et al., 2017). Ces deux voies de stimulation de la sécrétion d'insuline sont dites  $K_{ATP}$  indépendantes (Figure 7). Mais les acides gras peuvent aussi être transloqués dans la cellule  $\beta$  par les transporteurs CD36 (Khan and Kowluru, 2018). Des expériences sans glucose ont montré une augmentation de la respiration dans des îlots humains perfusés avec des acides gras signifiant que ceux-ci sont capables d'induire la production d'ATP en alimentant le cycle de l'acide citrique suite à la  $\beta$ -oxydation (Cen et al., 2016). Cette voie aura pour effet d'augmenter la balance ATP/ADP stimulant la sécrétion d'insuline de manière  $K_{ATP}$  dépendante (Figure 7).

Finalement, les triglycérides sont des nutriments également capables d'induire la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques appelé FASIS (Ježek et al., 2018b) de manière  $K_{ATP}$  dépendante et indépendante. En période post-prandiale, la quantité d'acides gras dans la circulation augmente, induisant la FASIS augmentant la sécrétion d'insuline (Figure 7).

En plus de facteurs métaboliques, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose nécessite des cofacteurs sous forme ionique.

### **Le $Ca^{2+}$ et la communication entre RE et mitochondries sont nécessaires à la sécrétion d'insuline**

Dans les années 1940 il a été observé qu'en absence de  $Ca^{2+}$ , la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  est inhibée (Wollheim and Sharp, 1981) mettant en avant l'importance de l'étude de cet ion et des conséquences du dérèglement des transferts calciques pour comprendre la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

### **Le stockage du $Ca^{2+}$ est permis grâce au RE**

Le RE est un organite présent dans toutes les cellules eucaryotes. Celui-ci s'étend dans l'intégralité du cytosol sous forme de saccules et tubules occupant en moyenne 9% du volume total de la cellule (Alberts et al., 1997; Chen et al., 2013). Le réticulum endoplasmique est délimité par une membrane permettant l'apparition d'une lumière en son sein. Celui-ci peut aussi par le biais d'extensions tubulaires communiquer avec d'autres organites présents dans la cellule telle que la mitochondrie, la membrane plasmique, en permettant des échanges interorganites de lipides et de  $Ca^{2+}$  (Wang and Dehesh, 2018). Différents types de réticulums sont présents dans les cellules eucaryotes : le réticulum endoplasmique lisse (REL) et rugueux (RER). Le RER est généralement proche du noyau de la cellule et est recouvert de ribosomes sur sa membrane du côté cytoplasmique (lui donnant son aspect rugueux en microscopie électronique à transmission) contrairement au REL, plus éloigné du noyau et sans ribosome à sa surface. Dans les cellules  $\beta$ , le RE est très présent et majoritairement composé de RER afin de répondre à la demande massive de production d'insuline comme vue précédemment.

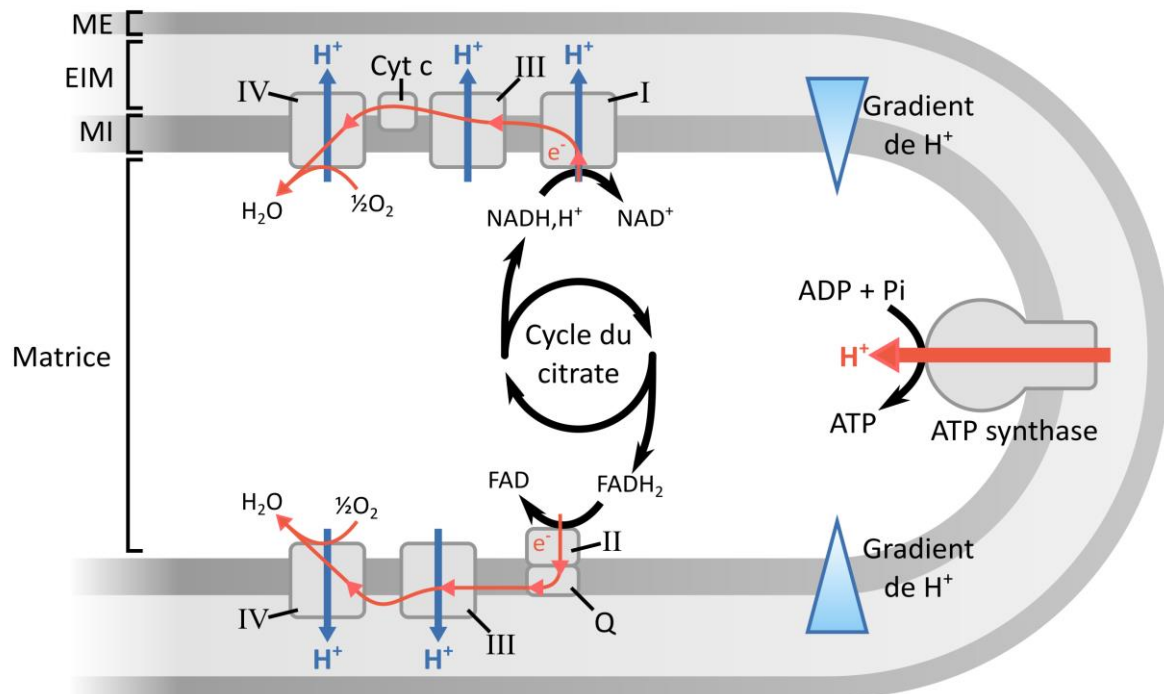
En plus de son rôle majeur dans la biosynthèse des protéines, le RE participe à l'homéostasie calcique comme centre de stockage de  $Ca^{2+}$ . De fines diminutions de la concentration intraréticulaire de cet ion sont associées avec des dysfonctions cellulaires telles que

l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la sénescence (Wiel et al., 2014). Les flux calciques du RE sont finement régulés par plusieurs transporteurs nécessaires à la sécrétion régulée d'insuline (Cassel et al., 2016).

### **Renouvellement de l'ATP et $\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial**

La mitochondrie est un organite aussi présent dans toutes les cellules eucaryotes. Elles ont un diamètre compris entre 0,4 à 1  $\mu\text{m}$  ainsi qu'une structure particulière constituée d'une double membrane séparant le cytoplasme de la matrice mitochondriale et constituant un espace intermembranaire nécessaire à ses fonctions (De Pinto et al., 2010; Ghadially, 2014). L'espace intermembranaire, la composition et la perméabilité différente entre les membranes internes et externes sont indispensables à la phosphorylation oxydative.

La phosphorylation oxydative est un processus permettant la régénération de l'ATP à partir d'ADP dans la mitochondrie. Cette régénération est possible grâce à la libération d'électrons dans la chaîne respiratoire par l'oxydation de cofacteurs du cycle du citrate (décrit dans le chapitre III). Ces électrons suivent la chaîne de transport d'électrons causant une cascade de réactions libérant progressivement de l'énergie. Cette énergie est utilisée par des pompes à protons situées sur la membrane interne mitochondriale permettant le passage de protons situés dans la matrice à l'espace intermembranaire conduisant à la formation d'un gradient de protons au niveau de la membrane interne mitochondriale. Le reflux de ces protons par l'ATP synthase permet à celle-ci de régénérer l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Figure 8).



**Figure 8 : La phosphorylation oxydative permet le renouvellement de l'ATP par la mitochondrie.**

Schéma représentant l'implication de la chaîne respiratoire dans la mise en place du gradient de protons permettant la production d'ATP. ME : membrane extracellulaire, EIM : espace inter membranaire, MI : membrane interne, I, II, III, IV : complexes I, II, III, IV de la chaîne respiratoire, ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique, H<sup>+</sup> : hydrogène, e<sup>-</sup> : électron, NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide, NADH,H<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, FAD : flavine adénine dinucléotide, FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide réduite.

L'apparition de sondes calciques mitochondriales a permis l'émergence d'études de l'influence du  $\text{Ca}^{2+}$  sur cet organe à l'instar du cytosol et du réticulum endoplasmique (Palmer et al., 2006). Ces flux calciques mitochondriaux sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires comme la régulation de l'apoptose, le métabolisme et encore la production d'ATP par la phosphorylation oxydative (Mammucari et al., 2018; Takeuchi et al., 2015). La mitochondrie est capable de répondre rapidement à des modulations de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme grâce à plusieurs transporteurs : voltage dependent anion channel (VDAC), permettant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'espace intermembranaire et le mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU) permettant son passage de l'espace intermembranaire à la matrice mitochondriale. VDAC est un transporteur mitochondrial existant sous 3 isoformes. Malgré cela, VDAC1, isoforme la plus exprimée du transporteur, est aujourd'hui la plus étudiée (De Pinto et al., 2010). VDAC1 est permissif non seulement au  $\text{Ca}^{2+}$  mais permet aussi l'entrée de certains métabolites comme le pyruvate, l'ATP ou le  $\text{NADH,H}^+$  (Gincel et al., 2000; Rostovtseva and Colombini, 1997; Shoshan, 2017) et la diminution de son expression a permis de mettre en avant son implication dans la production d'ATP et l'apoptose (Abu-Hamad et al., 2006; Tajeddine et al., 2008). Le MCU quant à lui est situé sur la membrane interne de la mitochondrie et permet l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale.

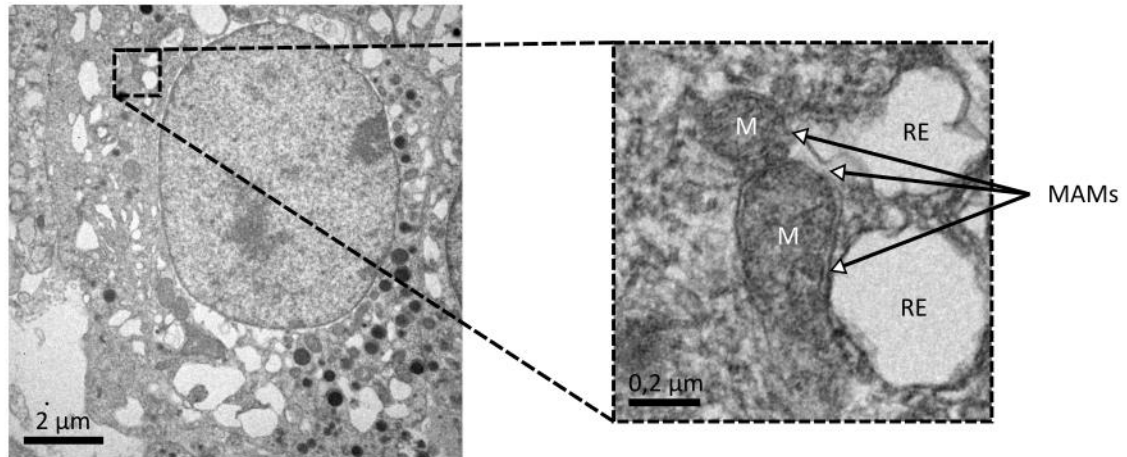
### **Les transferts calciques entre la mitochondrie et le RE sont nécessaires à la sécrétion régulée d'insuline**

Les transferts calciques entre le RE et la mitochondrie sont permis grâce aux MAMs (Mitochondria-Associated ER Membranes) (Csordás et al., 2006). Les MAMs sont des sites de contact entre la mitochondrie et le RE pour la première fois observée en 1952 et confirmée plus tardivement (Bernhard et al., 1952; Mannella et al., 1998; Meier et al., 1981; Perkins et al., 1997) (Figure 9A). Pour être considérée comme une MAM, la proximité de ces deux organites doit être inférieure à 50 nm mais ce point de contact est une apposition des membranes des deux organites et non pas une fusion entre ces deux organites (Csordás et al., 2006). Ces points de contact représentent environ 20% de la surface mitochondriale en fonction de la condition ou du type cellulaire (Bravo et al., 2011). De nombreuses protéines sont présentes aux MAMs permettant d'une part de maintenir le contact entre les deux organites mais aussi de permettre des échanges de métabolites, la biosynthèse lipidique, l'autophagie, la régulation du stress de ces organites ainsi que leur dynamique mais aussi des

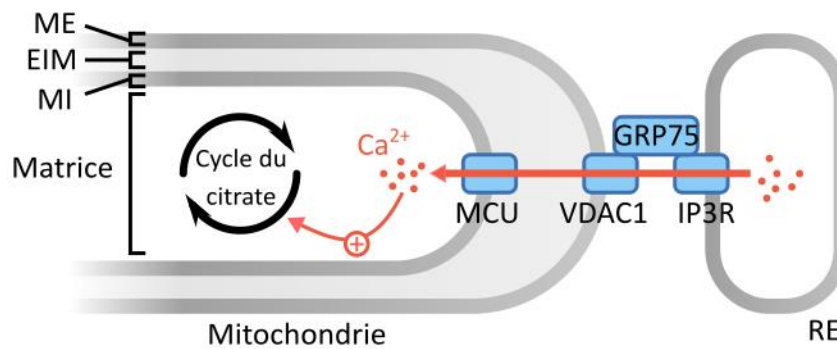
échanges calciques. Deux transporteurs permettent les échanges d'ions calciques entre le RE et la mitochondrie, l'un réticulaire : IP3R (Inositol 3 Phosphate Receptor) et l'autre mitochondrial : VDAC1 (Rizzuto et al., 1998). La présence d'une autre protéine chaperonne : GRP75 (Glucose Related Protein 75) est néanmoins nécessaire à l'association IP3R VDAC1 (Rizzuto et al., 2012). L'implication des MAMs dans la régulation calcique mitochondriale permet de réguler la production d'ATP mais des contacts trop proches ou chroniques peuvent mener à terme au déclenchement du signal apoptotique par la mitochondrie (Csordás et al., 2006) (Figure 9B).

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la sécrétion d'insuline en permettant la connexion entre le métabolisme et le ratio ATP/ADP nécessaire à la sécrétion d'insuline (Maechler and Wollheim, 2001). Des études sur des cellules  $\beta$  primaires uniques ont mis en évidence que les oscillations calciques permettent l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial ainsi que du ratio ATP/ADP dépendant de l'activité du MCU (Tarasov et al., 2013). De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la chaîne respiratoire (Hutton et al., 1980), du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial (Wiederkehr et al., 2011) ainsi que MCU (Tarasov et al., 2012) dans la sécrétion régulée d'insuline. De par leur grande importance dans la régulation mitochondriale, les MAMs sont impliquées dans la signalisation de l'insuline, le « sensing » et le contrôle du glucose (Herrera-Cruz and Simmen, 2017). En effet notre équipe a récemment démontré l'importance des MAMs dans l'action de l'insuline dans le foie (Tubbs et al., 2014), les muscles (Tubbs et al., 2018) et la résistance à l'insuline dans l'obésité et le diabète de type 2 que nous développerons dans le 3<sup>ème</sup> chapitre (Rieusset et al., 2016). De plus, en participant aux échanges calciques entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie, nous avons montré que les MAMs ainsi que leur intégrité sont nécessaires à la sécrétion régulée d'insuline en réponse au glucose (Dingreville et al., 2019).

A)



B)



**Figure 9 : Les MAMs permettent les transferts calciques entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries.**

A) Images d'une cellule  $\beta$  pancréatique en microscopie électronique à transmission ainsi qu'un zoom sur les interactions entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique appelées MAMs. B) Schéma représentant l'importance du complexe protéique VDAC1/IP3R, la chaperonne GRP75 et MCU dans la communication calcique entre le RE et la mitochondrie permettant l'augmentation du cycle du citrate. M : mitochondrie, RE : réticulum endoplasmique, MAMs : Mitochondria-Associated ER Membranes, ME : membrane extracellulaire, EIM : espace inter membranaire, MI : membrane interne, MCU : complexe de l'unipaire calcique mitochondrial, VDAC1 : canal anionique voltage-dépendent, GRP75 : protéine 75 kDa régulée par le glucose, IP3R : Récepteur de l'inositol trisphosphate.



Tous ces processus sont comme nous l'avons vu bien régulés afin de maintenir l'homéostasie glucidique dans le corps. Malgré tout, il arrive dans certains cas qu'un ou plusieurs acteurs de la sécrétion d'insuline ou de l'absorption du glucose dysfonctionne. Cette situation amène à la dérégulation de l'homéostasie glucidique appelé diabète. C'est de cette maladie que traitera le chapitre suivant.

# CHAPITRE II Le diabète et la cellule $\beta$ pancréatique

## PARTIE A Les diabètes de type 1 et 2

### II. A. 1 L'histoire du diabète

Le diabète est une maladie dont les symptômes sont rapportés depuis plusieurs millénaires. La polyurie est connue depuis l'Égypte ancienne, suivie par la découverte dès 500 ans avant JC du goût sucré de l'urine des personnes souffrant de diabète en Inde par les physiciens Charak et Sushrut. Des observations ont aussi été rapportées au VII<sup>ème</sup> siècle par Chen Chuan en Chine et au X<sup>ème</sup> siècle par Avicenne au Moyen-Orient. Charak et Sushrut ont aussi mis en évidence à l'époque que différents types de personnes touchées par cette maladie réagissaient différemment et nécessitaient des traitements différents. En effet, ils observèrent que les patients obèses ou en surpoids ayant une alimentation plus riche en gras et en sucre nécessitaient de l'exercice physique et une grande quantité de légumes dans leur régime. Au contraire, les personnes plus fines, chez qui la maladie était considérée comme plus sérieuse nécessitaient eux une alimentation plus riche. La polyurie a aussi été étudiée dans la Grèce antique par Aretaeus qui lui donna un nom : le diabète. Ce terme vient du mot grec διαβήτης, signifiant « passer au travers », car les patients souffrant de cette maladie urinaient juste après avoir bu (Ahmed, 2002; Tattersall, 2017).

A partir du XVII<sup>ème</sup> siècle, les connaissances sur le diabète se développent en Europe. Thomas Willis écrit *Diabetes, or the Pissing Evil* où il mentionne encore l'urine des patients comme ayant un goût sucré, pensant que cette maladie était si rare qu'aucun avant lui n'en avait fait mention. La première description de l'hyperglycémie fut mentionnée par Matthew Dobson au XVIII<sup>ème</sup> siècle qui observa que le sérum, comme l'urine des patients diabétiques, avait un goût sucré. Il en conclut que le sucre contenu dans les urines n'était pas formé dans les reins mais était déjà contenu dans le sang des patients souffrant de diabète. Au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, le chirurgien John Rollo pensait que la cause de l'hyperglycémie des diabétiques venait des légumes digérés dans l'estomac et popularisa un régime thérapeutique à base de viande animale, utilisé au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle. En 1673, Johann Brunner réalisa des pancréatectomies sur des chiens sur lesquels il observa le développement d'une polyurie. Il en déduit que le pancréas joue un rôle clé dans le développement de cette pathologie (Ahmed, 2002).

En 1815, le français Michel Chevreul démontra que le sucre contenu dans l'urine des diabétiques était du glucose. A partir de 1840, les travaux de Trommer, Moore et Fehling sur les tests de détection du glucose par des techniques de chimie permirent peu à peu l'abandon des tests urinaires par le goût. Malgré tout, la grande quantité de sang nécessaire aux techniques utilisées à l'époque ne permit pas leur utilisation dans un cadre médical (Tattersall, 2017). Des tests répétables et utilisables dans le milieu clinique ne furent développés qu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle par Ivar Christian Bang (Schmidt, 1986).

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, de nombreuses avancées ont permis de relier la pathologie du diabète aux îlots pancréatiques. Les travaux du français Claude Bernard, entre 1846 et 1848, ont permis la mise en évidence de l'importance du foie dans l'absorption du glucose circulant permettant sa régulation (Olmsted, 1953). Paul Langerhans, en 1869, décrit les îlots pancréatiques sans émettre d'hypothèse à propos de leur(s) éventuelle(s) fonction(s) dans le pancréas (Langerhans, 1869). En 1889, lors d'études sur le métabolisme des lipides, Joseph von Mering et Oskar Minkowski sont amenés à réaliser une pancréatectomie sur le chien, conduisant au développement d'une incontinence urinaire de l'animal. Cette polyurie leur donna l'idée de tester les urines de l'animal, révélant un diabète sévère (v. Mering and Minkowski, 1890) reliant l'absence de pancréas au développement du diabète. Cette même année, Charles-Edouard Brown-Sequard publia le concept de sécrétion interne du pancréas. En 1892, Emmanuel Hédon appuie les travaux de Minkowski et Von Mering en prévenant le développement du diabète suite à une pancréatectomie en greffant une glande pancréatique sous la peau des chiens confortant l'importance du pancréas dans le diabète (Karamitsos, 2011). Gustave Laguesse suggéra que les îlots pancréatiques, qu'il baptisa îlots de Langerhans, étaient à l'origine de la sécrétion pancréatique (Sims et al., 2021) nommée en 1909 ou en 1916 « insuline » par respectivement Jean de Meyer ou Edward Sharpy-Shafer respectivement (Vecchio et al., 2018).

C'est au XIX<sup>ème</sup> siècle que la plupart des complications liées au diabète sont décrites. Une première complication bien connue concerne une atteinte de la rétine. En 1869, Eduard Von Jaeger décrit pour la première fois une altération rétinienne sur un homme âgé de 22 ans ("Jaeger's Atlas of Diseases of the Ocular Fundus," 1972) suivit en 1879 par Stephen Mackenzie et Edward Nettleship qui découvrent des microanévrismes dans des préparations de rétines

(“Archive of ‘Transactions of the American Ophthalmological Society’ .,” n.d.). En 1890, Julius Hirschberg fut le premier à décrire une image complète d’une rétinopathie et à la relier spécifiquement au diabète (Hirschberg, 1890; Tattersall, 2017). D’autres complications associées à des syndromes neuropathiques furent mentionnées dès la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle par Rollo (Tattersall, 2017) et Charles Marchal de Calvi initia l’idée en 1864 que les dommages nerveux sont des complications spécifiques du diabète (Tattersall, 2017). Cette description fut étoffée plus tard par Frederick Pavy en 1885 (Pavy, 1885). Enfin, les maladies rénales ne furent reliées au diabète qu’à partir des années 1930 alors que dès 1859 une étude sur des cadavres avait indiqué un lien entre les altérations rénales et des maladies cardiovasculaires, aujourd’hui connues comme caractéristiques du diabète (Eknoyan, 2019). Et finalement en 1880, Etienne Lancereaux identifia que le diabète pouvait être caractérisé en 2 catégories qu’il appelait « diabète maigre » et « diabète gras » (Wright Jr. and McIntyre, 2020) renommés aujourd’hui en diabète de types 1 et 2.

La subdivision entre diabète de type 1 et 2 fut rediscutée par Wilhem Falta et Harnold Himsworth dans les années 1930 lorsqu’ils remarquèrent que certains individus diabétiques étaient plus sensibles à l’insuline contrairement à d’autres qui ne l’étaient peu ou pas du tout (Himsworth, 1936). La technique du clamp à insuline développée dans les années 70 par Ralph DeFronzo permit de tester l’action hypoglycémiante de l’insuline et d’étudier la résistance à l’insuline caractéristique du diabète de type 2 (DeFronzo et al., 1979). L’implication de l’autoimmunité dans le diabète de type 1 fut elle comprise à la fin des années 70 par Deborah Doniach et GianFranco Bottazzo (Bottazzo et al., 1974). En 1967, Paul Lacy remarqua qu’il était possible de transplanter des îlots pancréatiques chez des rats pour traiter leur diabète (Tattersall, 2017). Cette étude reprise dans les années 2000 par une équipe Canadienne permit de développer un protocole d’isolation d’îlots pancréatiques (Shapiro et al., 2000) ouvrant la voie à d’autres études montrant que des individus transplantés avec des îlots pancréatiques pouvaient à nouveau sécréter de l’insuline, mais seuls 10% d’entre eux pouvaient se passer d’insuline exogène (Ryan et al., 2005).

Finalement, le diabète, une maladie identifiée depuis des siècles, reste encore aujourd’hui presque incurable. Pourtant c’est aujourd’hui une maladie qui prend un essor considérable chez l’Homme de part la surnutrition et la sédentarité croissante de la population mondiale.

## **II. A. 2 Le diabète, un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale**

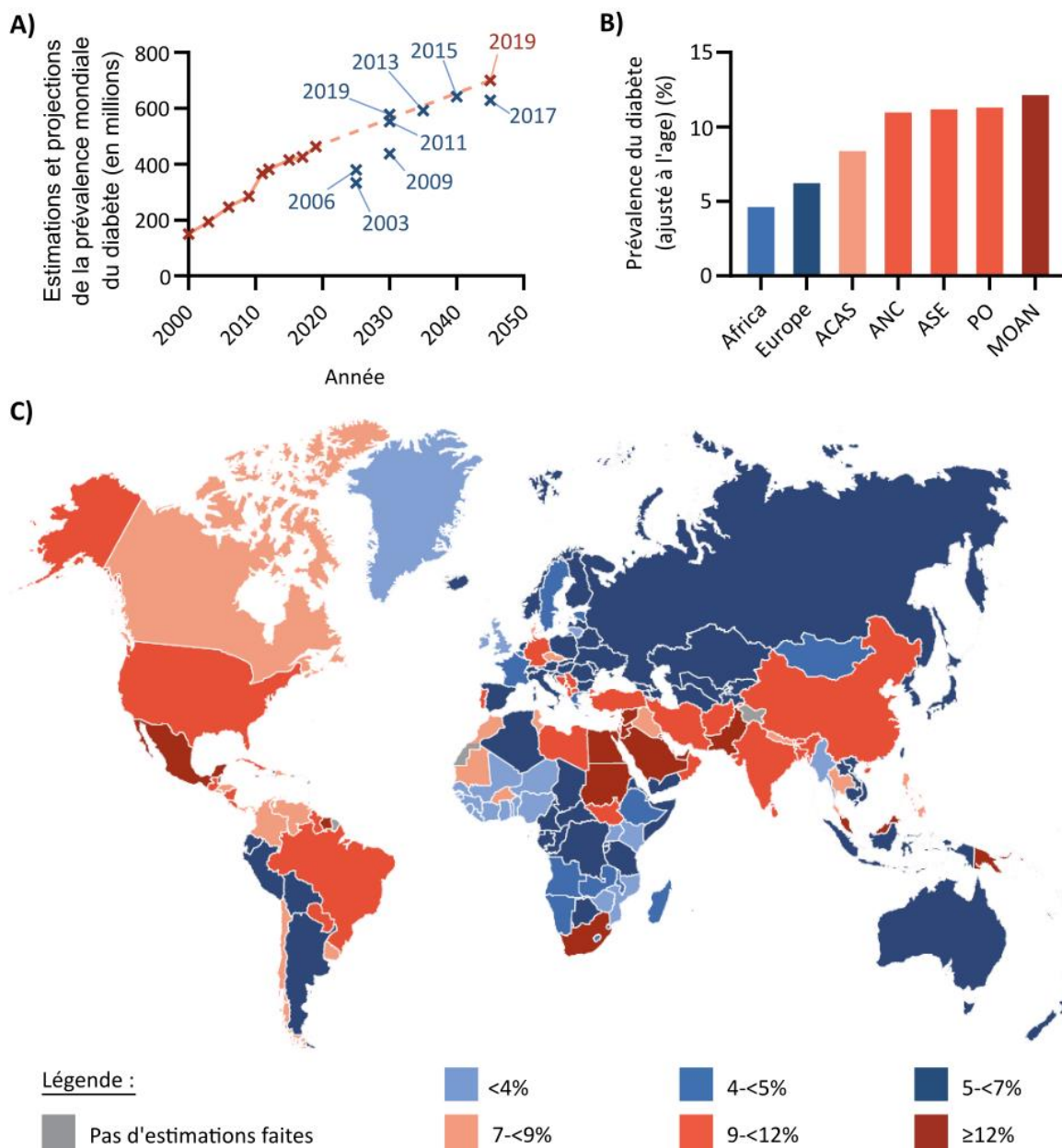
En 2019, le diabète touchait plus de 463 millions d'adultes dans le monde, soit environ de 9,3% de prévalence pour les 20-79 ans (Figure 10). De plus, la fédération internationale du diabète estime à plus de 50% les personnes souffrant de diabète non diagnostiqué. Ces chiffres sont en augmentation depuis 2010 où le diabète touchait 280 millions d'adultes avec une prévalence de 6,3% pour les 20-79 ans. Selon ce même organisme, la prévalence diabète augmente continuellement depuis les années 2000 et pourrait concerner 700 millions de personnes d'ici 2045. De manière inquiétante, ces estimations sont constamment revues à la hausse depuis les années 2000 ("IDF Atlas 9th edition and other resources," n.d.) (Figure 10A).

Les facteurs sociodémographiques ont des implications dans la prévalence du diabète. En effet, le diabète touche tous les âges mais a une prévalence qui augmente avec ce paramètre. On estime que cette maladie touche 1% à 4% des moins de 35 ans et jusqu'à 15% à presque 20% des 55 ans et plus. La prévalence du diabète est aussi affectée par le sexe de l'individu touchant légèrement plus les hommes que les femmes (9% de femmes contre 9,6% d'hommes). Le cadre de vie impacte aussi la prévalence de cette maladie touchant plus les zones urbanisées que les zones rurales avec respectivement 10,8% et 7,2% de prévalence ("IDF Atlas 9th edition and other resources," n.d.).

A l'instar des disparités géographiques à l'échelle régionale, le diabète a aussi une disparité géographique à l'échelle mondiale. Le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord, le Pacifique Occidental, l'Asie du Sud Est et l'Amérique du Nord et les Caraïbes ont une prévalence du diabète ajustée en fonction de l'âge de plus de 10%. Au contraire, la région d'Afrique subsaharienne, avec une prévalence de moins de 5%, est la région du monde la moins impactée par le diabète. Cette faible prévalence peut s'expliquer par différents facteurs : la malnutrition, un sous-diagnostic, des morts prématurées par l'absence d'accès à l'insuline ainsi qu'à une urbanisation moins importante que dans le reste du globe ("IDF Atlas 9th edition and other resources," n.d.) (Figure 10B et 10C).

Cette maladie est donc un problème de santé publique à l'échelle mondiale avec presque 10% des adultes âgés de 20 à 79 ans concernés. Mieux comprendre cette maladie est d'une

importance capitale en vue de prévenir mais aussi de mettre au point de nouveaux traitements ainsi que de comprendre l'action des traitements existants.



**Figure 10 : Le diabète est un problème majeur et grandissant de santé publique à l'échelle globale.**

A) Estimations et projections de la prévalence mondiale du diabète dans la tranche d'âge de 20 à 79 ans (en millions). Les années affichées représentent les dates auxquelles l'estimation correspondante a été faite. B) Prévalences géographiques comparatives du diabète en 2019 ajustées en fonction de l'âge. ACAS : Amérique Centrale et Amérique du Sud, ANC : Amérique du Nord et Caraïbes, ASE : Asie du Sud Est, PO : Pacifique Ouest, MOAN : Moyen-Orient et Afrique du Nord. C) Prévalence comparative estimée du diabète chez les adultes (20 à 79 ans) en 2019 ajustée en fonction de l'âge. L'ajustement en fonction de l'âge permet de comparer des zones géographiques entre elles. Étant donné que la prévalence du diabète augmente avec l'âge, les estimations brutes quant à la prévalence ne peuvent pas être utilisées pour comparer la prévalence du diabète entre des pays dont la répartition par âge est différente. Tous les chiffres sont issus de l'International Diabetes Federation ("IDF Atlas 9th edition and other resources," n.d.).

### **II. A. 3 Qu'est ce que le diabète ?**

Le diabète sucré est une maladie chronique caractérisée par la présence d'un excès de sucre dans le sang appelé hyperglycémie (Kaul et al., 2012). L'hyperglycémie est liée à une sécrétion insuffisante ou inefficace d'insuline. Cette insuffisance est associée à l'altération des cellules  $\beta$  pancréatiques lorsque l'inefficacité est reliée à l'insulino-résistance des tissus cibles. Si cette insuffisance est non prise en charge et traitée, elle est dite chronique. Le diabète est avéré si le taux de glycémie à jeun est égal ou supérieur à 1,26 g/L ou 7 mmol/L de sang lors de deux dosages successifs.

Les 2 principaux types de diabète, représentant 98% des différents diabètes, sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2 décrits dans les parties ci-après. Ces deux pathologies sont dues à des dysfonctionnements différents. Les autres types de diabète (maturity onset diabetes of the young (MODY), latent autoimmune diabetes in adults (LADA) ou diabète secondaire à certaines maladies ou prises de médicaments) sont minoritaires et concernent les 2 % restants.

#### **II. A. 3.1 Le diabète de type 1 ou auto-immun**

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune induisant la perte des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques (Katsarou et al., 2017; Wolkowicz et al., 2021) le plus souvent diagnostiquée chez l'enfant (Ashcroft and Rorsman, 2012). La production d'insuline par les îlots étant trop faible voire inexistante, les patients souffrant de diabète de type 1 requièrent une thérapie quotidienne nécessitant une source exogène d'insuline en vue de réguler l'homéostasie glucidique et d'éviter des complications métaboliques ou des dommages tissulaires et organiques (Davis et al., 2017; Mobasseri et al., 2020; Wolkowicz et al., 2021). Le diabète de type 1 représente entre 5% et 15% de tous les cas de diabètes (Katsarou et al., 2017; Mobasseri et al., 2020).

#### **II. A. 3.2 Le diabète de type 2**

Le diabète de type 2 (DT2) est la forme la plus courante de la maladie (Ashcroft and Rorsman, 2012) représentant 80% à 90% des cas de diabète. Le DT2 est décrit comme causant des anomalies dans le métabolisme des lipides et des carbohydrates (Scheen, 2003) ne

permettant pas une régulation glucidique efficace de l'organisme. En plus des facteurs décrits précédemment, le mode de vie et des prédispositions génétiques influencent la prévalence de cette maladie (Ashcroft and Rorsman, 2012; Kaul and Ali, 2016; Sun et al., 2014). En effet, l'inactivité physique et une alimentation trop riche en sucres et en graisses augmentent considérablement le risque d'apparition de la maladie, expliquant sa plus forte prévalence dans certaines régions du monde (Ashcroft and Rorsman, 2012; Eaton and Eaton, 2017; Fletcher et al., 2002) et faisant de l'obésité un des principaux facteurs de risque conduisant au développement du DT2 (Toplak et al., 2016) (Figure 11). L'influence du mode de vie Américain, conciliant une mauvaise habitude alimentaire et peu d'exercice physique semble induire une plus forte prévalence du DT2 dans certaines populations minoritaires par rapport à la population générale (Fletcher et al., 2002). Concernant le risque génétique, plus de 400 variants géniques sont associés à cette pathologie (Meigs, 2019). Il est néanmoins encore difficile d'obtenir des profils génétiques permettant de détecter efficacement les populations à risques et l'indice de masse corporelle reste un très bon indicateur (Meigs, 2019).

Comme décrit au chapitre I, la régulation du glucose est permise par les cellules  $\beta$  sécrétant l'insuline et les tissus périphériques permettant l'absorption du glucose circulant. Ces deux acteurs majeurs de l'homéostasie glucidique peuvent dysfonctionner lors du DT2. Bien que ma thèse traite plus particulièrement de la cellule  $\beta$ , je tenais quand même à présenter succinctement le dérèglement de l'absorption du glucose par les tissus périphériques et ses conséquences.

### **L'insulino-résistance des tissus périphériques au cours du DT2**

Comme décrit précédemment, l'insuline induit l'absorption du glucose circulant par les tissus périphériques permettant la diminution de la glycémie. Un excès nutritionnel chronique ou l'obésité vont induire une insulino-résistance, c'est-à-dire une atténuation de la sensibilité à l'insuline, des tissus périphériques comme le foie, les muscles squelettiques et les adipocytes (Czech, 2017) (Figure 11). Cette insulino-résistance va réduire la capacité de ces organes à stocker le glucose circulant (Petersen and Shulman, 2018). Ce dérèglement ne cause pas forcément d'hyperglycémie car les cellules  $\beta$  vont essayer de compenser en sécrétant toujours plus d'insuline, augmentant la quantité d'insuline circulante à jeun (Czech, 2017; Kahn, 2003). De ce fait un DT2 peut ne pas être diagnostiqué pendant plusieurs années par le simple dosage



du glucose circulant (Martin et al., 1992; Reaven, 2005). Cet état d'hypersécrétion des cellules  $\beta$  conduit à leur épuisement et/ou à leur mort (Prentki and Nolan, 2006) induisant la perte de 25% à plus de 50% de la masse de cellules  $\beta$  lors d'un DT2 (Butler et al., 2003; Rahier et al., 2008).

### **Les complications au cours du DT2**

En plus de causer une dérégulation glycémique, le DT2 peut causer diverses complications (Goyal and Jialal, 2021, p. 20). Certaines sont dites aiguës, telles que l'hyperglycémie, l'hypoglycémie, l'acidocétose diabétique caractérisée par une acidification excessive du sang, un état hyperosmolaire hyperglycémique dû à une déshydratation excessive, ces altérations peuvent conduire à un coma hyperglycémique voire à la mort (Adeyinka and Kondamudi, 2021; Goyal and Jialal, 2021). D'autres altérations dues au DT2 sont chroniques et se déclarent à plus ou moins long terme. Les hyperglycémies répétées et prolongées entraînent une altération des nerfs et des vaisseaux sanguins présents dans tout le corps. Ces complications liées au diabète peuvent se traduire par l'augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires, des rétinopathies pouvant entraîner la cécité, des néphropathies et des neuropathies (Goyal and Jialal, 2021; Liakopoulos et al., 2019; Patoulias et al., 2020).

Le diabète est une maladie à ne pas prendre à la légère et la compréhension de la mise en place de l'insulino-résistance des tissus périphériques ainsi que le dysfonctionnement de la cellule  $\beta$  au cours de cette pathologie est capitale pour la recherche. Nous allons maintenant traiter du dysfonctionnement de la cellule  $\beta$  pancréatique.

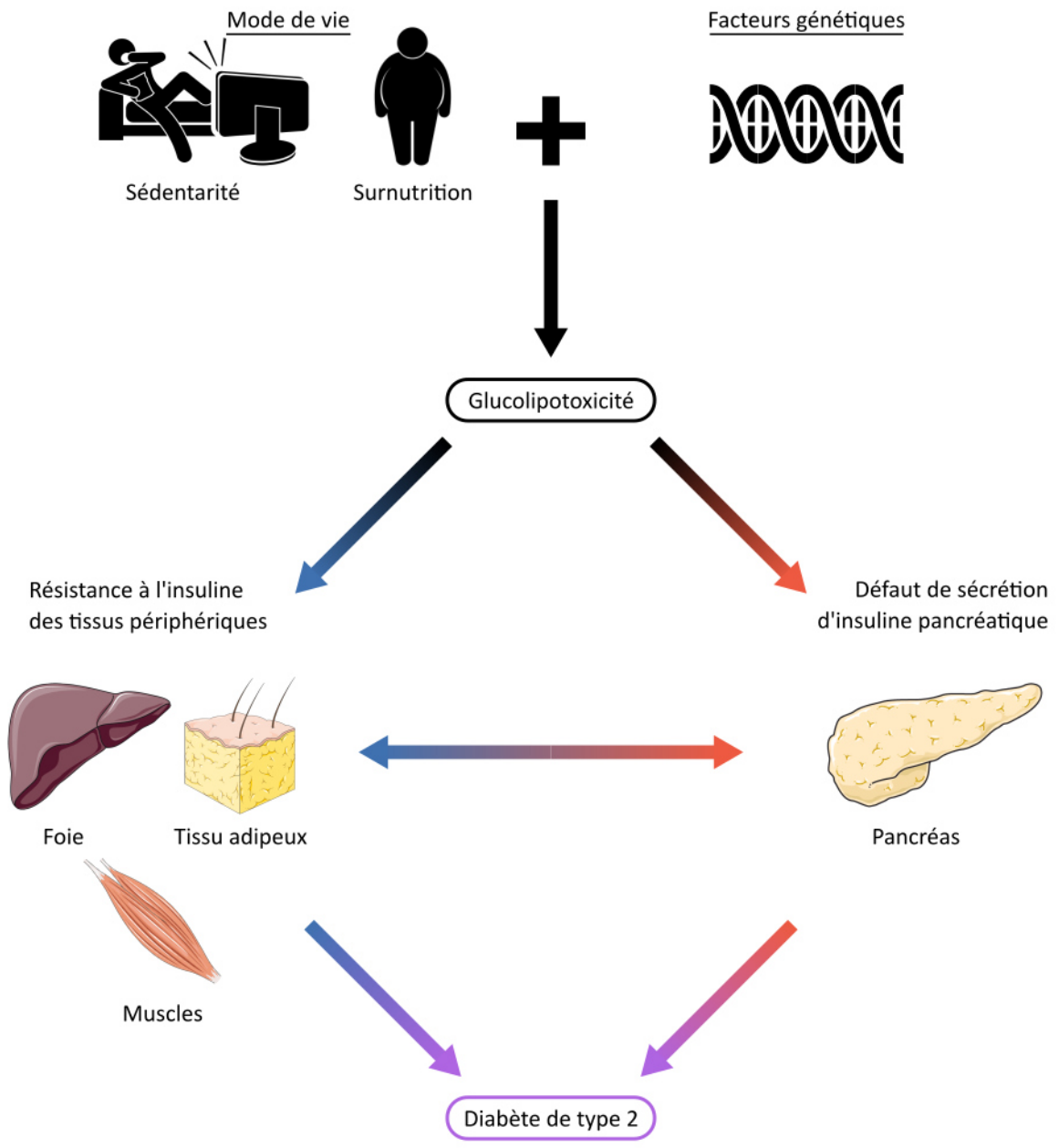


Figure 11: La glucolipotoxicité et son implication dans le développement du diabète de type 2.

## **PARTIE B Dysfonction de la cellule $\beta$**

La cellule  $\beta$  peut subir différentes altérations menant au défaut de sécrétion d'insuline du pancréas lors d'un DT2. En effet les cellules  $\beta$  peuvent subir une apoptose ou une perte de fonction, pouvant être liée à une dédifférenciation ou d'autres problèmes métaboliques, couramment reliés à la glucolipotoxicité. Cette toxicité est caractérisée par une exposition chronique à de fortes quantités de glucose et lipides circulants. Dans cette partie je décris de manière non-exhaustive les principales altérations des îlots et des cellules  $\beta$  elles-mêmes en lien avec la gluco- et/ou lipotoxicité.

### **II. B. 1 La glucolipotoxicité est une combinaison de la gluco- et de la lipotoxicité**

L'hyperglycémie chronique induit une suractivation persistante du métabolisme du glucose. Cette situation, pouvant devenir toxique pour les cellules  $\beta$ , est appelée glucotoxicité (Bensellam et al., 2012). Ce terme désigne un effet délétère supposé irréversible caractérisé par un défaut fonctionnel des cellules  $\beta$  (van Raalte and Diamant, 2011). Plusieurs mécanismes ont été décrits pour mener à cet état de glucotoxicité et il n'existe pas réellement de consensus sur le temps ou la concentration de glucose à utiliser *in vitro* pour mener à cet effet.

Lorsque l'insulinorésistance s'installe, le taux élevé d'acide gras libres plasmatiques induit une augmentation de la quantité de cellules  $\beta$  en vue de compenser la résistance à l'insuline des tissus périphériques (Oh et al., 2018). Mais lorsque cette surexposition aux acides gras libres devient chronique, elle résulte en une perturbation du métabolisme lipidique impactant la fonction mais aussi la viabilité des cellules  $\beta$  (Ježek et al., 2018b; Oh et al., 2018). Cet état est décrit comme étant la lipotoxicité. Tout comme la glucotoxicité, il n'existe pas de consensus quant à la durée, la quantité ou le type d'acide gras à utiliser en vue de générer une lipotoxicité.

En effet, certaines études ont montré que plus l'état de saturation de l'acide gras est élevé et plus celui-ci sera délétère pour la sécrétion d'insuline. L'acide gras ayant le plus d'effet sur la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  est le palmitate (C16 : 0), c'est pour cette raison qu'il est le plus utilisé *in vitro* en vue d'induire la lipotoxicité (Acosta-Montaño et al., 2019; Oh et al.,

2018). D'autres acides gras saturés comme le myristate (C14 : 0) ou le laurate (C12 : 0) sont moins utilisés en recherche car moins impactant pour la sécrétion d'insuline (Acosta-Montaño et al., 2019; Oh et al., 2018). Des acides gras insaturés ont aussi été décrits comme ayant des effets stimulateurs de la prolifération et protecteur de la fonction des cellules  $\beta$  *in vitro*. Par exemple, l'acide arachidonique (C20 : 4) qui en plus d'augmenter la prolifération stimule la sécrétion d'insuline des cellules BRIN-BD11, une lignée hybride formée par la fusion de cellules primaires d'îlots pancréatiques et de RIN-m5F issues d'un insulinome de rat) (Keane et al., 2011) ou encore l'oléate (C18 : 1) qui protège *in vitro* les cellules RIN-m5F, INS-1E, EndoC- $\beta$ H1 ainsi que les îlots pancréatiques de rats, contre les effets délétères du palmitate (Acosta-Montaño et al., 2019; Brelje et al., 2008; Plötz et al., 2017; Sommerweiss et al., 2013).

Malgré cela, certaines études ont remarqué que l'activation dans les cellules  $\beta$  INS-1E de PPAR $\delta$ , un récepteur nucléaire contrôlant notamment la prolifération et l'apoptose, par des doses plus faibles d'acides gras, pouvait augmenter la sécrétion d'insuline (Cohen et al., 2015).

De plus, une récente revue de Weir remet en cause l'effet toxique direct des acides gras sur les cellules  $\beta$  dans les conditions de DT2 (Weir, 2020). Plusieurs arguments comme le type d'acides gras utilisés dans les expérimentations *in vitro*, la quantité de ceux-ci liés à l'albumine ou libre dans un contexte *in vivo* ou encore la concentration réelle de ces acides gras libres entourant la membrane plasmique des cellules  $\beta$  chez les patients obèses ou diabétiques ne permet pas de conclure formellement sur l'existence d'une lipotoxicité impactant les cellules  $\beta$  lors du développement du DT2 (Weir, 2020).

## **II. B. 2 La gluco-lipotoxicité cause des altérations au niveau physiologique**

### **II. B. 2.1 L'inflammation des îlots pancréatiques réduit la fonction des cellules $\beta$**

Au cours du DT2, une diminution de la masse de cellules  $\beta$  est rapportée. Certaines études ont mis en évidence la production de cytokines pro-inflammatoires chez des patients obèses (King, 2008). L'expression de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines (IL) IL1 $\beta$ , IL8, IL11 mais aussi des chimiokines pro-inflammatoires ont été mises en évidence dans des coupes de pancréas et d'îlots pancréatiques de personnes souffrant de DT2 (Ehses et al., 2007; Mahdi et al., 2012, p. 2012; Marchetti, 2016; Marselli et al., 2010; Taneera et al., 2012). Ces

observations sont aussi étayées par l'observation d'une infiltration des îlots pancréatiques de donneurs diabétiques par des macrophages (Ehses et al., 2007; Marchetti, 2016). Des études similaires ont pu aussi être réalisées dans des modèles de rats diabétiques de type 2 (Homo-Delarche et al., 2006). Cette infiltration potentialise l'augmentation du niveau de cytokines à l'intérieur même des îlots de patient diabétiques de type 2 sans pour autant causer un défaut pathologique chez tous les patients (Eguchi and Nagai, 2017).

D'autres études démontrent que la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  par les îlots pancréatiques induit une réponse auto-immune par activation de la voie pro-inflammatoire Nuclear Factor kappa B (NFkB) conduisant à l'apoptose des cellules  $\beta$  appelée ici « apoptose autocrine » (Ikeda, 1994; Maedler et al., 2002). La lipotoxicité est impliquée dans le développement de cette dernière réponse auto-immune. En effet les acides gras induisent la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules  $\beta$  conduisant à la perte de leurs fonctions et/ou leur apoptose (Imai et al., 2016; Mukhuty et al., 2017). D'autres expériences avec des acides gras saturés ont mis en évidence la sécrétion de différentes interleukines, cytokines et chimiokines dans des îlots pancréatiques en plus de l'activation de pattern recognition receptors (PRR), des récepteurs de reconnaissance de pathogènes, dans les cellules  $\beta$ . L'activation de ces récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires déclenche la mobilisation de la voie NFkB, induisant la synthèse et la sécrétion d'interleukines, cytokines et chimiokines causant un cercle vicieux et amplifiant l'inflammation et le recrutement de cellules immunitaires dans les îlots pancréatiques (Cnop et al., 2014, p. 2014; Eguchi et al., 2012; Igoillo-Esteve et al., 2010). Finalement, le blocage de la voie NFkB dans des cellules MIN6 permet la diminution de la réponse auto-immune en condition de lipotoxicité, protégeant la fonction des cellules tout en inhibant leur apoptose (Zheng et al., 2017). Contrairement à la lipotoxicité, certaines études impliquant la glucotoxicité dans ces processus d'activation de l'immunité au sein des îlots pancréatiques sont actuellement controversées. En effet, l'invalidation de l'expression du récepteur de l'IL1, en amont de la réponse NFkB, n'est pas montrée comme protecteur contre la forte concentration de glucose chronique (McKenzie et al., 2010). De plus, les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires sont les résultantes des stress du RE et oxydatif pouvant déjà induire l'apoptose des cellules (Azevedo-Martins et al., 2003; Cnop et al., 2005, p. 2005; Welsh et al., 2005).

## II. B. 2.2 Diminution de la masse de cellules $\beta$

Comme nous avons pu le voir précédemment, lors d'un état diabétique, la gluco- et/ou la lipotoxicité peuvent conduire à l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques réduisant de facto la sécrétion d'insuline globale des îlots pancréatiques. Cette affirmation est confirmée par des études post-mortem sur des donneurs d'îlots diabétiques révélant d'une part de plus petits et moitié moins d'îlots pancréatiques en comparaison avec des donneurs sains (Deng et al., 2004). D'autre part, la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques provenant des îlots de donneurs diabétiques est inférieure à celle des cellules provenant des îlots de donneurs sains (Butler et al., 2016; Saisho et al., 2013) révélant une forte apoptose des cellules  $\beta$  au cours du DT2 (Butler et al., 2003). Ce peut aussi être en partie due à une plus grande fragilité de ces îlots lors de préparation qui augmenterait leur apoptose. Une étude de lipotoxicité rapporte qu'à forte concentration d'acides gras libres dans le cytoplasme de la cellule  $\beta$  pancréatique, des transporteurs mitochondriaux, comme le transporteur d'ADP/ATP, sont découplés pouvant ainsi induire l'apoptose des cellules (Ježek et al., 2010, 2018a, 2014).

Malgré ces observations, l'apoptose des cellules  $\beta$  n'est pas la seule explication à la diminution de la masse des cellules  $\beta$  au cours du DT2 (Christensen and Gannon, 2019). Plusieurs groupes suggèrent qu'une dédifférenciation des cellules  $\beta$  pourrait avoir un rôle important dans le développement du DT2 (Nordmann et al., 2017; Talchai et al., 2012; Weir et al., 2013). En effet, les cellules  $\beta$  expriment des facteurs de transcriptions particuliers leur permettant de garder leur identité de cellules  $\beta$  matures ainsi que leur capacité à produire et sécréter de l'insuline en réponse au glucose (Brereton et al., 2016; Conrad et al., 2014; Remedi and Emfinger, 2016). L'inactivation chez la souris d'un de ces facteurs exprimés dans les cellules  $\beta$  matures (MafA) empêche le GSIS sans affecter la quantité de cellules  $\beta$  (Zhang et al., 2005). La perte de ce facteur de transcription est observée *in vivo* dans des modèles murins de DT2 (souris db/db) ainsi que chez l'humain à des stades précoces de développement de DT2 (Guo et al., 2013). Le manque de réponse aux facteurs de prolifération de ces cellules  $\beta$  au cours de leur vie explique en partie le fait que l'incidence du DT2 augmente avec l'âge. La dédifférenciation est définie comme l'altération du phénotype pouvant conduire à la perte de composés responsables de la performance optimale des cellules comprenant la sécrétion

d'insuline. Celle-ci est étudiée depuis peu, encore mal comprise et potentiellement induite par la glucotoxicité (Weir et al., 2013).

### **II. B. 3 La gluco-lipotoxicité cause des altérations au niveau subcellulaire**

#### **II. B. 3.1 Le stress du réticulum endoplasmique diminue la sécrétion d'insuline**

Il a déjà été démontré que diverses maladies dont le DT2 induisent une altération structurelle de la morphologie du RE dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Masini et al., 2017). Lors d'une hyperglycémie prolongée, la forte demande en insuline peut causer une accumulation d'insuline non fonctionnelle dans le RE et induire un stress de l'organite (van Raalte and Diamant, 2011) comme cela a été décrit dans des îlots de rats cultivés avec une forte concentration de glucose ainsi que dans des îlots humains de patients diabétiques de type 2 (Eizirik et al., 2008; Marchetti et al., 2007). La lipotoxicité peut aussi induire un stress du RE. Le prétraitement par du palmitate, de cellules  $\beta$  MIN6 (lignée murine) induit le remodelage des phospholipides et sphingolipides du RE perturbant les radeaux lipidiques, le trafic des protéines à l'intérieur du RE et induisant un stress réticulaire (Boslem et al., 2013). Une réponse adaptative appelée « Unfolded Protein Response » (UPR) est initiée afin de rétablir l'homéostasie du RE. Mais paradoxalement, l'UPR est aussi impliquée dans le défaut de sécrétion d'insuline et l'apoptose de la cellule  $\beta$  entraînant la diminution du nombre de cellule  $\beta$  (Acosta-Montaña et al., 2019; Eizirik et al., 2008).

#### **II. B. 3.2 L'induction de ROS affecte la sécrétion d'insuline**

Lorsque le glucose circulant est élevé, les cellules  $\beta$  subissent une augmentation de ROS produits, en partie, suite à la phosphorylation oxydative (décrite dans le chapitre III) dans la mitochondrie induisant un stress oxydatif (Brownlee, 2003; van Raalte and Diamant, 2011). Les acides gras dégradés par la  $\beta$ -oxydation sont une des sources principales de ROS dans la mitochondrie de la cellule  $\beta$  (Jezek and Hlavatá, 2005; Plecítá-Hlavatá and Ježek, 2016; Supale et al., 2012; Victor et al., 2011). Ces ROS sont converties en peroxyde d'hydrogène dans le cytosol et la mitochondrie (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Wang et al., 2011). De plus il a été observé que l'exposition pendant 24h à une mixture composée de différents acides gras, mimant la composition plasma de sujets souffrants de syndrome métabolique, induit la

réduction de la capacité antioxydante des cellules MIN6 altérant leur capacité à réduire la quantité de ROS dans ces cellules (Velasquez et al., 2017).

Les cellules  $\beta$  ont comme particularité d'avoir peu de production d'enzymes anti-oxydantes les rendant particulièrement sensibles au stress oxydatif (Poitout and Robertson, 2008). Dans ces cellules, les ROS altèrent principalement la mitochondrie (Li et al., 2008) comme l'attestent des observations dans les îlots de rats et les cellules INS-1E soumis à des hautes concentrations de glucose ou de palmitate. Les conséquences de ces expositions sont des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN) ainsi qu'à des protéines membranaires mitochondriales et la diminution de leur capacité à produire de l'ATP résultant en une réduction du GSIS de ces modèles (Ježek et al., 2018b; Li et al., 2009). Des îlots isolés de donneurs souffrants de DT2 montrent une augmentation des marqueurs de stress oxydatif comparée à des donneurs sains (Wajchenberg, 2007). L'augmentation du stress oxydatif de ces îlots est de plus corrélée avec leur défaut de sécrétion d'insuline (Wajchenberg, 2007). Il est aussi rapporté qu'à forte concentration les ROS activent la protéine découplante 2 (UCP2) permettant la protection des cellules  $\beta$  contre l'apparition de nouveaux ROS en réduisant la synthèse d'ATP pourtant nécessaire à la sécrétion d'insuline (Krauss et al., 2003; Lowell and Shulman, 2005; Prentki and Nolan, 2006). Des stratégies impliquant des antioxydants ou la surexpression d'enzymes antioxydantes permettent de réduire les effets délétères des ROS sur l'expression du gène de l'insuline dans des îlots de rats et des lignées de cellules  $\beta$  (Poitout and Robertson, 2008) ainsi que la mort des cellules (Azevedo-Martins et al., 2003).

### **II. B. 3.3 L'homéostasie calcique et son implication dans la perte de fonction des cellules $\beta$**

Comme décrit précédemment, au sein même de la cellule  $\beta$ , l'homéostasie calcique ainsi que la communication inter-organite ont été mises en évidence comme jouant un rôle dans la sécrétion régulée d'insuline. Lors d'altérations métaboliques, cette communication peut se voir perturbée, induisant la diminution de leurs fonctions. En effet notre équipe a observé la diminution des MAMs dans les cellules  $\beta$  venant de patients souffrant de DT2 (Thivolet et al., 2017). Cette même étude démontre aussi la diminution de ces interactions dans des cellules de lignée  $\beta$  soumises à une lipotoxicité (Thivolet et al., 2017). Les défauts de l'homéostasie calcique mitochondriale en condition de lipotoxicité sont corrélés avec l'induction de



l'apoptose des cellules  $\beta$  (Bernardi et al., 2015; Giorgio et al., 2018). Notre équipe a aussi pu démontrer que la diminution de la fuite calcique réticulaire dans des conditions de lipotoxicité par l'utilisation d'inhibiteurs du translocon, un canal calcique réticulaire, permet de diminuer la perte de  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire, le stress du RE ainsi que de restaurer la sécrétion d'insuline des cellules MIN6 et des îlots pancréatique humains soumis à une forte lipotoxicité (Cassel et al., 2016). La glucotoxicité a été mise en avant comme augmentant les MAMs et la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial basal dans la lignée cellulaire INS-1E ainsi que des cellules  $\beta$  d'îlots humains (Dingreville et al., 2019). Ces altérations perturbent les oscillations calciques mitochondriales des cellules  $\beta$  diminuant la respiration et augmentant le stress mitochondrial et réticulaire (Dingreville et al., 2019). L'utilisation de spacers et linkers, des protéines exprimées permettant de moduler artificiellement et durablement les interactions entre la mitochondrie et le RE, ont mis en évidence que la dynamique de ces interactions est nécessaire au GSIS dans les cellules  $\beta$  (Dingreville et al., 2019). Finalement on observe que la perte de régulation de l'homéostasie calcique joue un rôle majeur dans la dysfonction des cellules  $\beta$  lors de conditions mimant le DT2 (Madec et al., 2021).

Ces observations démontrent bien que la glucotoxicité est un bon modèle d'étude pour comprendre les altérations causées par le DT2. De récentes revues de Weir et son équipe décrivent la lipotoxicité comme étant potentiellement impliquée dans l'insulinorésistance des tissus périphériques mais restent très discutée dans la dysfonction des cellules  $\beta$  lors du développement du DT2 (Weir, 2020; Weir et al., 2021). Malgré tous les efforts déjà employés, tout le processus de dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatique lors de condition de DT2 n'a pas encore été élucidé. De nombreuses études décrivent que la gluco- et ou la lipotoxicité induisent le dérèglement du métabolisme de la cellule  $\beta$  pancréatique. Ce dérèglement est impliqué dans la dysfonction de la synthèse et la sécrétion d'insuline par le biais de divers mécanismes. Ce sujet étant au cœur de ma thèse, je l'ai développé dans le chapitre dédié ci-après.

# CHAPITRE III Le métabolisme cellulaire et la sécrétion d'insuline

## PARTIE A Le métabolisme énergétique et son étude

### III. A. 1 Le métabolisme énergétique

Le métabolisme, du grec ancien « μεταβολή » ou « metabolē », signifiant un changement, est un ensemble de réactions chimiques dans un organisme permettant de le maintenir en vie, de se reproduire, de se développer et de répondre aux stimuli de son environnement. Ces réactions chimiques utilisent des métabolites, définis comme étant des composés de moins de 1,5 kDa et pouvant être d'une grande variété (Nicholson and Lindon, 2008). Le métabolisme est souvent décrit comme étant le résultat de l'addition de deux composants : le catabolisme et l'anabolisme. Le catabolisme représente la dégradation de métabolites permettant la production d'intermédiaires énergétiques et de composés simples, nécessaires aux réactions anaboliques ou aux fonctions cellulaires spécifiques. L'anabolisme permet la biosynthèse de constituants cellulaires comme les protéines, les lipides, les acides nucléiques ou encore les glucides. Le métabolisme énergétique est à l'interface entre ces deux notions et se focalise sur les transferts d'énergie chimique entre les réactions de l'anabolisme et du catabolisme et la production d'énergie et de travail pour l'organisme. La dégradation progressive de métabolites carbonés, comme la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation, dégradant respectivement du glucose et des acides gras, mènent au cycle du citrate dans la mitochondrie. Cette voie métabolique permet de réduire complètement les carbones entrants sous forme de pyruvate ou d'acetyl-CoEnzyme A (Acétyl CoA) en  $\text{CO}_2$ . Au cours de l'oxydation des carbones, des coenzymes à l'état oxydé comme le nicotinamide adénine dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) et le flavine adénine dinucléotide ( $\text{FAD}^+$ ) sont réduits en  $\text{NADH}, \text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  et peuvent être utilisés par la chaîne respiratoire pour produire de l'énergie sous forme d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative (Figure 8).

Avant de s'intéresser plus au métabolisme en lui-même, je débute ce chapitre en exposant ce qui a poussé l'humanité à se plonger dans son étude (Judge and Dodd, 2020, p. 20; "Roche Biochemical Pathway," n.d.) en plus de présenter deux techniques très utilisées à ce propos à l'heure actuelle.

### III. A. 1.1 Un peu d'Histoire

#### Auparavant...

Depuis l'Antiquité, il est reconnu que les fluides biologiques contiennent des informations sur l'état de santé d'un individu. À défaut de comprendre le métabolisme et sa complexité, l'humanité a vite compris l'utilité de ces fluides pour diagnostiquer des états et des pathologies. Il y a 6000 ans, la civilisation babylonienne inspectait déjà les urines (Haber, 1988). De plus, dans un papyrus daté de 1550 ans avant JC et découvert dans un tombeau au sud de l'Égypte par Georg Ebers, se trouve une description de la polyurie. Puis 700 ans avant notre ère, Hesy-Ra un physicien de la III<sup>ème</sup> dynastie égyptienne décrit une nouvelle fois cette pathologie. D'autres médecins égyptiens auraient été capables de diagnostiquer une grossesse par l'étude des urines. Ils pensaient que l'urine des femmes enceinte rouillait les ongles, changeait la couleur des feuilles ou abritait des créatures vivantes (Haber, 1988). En Inde et dans la Chine antique, environ 2500 et 1800 ans respectivement avant notre ère, il était reconnu que le goût de l'urine pouvait être un marqueur important lors du diagnostic du diabète (Tattersall, 2017). Au X<sup>ème</sup> siècle, dans le monde Arabe, Al-Râzî et Avicenne développent l'uroscopie. Cette science permettait de diagnostiquer une dizaine de pathologies en observant les propriétés de l'urine : son odeur, sa couleur, sa viscosité et son goût. Leurs observations permirent à Isaac Israëli et au Byzantin Théophile au X<sup>ème</sup> siècle, d'écrire des traités ayant un impact important sur la médecine occidentale (Moulinier-Brogi, 2016). Le concept de métabolisme est apparu au XIII<sup>ème</sup> siècle, mentionné par Ibn al-Nafis comme « le corps et ses parties sont dans un état perpétuel de dissolution et de reconstitution, de sorte qu'ils subissent inévitablement un changement permanent » (van der Greef et al., 2013). Au XVII<sup>ème</sup> siècle, Santorio, à l'aide d'une balance de son invention sur laquelle il mangeait, travaillait et dormait régulièrement, mesura pendant 30 ans sa masse corporelle ainsi que ses excréments solides et liquides. Il observa notamment que la masse qu'il ingérait, sous forme de nourriture solide ou liquide était supérieure à celle de ses rejets, sous forme d'excrément et d'urine, le tout sans que sa masse corporelle n'augmente. Cette perte de masse représentait, selon lui, une perte de substance corporelle qu'il appela la « transpiration insensible » ou perspiration. Santorio publia ses travaux, liant des activités journalières et des modifications individuelles, dans son livre *Ars de Statica Medicina* en 1614,

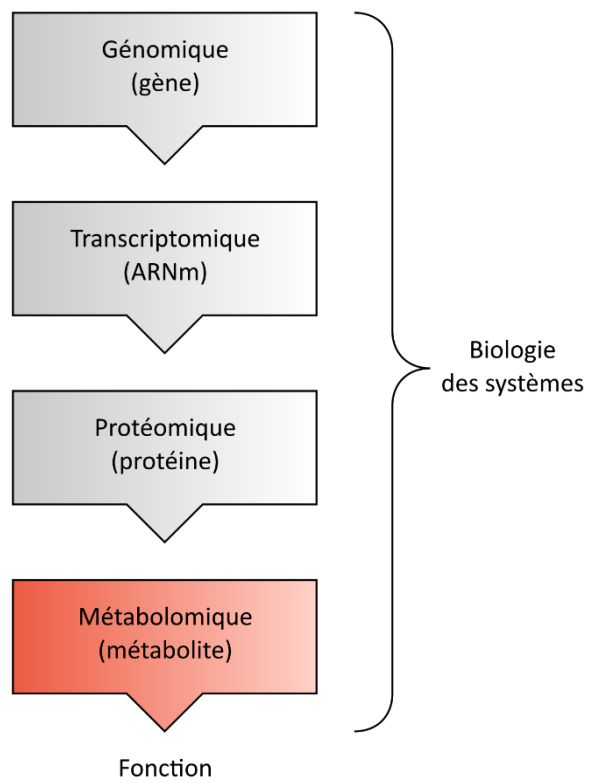
considéré aujourd'hui comme la première étude systématique du métabolisme basal (Bing, 1971).

### **De nos jours...**

Les changements d'odeurs, de goûts ou de couleurs de l'urine sont reliés à des changements de concentration de composés chimiques dans les fluides biologiques. Ces changements de concentrations résultent de modifications de voies biochimiques révélant l'état du métabolisme. Par exemple, le syndrome des langues bleues, causé par un défaut d'absorption du tryptophane induit la coloration des urines ainsi que de la langue en bleu (Nyhan, 2010) ou encore comme cité précédemment, l'urine d'un sujet diabétique contenant du glucose.

De nos jours, l'étude des bio-fluides est toujours d'actualité mais les techniques d'études ont changé. Par exemple, de nouvelles technologies ont permis au XX<sup>ème</sup> siècle de développer des approches globales pour étudier les systèmes complexes dans leur ensemble : les « omiques ». Ces approches peuvent être classées en différents groupes : la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. Ces « omiques » ont comme but respectif de caractériser les gènes, les acides ribonucléiques (ARN) messagers, les protéines et les métabolites dans un échantillon biologique de manière non-ciblée et non-biaisée (Horgan and Kenny, 2011). L'intégration de ces techniques constitue un domaine de recherche à part entière : la biologie des systèmes (Figure 12).

La métabolomique telle que définie par Fiehn *et al.* (Fiehn, 2002), correspond à l'identification et à la quantification exhaustive et non sélective de tous les métabolites d'un système biologique. Elle permet d'observer les mécanismes biochimiques régulant le métabolisme, comme par exemple dans le cas du diabète les prédispositions génétiques (Herder and Roden, 2011; Langenberg and Lotta, 2018), les modifications de transcrits (Jenkinson *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2020) ou de régulations des protéines (Rao *et al.*, 2009). La métabolomique est souvent considérée comme apportant une information plus fonctionnelle que les autres « omique » (Sumner *et al.*, 2003), poussant certaines personnes à se demander si elle n'est pas « La meilleure « omique » de toutes ? » (Ryan and Robards, 2006).



**Figure 12 : La biologie des systèmes est l'intégration des 4 « omiques » : Génomique, Transcriptomique, Protéomique et Métabolomique.**

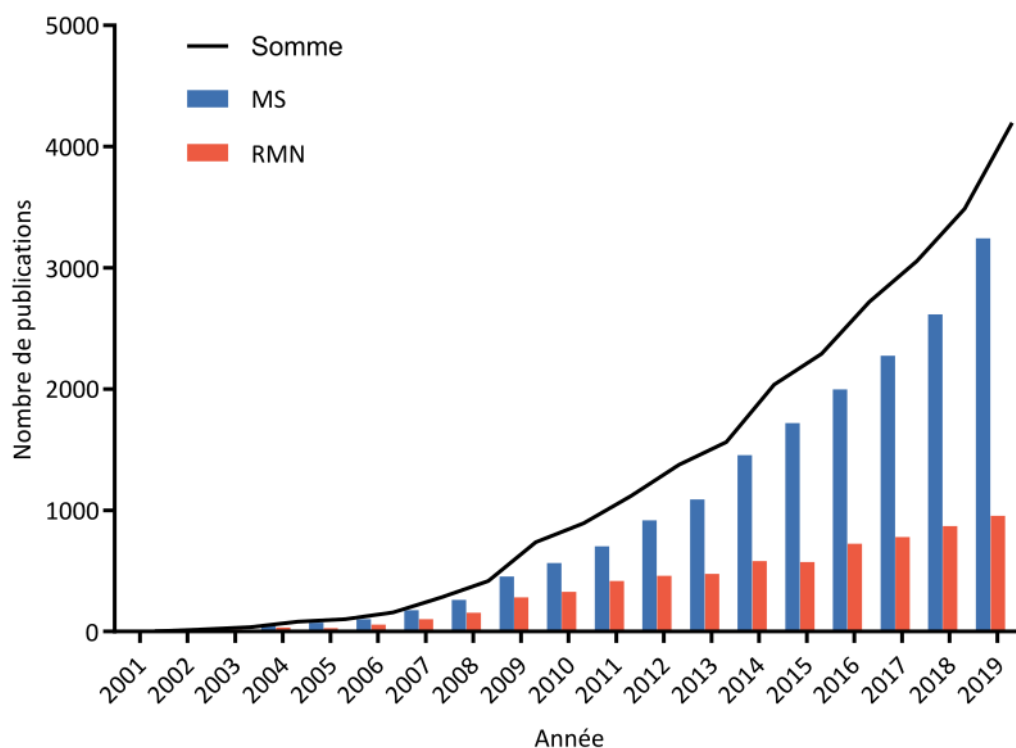
Le développement de la métabolomique a commencé grâce à la spectrométrie de masse, qui est utilisée depuis les années 1970 pour quantifier des métabolites comme des acides aminés, des glucides ou d'autres intermédiaires métaboliques (Devaux et al., 1971; Horning and Horning, 1971; Thompson and Markey, 1975). Dans les années 1980, l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire a fait son entrée dans le domaine médical avec des applications pour l'étude de profils métaboliques d'urine (Bales et al., 1984) ou de sérum et plasma de patients diabétiques (Nicholson et al., 1984). Pendant une dizaine d'années les publications au sujet de profilages métaboliques oscillent entre 1 et 12 publications par an. À la fin des années 1990 les outils d'analyse informatique, le développement d'analyses statistiques multivariées (Fonville et al., 2010), l'avènement du séquençage ADN et de la génomique fonctionnelle, ont créé un environnement favorable pour le développement de la métabolomique (Nicholson et al., 1999). La grande diversité de métabolites à étudier, estimée aujourd'hui de 10 000 à 100 000 métabolites dans les cellules de mammifères en culture (Dias et al., 2016; Kell, 2004), environ 100 000 pour le corps humain (Markley et al., 2017) et jusqu'à 200 000 dans le groupe des plantes (Fiehn, 2002), a entraîné le développement de nombreuses techniques d'identification des métabolites.

Depuis les années 2000, le nombre d'études publiées sur la métabolomique a augmenté de façon exponentielle. Celles-ci se basent principalement sur deux techniques, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (Figure 13). La spectrométrie de masse est majoritairement utilisée par rapport à la résonance magnétique nucléaire mais en réalité les limites de chacune de ces techniques tendent à les rendre plus complémentaires que concurrentes (Durand et al., 2010).

### **III. A. 1.2 Les approches analytiques en métabolomique**

Différentes approches sont utilisées lors des études métabolomiques. Elles se caractérisent en 3 différentes catégories qui diffèrent par leur qualité et par le nombre de métabolites détectés ou d'intérêt : l'analyse de métabolites cibles, l'analyse de profil métabolique et l'analyse d'empreinte métabolique (Courant et al., 2014). L'analyse de métabolite(s) cible(s) se concentre sur la détection et la quantification précise d'un seul, ou d'un petit nombre de métabolites d'intérêt. L'analyse de profil métabolique s'intéresse à l'analyse d'un groupe de métabolites, appartenant à une voie métabolique ou une famille de métabolite. Cette

approche est basée sur une hypothèse de travail limitant le nombre de métabolites d'intérêts. L'analyse d'empreinte métabolique est utilisée pour comparer l'ensemble des métabolites retrouvés dans un échantillon biologique : les métabolomes complets, afin de trouver les paramètres modifiés par les facteurs étudiés. Cette approche n'est pas basée sur une hypothèse et peut-être utilisée comme outil d'investigation ou de diagnostic. Le désavantage de cette technique est la nécessité d'identifier parfois un grand nombre de métabolites à postériori, pouvant s'avérer difficile voire impossible.



**Figure 13 : Nombre de publications de 2001 à 2019 concernant la métabolomique utilisant la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire.**

Chiffres obtenus par la recherche sur NCBI en utilisant les formules suivantes : (((metabolomic) OR (metabolomics)) AND ((mass spectrometry) OR (MS))) ; (((metabolomic) OR (metabolomics)) AND ((Nuclear Magnetic resonance) OR (NMR)))

### **III. A. 2 L'identification et la quantification des métabolites en métabolomique**

#### **III. A. 2.1 La spectrométrie de masse (MS)**

Cette méthode est utilisée pour étudier des altérations de voies métaboliques par des drogues et par un grand nombre de maladies (Gowda and Djukovic, 2014). Ainsi, de nombreux cancers (Abbassi-Ghadi et al., 2013; O'Connell, 2012; Trock, 2011; Williams et al., 2013), des maladies cardiovasculaires (Rhee and Gerszten, 2012; Shah et al., 2012) et rénales (Weiss and Kim, 2011), des biomarqueurs métaboliques d'erreurs innées du métabolisme (Mamas et al., 2011), des effets nutritifs (Scalbert et al., 2009) et toxicologiques (Robertson et al., 2011) ont pu déjà être étudiés et de nouvelles études paraissent maintenant quotidiennement.

#### **Bases de la MS**

La MS repose sur la mesure du rapport  $m/z$  des différentes espèces chimiques, où  $m$  représente la masse et  $z$  la valence (le nombre de charge) des ions détectés (Alseekh et al., 2021). Son utilisation en métabolomique permet d'obtenir des spectres de masse où l'abondance relative des ions est représentée en fonction de leurs les rapports  $m/z$ . Le spectromètre de masse se compose de trois parties : une source d'ionisation (la plupart du temps combinée au système d'introduction de l'échantillon), un analyseur et un détecteur incluant le système de traitement (Figure 14A). Il existe différentes manières d'introduire l'échantillon dans la source d'ionisation. La méthode dite directe consiste à introduire directement l'échantillon dans le spectromètre de masse. Il est aussi possible d'utiliser des méthodes séparatives, comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou liquide (LC), qui couplées à un spectromètre de masse donnent la GC/MS et la LC/MS. Les chromatographies permettent de simplifier la composition de l'échantillon en ajoutant une dimension aux résultats : le temps de rétention dans la colonne de chromatographie. A la sortie du chromatographe, une source ionisante vaporise et ionise les molécules de l'échantillon. Il existe plusieurs types de sources ionisantes en fonction du résultat recherché et des molécules à analyser (Alseekh et al., 2021). Un analyseur est constitué de champs électriques et magnétiques appliquant des forces sur les particules qui le traversent. Cela conduit à modifier la vitesse et la direction des espèces ionisées permettant leur séparation en fonction leurs rapports  $m/z$ . Les ions lourds seront moins déviés par l'analyseur que les ions légers. Différents

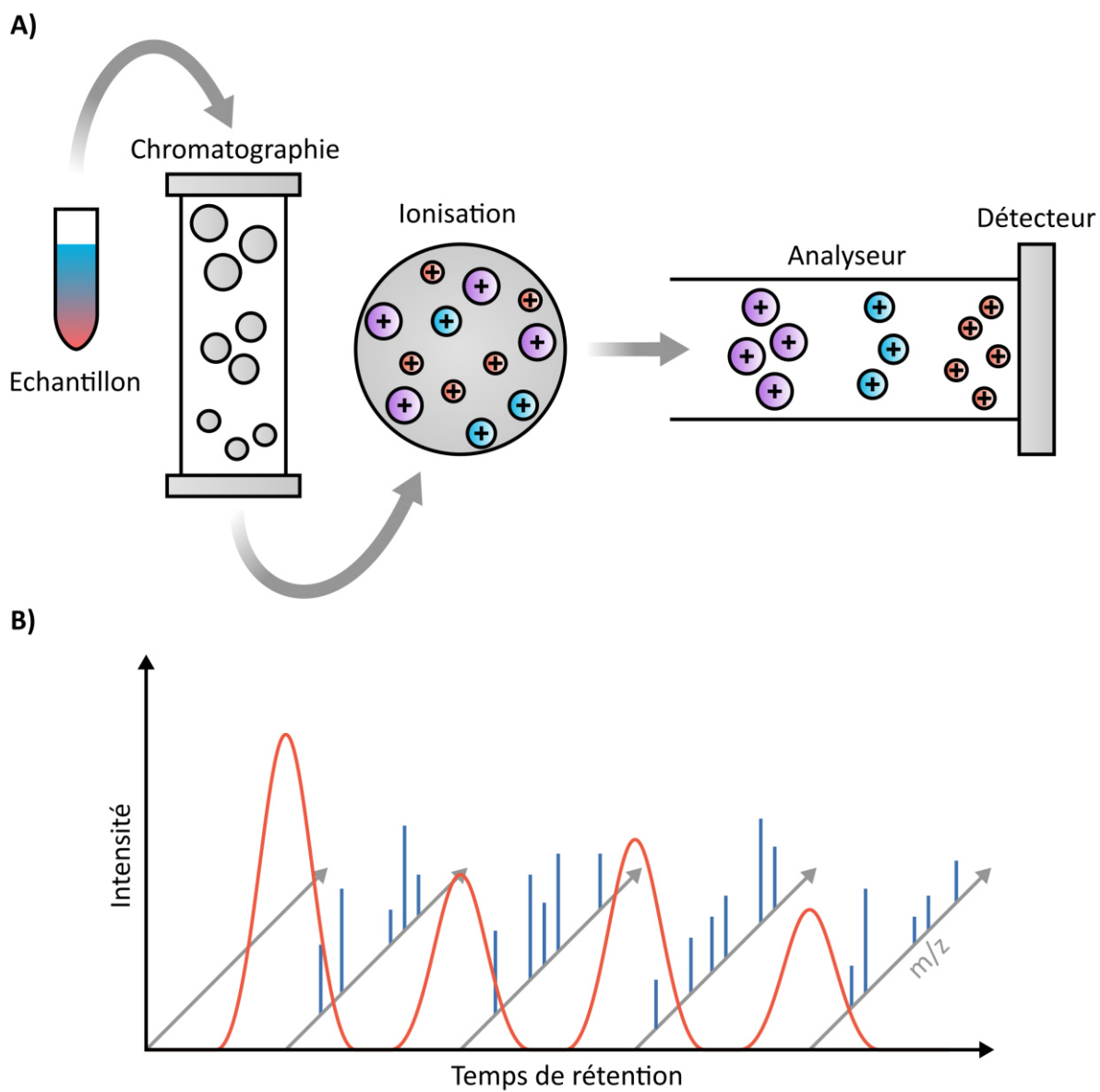


analyseurs existent et reposent sur des technologies différentes, offrant des résolutions et propriétés différentes (Hu et al., 2005; Wolff and Stephens, 1953). Il est possible de coupler différents analyseurs. Finalement, un détecteur permet de détecter les signaux et de les amplifier pour permettre à une interface informatique de les traiter (figure 14A). Au final, un spectre du ratio  $m/z$  est obtenu si l'échantillon est introduit directement et un chromatogramme est obtenu si une séparation sur colonne de chromatographie est effectuée. Ce chromatogramme présentera l'intensité enregistrée par le spectromètre en fonction du temps de rétention. Pour chaque signal détecté, un spectre correspondant au ratio  $m/z$  est enregistré. Ces chromatogrammes ont l'avantage de pouvoir augmenter la résolution de la MS (Figure 14B).

L'intensité d'un pic de MS est reliée à l'abondance de la molécule ionisée. Il est donc possible de quantifier les métabolites en mesurant la surface des pics correspondants. L'intensité de ces signaux n'est cependant pas directement corrélée aux concentrations absolues des métabolites dans l'échantillon analysé. Cette particularité est due aux différentes efficacités d'ionisations en fonction des métabolites présents dans les échantillons (Alseekh et al., 2021). Cette particularité fait de la MS une technique semi-quantitative. Il est néanmoins possible de comparer plusieurs chromatogrammes entre eux pour obtenir des quantifications relatives des différents métabolites.

### **Les avantages et limites de la MS**

Le principal avantage de la MS est sa très grande sensibilité, de l'ordre du nanomolaire (Scalbert et al., 2014) permettant de détecter un nombre très important de métabolites. Cette particularité en fait une technique de choix pour les analyses métabolomiques non ciblées. Un autre avantage est la quantité d'échantillon nécessaire à la MS, de l'ordre d'une dizaine de microlitres. Finalement, la MS est aussi une technique rapide permettant d'analyser un échantillon en quelques secondes lors d'une analyse directe. L'utilisation de techniques séparatives rallonge très significativement le temps d'analyse de l'échantillon de l'ordre de la dizaine de minutes mais permet une acquisition plus résolutive.



**Figure 14 : Les grandes étapes de la spectrométrie de masse (MS).**

A) La MS implique différentes étapes une fois l'échantillon obtenu : la séparation sur une colonne (chromatographie) GC ou LS, l'ionisation des métabolites en utilisant une source d'ions, leur séparation par un analyseur de masse en fonction de leur ratio  $m/z$  et leur détection. B) Représentation schématique de l'architecture 3D d'un chromatogramme obtenu par LC-MS.

Cependant, la nécessité d'ioniser les composés représente une limite et certains composés non ionisables ne sont pas étudiables par MS. Les molécules ayant un ratio m/v identique, ne peuvent être différenciés que sous formes fragmentées par certaines techniques de MS. De plus, la variabilité systématique due par exemple à l'étape d'ionisation est un lourd handicap de la MS. La faible reproductibilité de cette étape entre deux analyses avec un même appareil mais aussi la confrontation d'analyses par différents appareils de mesures est un enjeu analytique. Il est néanmoins possible d'ajouter des contrôles, par exemple constitués d'un mélange de différents métabolites référents qui sont injectés avant, pendant et après l'acquisition de l'échantillon d'intérêt pour permettre la caractérisation de la variance totale associée au spectromètre (Sangster et al., 2006). Il est aussi possible d'utiliser un échantillon contrôle entre différentes acquisitions en vue de corriger le signal (Dunn et al., 2011). Malgré tout, ces contrôles ne permettent pas d'étudier certains métabolites qui cessent d'être générés à la suite de variations de la source d'ionisation. De plus, la reproductibilité entre différents laboratoires et plateformes d'analyses est un défi majeur. Un autre désavantage de cette technique repose sur ses résultats semi-quantitatifs. Pour résoudre ce problème de quantification, il est tout de même possible d'utiliser des standards isotopiques internes, avec des méthodes de quantifications ciblées. C'est-à-dire ajouter à l'échantillon des métabolites avec une structure similaire aux métabolites à quantifier avec une concentration connue, permettant une normalisation des signaux. Le coût élevé, l'indisponibilité de certains composés ou encore la large diversité des métabolites à doser sont des limites majeures à la quantification absolue d'un grand nombre de composés par MS. Finalement, la plupart des métabolites détectés en MS ne sont pas identifiés (estimé à 70% en 2014) (Courant et al., 2014; Leggett et al., 2019) limitant l'interprétation biologique.

### **III. A. 2.2 La résonance magnétique nucléaire (RMN)**

#### **Le principe de la RMN**

L'acquisition des spectres de RMN est une approche de choix pour l'étude des métabolites présents dans un échantillon biologique. En métabolomique par RMN, l'acquisition de spectres  $^1\text{H}$  est la plus commune au vu de la forte présence des atomes d'hydrogène (H) dans les métabolites et par son abondance isotopique proche de l'unité. Les autres noyaux détectables par RMN et présents dans les métabolites sont le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) et phosphore

31 ( $^{31}\text{P}$ ), mais leur abondance isotopique naturelle limite leur seuil de détection et donc leur utilisation en routine.

Les spectres  $^1\text{H}$  1D obtenus sur des échantillons biologiques montrent un très grand nombre de pics. De par leurs positions sur le spectre (déplacement chimique), et leurs multiplicités, les signaux RMN contiennent des informations sur la structure des molécules et permettent leur identification (Dona et al., 2016). L'attribution des signaux et l'identification des métabolites sont réalisées à l'aide de spectres à deux dimensions ( $^1\text{H}/^1\text{H}$  et  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) acquis sur des échantillons représentatifs. Les signaux des expériences 1D et 2D sont comparés à des banques de données contenant des spectres de références de métabolites connus (Wishart et al., 2018). Un exemple de spectre annoté est représenté ci-après en figure 15B.

La RMN est une technique intrinsèquement quantitative et certaines séquences RMN permettent une quantification absolue des métabolites ( $^1\text{H}$  Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY)). La concentration d'un métabolite est alors obtenue en comparant l'intégration de son signal avec celle d'un métabolite de concentration connue obtenue dans les mêmes conditions (Jung et al., 2016; Markley et al., 2017). La quantification des métabolites d'un même spectre  $^1\text{H}$  NOESY est effectuée en intégrant les signaux assez résolus ou en utilisant des logiciels dédiés (Lipfert et al., 2019; Nagana Gowda and Raftery, 2019; O'Shea and Misra, 2020). La séquence  $^1\text{H}$  Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) est aussi très utilisée pour réduire le signal provenant de grosses molécules comme les lipides ou les protéines et gênant l'analyse des spectres dans les échantillons biologiques (Emwas et al., 2019; Kostidis et al., 2017; Wallmeier et al., 2017). Néanmoins, la quantification des métabolites à partir des expériences CPMG perd son aspect absolu. Sur les spectres  $^1\text{H}$  CPMG, l'intensité des signaux dépend de propriétés de relaxation spécifiques à chaque métabolite, il est donc possible de comparer l'intensité de signaux d'un même métabolite sur plusieurs conditions mais pas de la comparer à celle d'un métabolite différent en effectuant des procédures équivalentes à la quantification absolue (Wallmeier et al., 2017).

## **Les avantages et limites de la RMN appliquée à la métabolomique**

La métabolomique par RMN permet la quantification absolue de métabolites à partir du moment où l'on utilise un standard de concentration connue sur un spectre unidimensionnel (Jung et al., 2016; Markley et al., 2017). De plus la RMN est une technique non destructive nécessitant peu de préparation de l'échantillon biologique. Celui-ci peut être récupéré et réutilisé après une analyse métabolomique par RMN. Finalement, la robustesse de cette technique lui confère une grande reproductibilité, permettant la comparaison de résultats entre différentes plateformes d'analyses et même entre instruments différents (Bingol and Brüschweiler, 2015). Cette caractéristique est un grand avantage lorsque l'on veut acquérir et comparer des spectres dans différents centres de recherche comme cela a été le cas lors de mon travail de thèse.

Cependant, la métabolomique par RMN reste limitée par sa faible sensibilité réduisant la détection aux métabolites dont la concentration est supérieure au micro molaire (Pan and Raftery, 2007). De plus, ce manque de sensibilité est renforcé parfois par le manque de résolution conduisant au chevauchement des pics RMN de différents métabolites, empêchant l'utilisation de certains signaux pour quantifier le métabolite associé. De nos jours, les limites liées à la sensibilité de la RMN tendent à être repoussées par l'utilisation de spectromètres RMN à très hauts champs (Dinclaux et al., 2020) et l'utilisation de cryosondes (Griffin et al., 2003) réduisant le bruit thermique causé par les circuits électroniques du spectromètre. De plus le développement de la technique d'hyperpolarisation dynamique nucléaire ouvre de nouvelles perspectives pour dépasser ce problème de sensibilité de la RMN (Dumez et al., 2015; Jannin et al., 2019; Markley et al., 2017).

### **III. A. 2.3 Pourquoi la RMN est la technique la plus adaptée à notre étude ?**

RMN et MS possèdent chacune des atouts et des faiblesses et sont capables d'identifier des signatures métaboliques dans des échantillons complexes (Bingol, 2018; Pan and Raftery, 2007). Certaines études cherchent à combiner des résultats de RMN et MS permettant d'identifier de nouveaux composés tout en discriminant de nouveaux biomarqueurs associés par exemple à une pathologie (Marshall and Powers, 2017). De plus, le choix de la méthode peut être fait en fonction de la visée de l'étude : détection de biomarqueurs, quantification

absolue, reproductibilité qui peuvent être autant de caractéristiques à prendre en compte lors de ce choix méthodologique. Malgré tout, l'accessibilité aux plateformes analytiques, l'expertise méthodologique et technologique de ses utilisateurs sont aussi des paramètres importants dans le choix de la méthode à utiliser.

La RMN a été choisie pour l'analyse métabolique au cours de cette thèse pour sa robustesse, son aspect quantitatif et le type de métabolite d'intérêt. De plus, lors de ma formation j'ai été un utilisateur régulier de cette technique. Les analyses métaboliques par RMN sont expliquées plus en détail ci-après.

### **III. A. 2.4 Les différentes étapes lors d'une analyse métabolomique par RMN du proton**

Pour être en mesure de quantifier les métabolites d'un échantillon, il faut d'abord le préparer, acquérir le spectre puis analyser celui-ci. Je vais ici développer les parties que j'ai réalisées au cours de ma thèse : la préparation de l'échantillon et le traitement des données.

#### **La préparation de l'échantillon biologique**

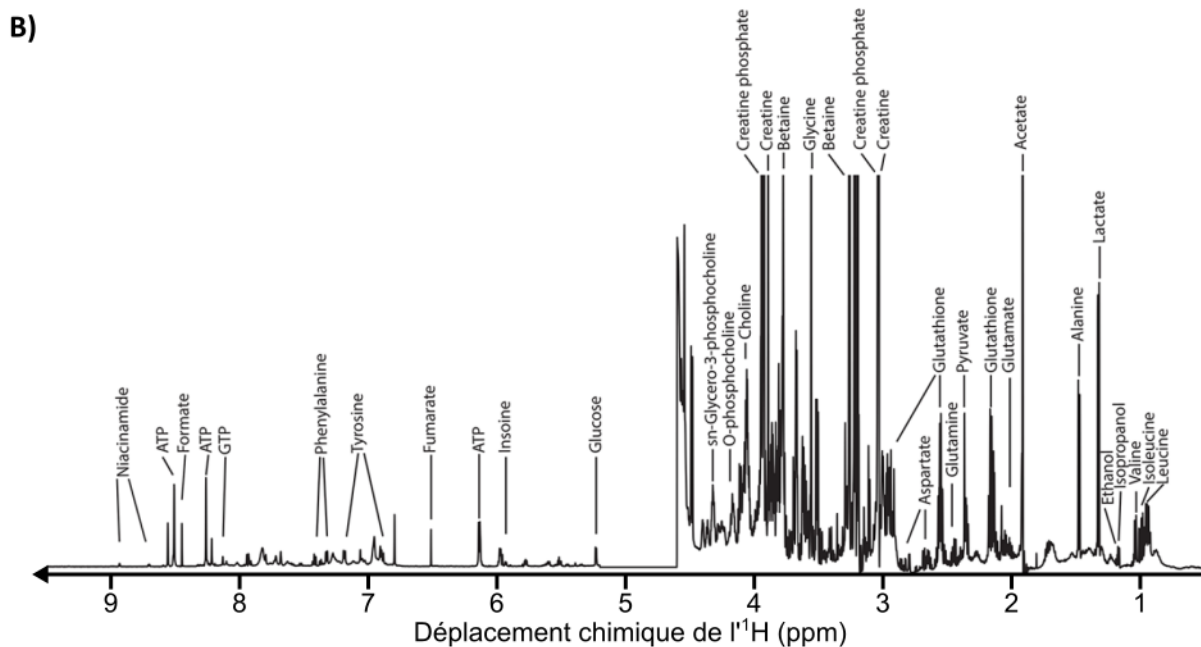
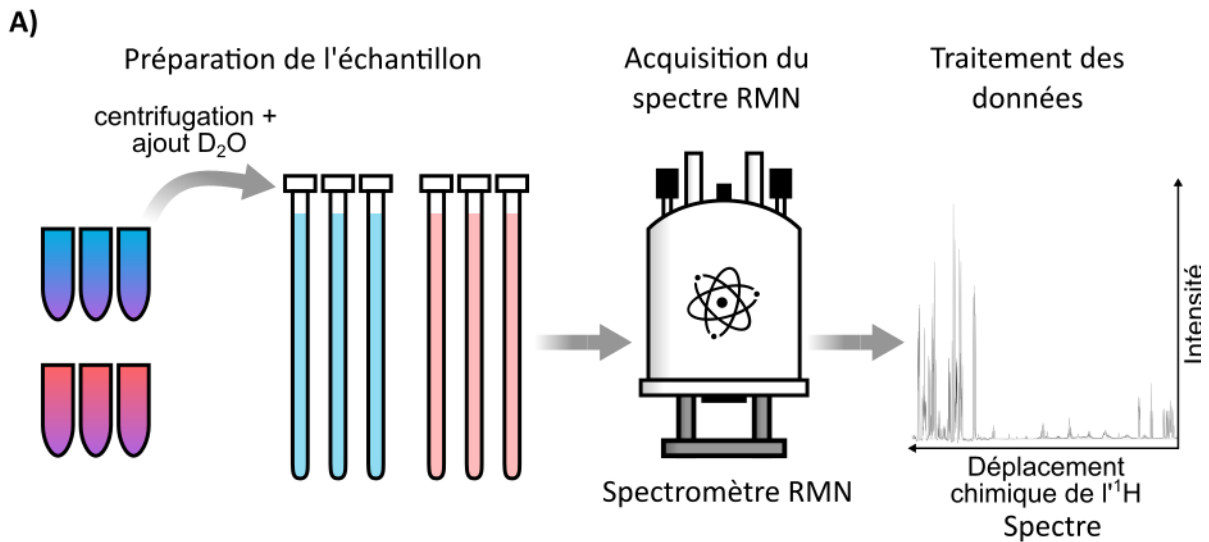
Les cultures cellulaires génèrent deux types d'information métaboliques : intra- et extra-cellulaire. Les échantillons de milieux extracellulaires sont les plus simples à obtenir, ceux-ci ne nécessitent qu'une étape de centrifugation pour supprimer les cellules et débris cellulaires contenus dans les surnageants. Les échantillons intracellulaires eux au contraire disposent de plusieurs protocoles d'extraction de métabolites en fonction de l'objet d'étude (Beckonert et al., 2007; Martineau et al., 2011; Mili et al., 2020; Muschet et al., 2016) (Figure 15A). Les étapes critiques de ces protocoles sont le rinçage des cellules, l'arrêt du métabolisme dans les échantillons et l'extraction des métabolites. Le rinçage des cellules est une étape importante permettant l'élimination des métabolites extracellulaires. Cette étape doit être la plus rapide possible afin d'avoir le moins d'impact possible sur la concentration des métabolites intracellulaires après l'élimination du surnageant (Mili et al., 2020). Ensuite, l'étape d'arrêt du métabolisme de l'échantillon permet de désactiver les enzymes pour figer la concentration des métabolites (Mili et al., 2020). L'étape d'extraction des métabolites permet de les séparer d'autres composés cellulaires affectant la qualité des spectres RMN comme les protéines, les

lipides et les acides nucléiques. En effet, la présence de ces composants dans l'échantillon RMN va induire des perturbations de la ligne de base, compliquant la quantification des métabolites (Wallmeier et al., 2017).

L'utilisation d'une extraction liquide monophasique est la plupart du temps suffisante pour éliminer la plupart des macromolécules comme les protéines ou les acides nucléiques (Mili et al., 2020). Le méthanol permettant d'extraire les métabolites polaires et la centrifugation précipitant les macromolécules comme j'ai pu le réaliser au cours de cette étude (Rautureau et al., 2021). L'ajout d'une étape de séparation entre les composés hydrophiles et hydrophobes est aussi possible par l'ajout de chloroforme et d'eau. Celle-ci permet d'éliminer les lipides en plus des protéines et acides nucléiques de la phase d'extraction (Beckonert et al., 2007).

Une fois extrait, il est important de conserver les échantillons dans de bonnes conditions tout au long du processus jusqu'à l'acquisition des spectres afin d'éviter des réactions entre métabolites ou encore leur oxydation. De nombreux paramètres sont à prendre en compte comme l'état de conservation, la température de stockage avant et au cours de l'acquisition, le pH et les tampons (Breier et al., 2014; Fang et al., 2015). Les surnageant de culture et les extraits cellulaires sont stables quelques heures à 4°C, quelques semaines à -20°C et quelques mois à -80°C (Kirwan et al., 2018).

Afin de permettre l'acquisition RMN il est nécessaire d'ajouter à l'échantillon un composé deutéré comme de l'eau deutérée (D<sub>2</sub>O). Le D<sub>2</sub>O permet au spectromètre de mesurer et compenser les variations du champ magnétique liées par exemple à la décharge progressive (mais très lente) de l'aimant supraconducteur (Beckonert et al., 2007; Emwas et al., 2015; Lauridsen et al., 2007) (Figure 15A).



**Figure 15 : Les grandes étapes de la résonance magnétique nucléaire (RMN).**

A) La RMN sur des surnageants cellulaire implique un processus très simple. Une fois l'échantillon obtenu, la première étape implique de centrifuger l'échantillon pour supprimer les débris cellulaires qui réduiraient la qualité de l'échantillon et d'ajouter de l'eau deutérée (D<sub>2</sub>O) permettant au spectromètre de mesurer et compenser les variations du champ magnétique. L'acquisition RMN permet d'obtenir un spectre avec en abscisse le déplacement chimique des signaux <sup>1</sup>H en fonction de leur intensité. B) Représentation d'un spectre RMN sur un échantillon de lysat cellulaire annoté (Panthu et al., 2018).



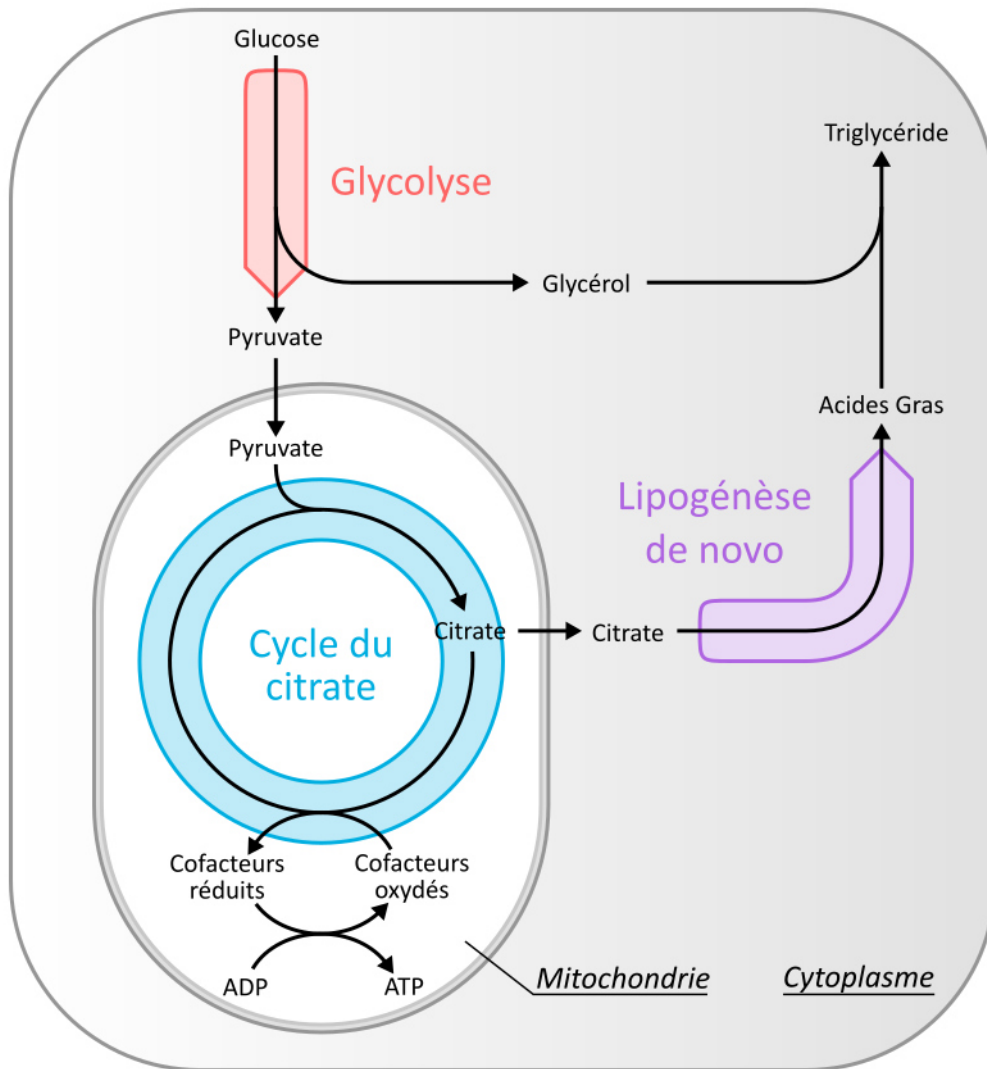
## L'identification et la quantification des métabolites

Pour quantifier les métabolites présents sur un spectre de RMN, il est nécessaire d'attribuer les signaux présents sur celui-ci. L'identification des métabolites est permise grâce l'analyse manuelle de spectres obtenus par la combinaison de méthodes de RMN en 2D comme les J-resolved spectroscopy (JRES), les total correlation spectroscopy (TOCSY) et les heteronuclear single quantum coherence (HSQC) (Lutz et al., 1998; Nicholson et al., 1995; Phalaraksh et al., 1999; Viant, 2003; Yang et al., 2008) sur un échantillon représentatif du système biologique que l'on souhaite étudier. Cette étape, dite d'annotation, est réalisée en comparant les signaux obtenus avec ces différentes techniques (multiplicité des signaux, constantes de couplage et déplacements chimiques) à des bases de données telles que la Human Metabolome Database (HMDB) réalisées à partir de spectres de métabolites purs obtenus sur un spectromètre similaire à celui utilisé lors de l'acquisition (Wishart et al., 2018). La principale limite à ces banques de données est qu'elles ne sont pas complètes face à l'immensité du nombre de métabolites existants. Il est néanmoins possible d'ajouter extemporanément un composé connu à un échantillon pour confirmer l'empreinte de ce composé. Cette méthode est qualifiée de « spiking ». Cette empreinte, combinant les différents signaux de ce métabolite, peut être utilisée afin de repérer les pics correspondant au composé en question sur un spectre. Cette technique est utilisée afin d'identifier certains signaux dans des spectres RMN mais la méthode la plus utilisée reste la comparaison à des banques de données (Balcerczyk et al., 2020; Dona et al., 2016). La Figure 15B représente le type de spectre obtenu que j'ai annoté lors de mon stage de M1 (Panthu et al., 2018).

Une fois les signaux attribués, il est possible de commencer leurs quantifications. Comme abordée précédemment, la RMN permet les quantifications relatives et absolues des métabolites présents dans l'échantillon. La quantification relative d'un même métabolite annoté sur des spectres réalisés dans les mêmes conditions est possible par l'intégration du même pic d'un métabolite sur une série de spectres (Wang et al., 2020). La quantification absolue quant à elle nécessite d'ajouter un composant standard de concentration connu dans chaque échantillon en amont de son acquisition. Une fois le spectre acquis, il est possible de calculer les concentrations absolues des métabolites attribués en utilisant le composant standard de concentration connue grâce au logiciel ChenomX (Weljie et al., 2006). Malgré

tout, l'ajout d'un composé à une concentration spécifique dans chaque échantillon est une source d'erreur supplémentaire. Afin de résoudre ce problème, il est possible d'utiliser la méthode Electronic REference To access *In vivo* Concentrations (ERETIC) (Akoka et al., 1999). Cette méthode nécessite l'ajout d'un échantillon contenant seulement un standard à une concentration connue à la bibliothèque d'échantillons. Une fois les spectres acquis, la méthode ERETIC permet de créer artificiellement un signal RMN sur tous les spectres à une intensité similaire. L'analyse des spectres de la bibliothèque par le logiciel ChenomX pourra être réalisée en prenant le signal ERETIC comme référence. Le rapport de toutes les quantifications à la concentration connue du métabolite dans l'échantillon standard permet d'obtenir les concentrations absolues de tous les métabolites mesurés (Crook and Powers, 2020; Jung et al., 2016).

La normalisation des résultats est un paramètre crucial à l'interprétation des résultats obtenus (Bingol, 2018). Pour les surnageants de culture il est important de prendre en compte la croissance des cellules si l'on souhaite comparer des conditions différentes. En effet, l'étude des surnageants de culture repose sur les quantifications de métabolites entre différents temps pour obtenir une consommation ou sécrétion sur un temps donné par une quantité de cellules donnée. Dans certaines situations, comme celles décrites dans ma thèse, le milieu de culture a un impact sur la prolifération cellulaire. Les réductions du temps et du volume expérimental permettent de limiter l'impact de la différence de vitesse de croissance cellulaire tout en amplifiant les variations de métabolites détectables par RMN (Lefevre et al., 2019). Dans le cas des profils métaboliques intracellulaires, les quantifications des métabolites sont normalisées par le contenu en ADN, la quantité de protéines ou le nombre de cellules (Muschet et al., 2016). C'est cette dernière option qui a été choisie dans le cadre de mes travaux de recherche.



**Figure 16 : Les 3 voies métaboliques étudiées au cours de cette thèse sont toutes interconnectées.** La glycolyse est connectée au cycle du citrate par le pyruvate et à la synthèse de triglycérides par le glycérol, le cycle du citrate est lui de plus connecté à la synthèse de lipide *de novo* par le citrate. ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate.

## PARTIE B Les grandes voies du métabolisme énergétique des cellules $\beta$ et leurs altérations par la glucolipotoxicité

Le métabolisme a un rôle primordial dans la sécrétion d'insuline de la cellule  $\beta$  (Henquin, 2011; Spégeland Mulder, 2020). Trois voies métaboliques reliées entre elles permettent aux cellules de détecter le glucose et de générer des cofacteurs à l'origine du potentiel d'action impliqué dans la sécrétion d'insuline : la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (ou cycle du citrate) et la lipogénèse *de novo*. Ces trois voies métaboliques sont reliées entre elles par différents métabolites clés (figure 16). Des études de métabolomiques sur des souris diabétiques ou suite à 48h de glucotoxicité sur des extraits de cellules INS-1 ont permis de mettre en évidence un dérèglement de différentes étapes de la glycolyse, du cycle du citrate ainsi que de la lipogénèse, potentiellement impliquées dans la détection de glucose et la sécrétion d'insuline (Fernandez et al., 2008; Haythorne et al., 2019).

Afin de mieux comprendre comment ces voies métaboliques interagissent entre elles pour permettre la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, nous suivons le chemin que prennent les carbones du glucose à travers la glycolyse, le cycle du citrate et la lipogénèse *de novo*. Les altérations du diabète par la gluco- et/ou lipotoxicité sur ces voies métaboliques seront ensuite développées.

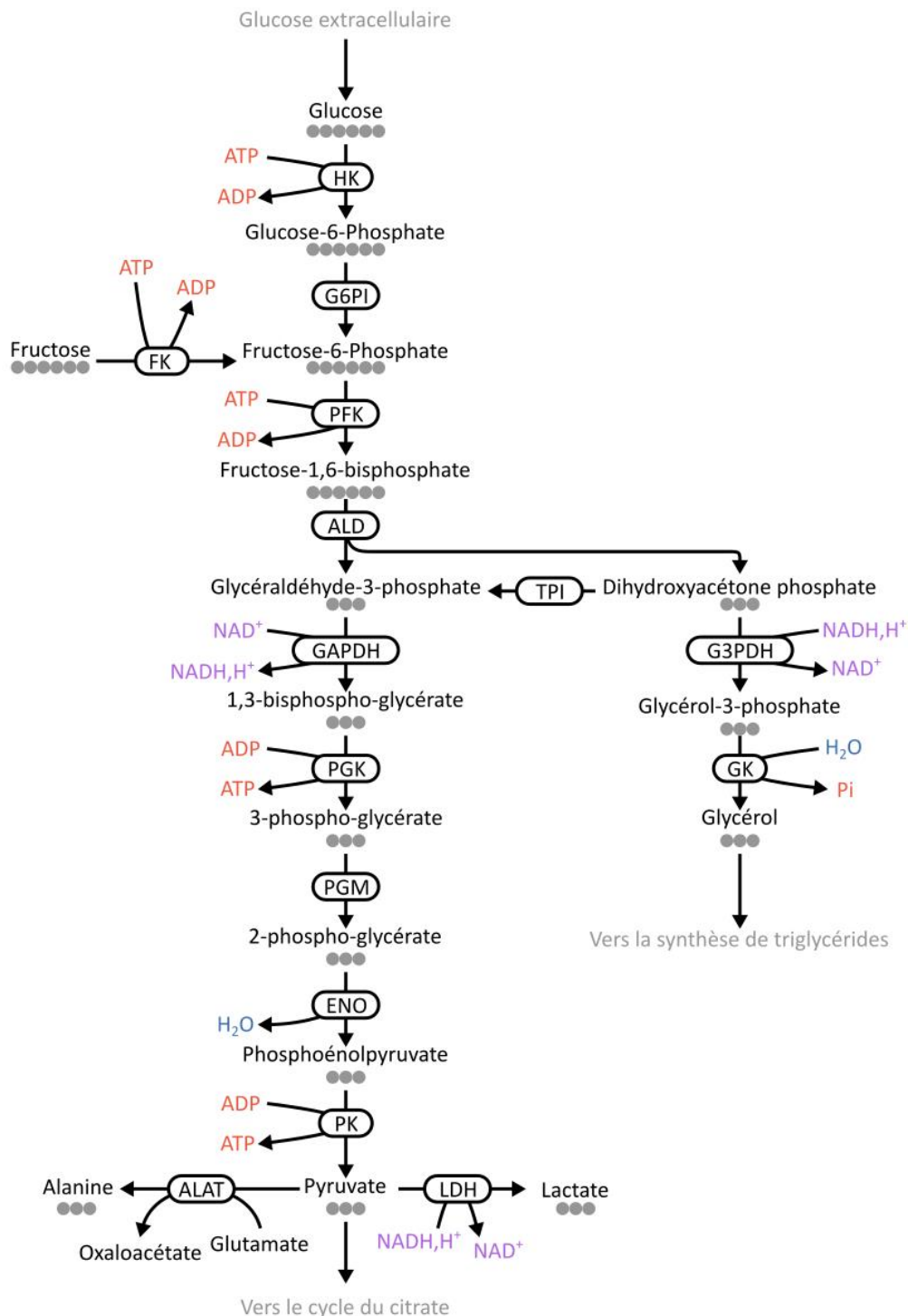
### **III. B. 1 L'entrée du glucose dans la cellule**

L'entrée du glucose dans les cellules  $\beta$  est la première étape essentielle à la sécrétion d'insuline. Cette fonction est assurée par les transporteurs du glucose de la famille GLUT (Berger and Zdzienlo, 2020). Le contrôle de l'entrée du glucose dans le métabolisme est capital pour la fonction endocrine des cellules  $\beta$ . Selon l'espèce, le type de transporteur exprimé diffère. Nous allons voir le cas dans le modèle murin, puis le modèle humain.

Dans les cellules  $\beta$  de rongeurs, l'entrée du glucose est assurée par le transporteur GLUT2 avec un Km d'environ 15-20 mmol/L (Heimberg et al., 1995; Johnson et al., 1990). Cette caractéristique induit l'équilibration du glucose extracellulaire et intracellulaire permettant aux cellules  $\beta$  de capter rapidement une augmentation du glucose circulant (Bell 1993). L'inactivation du gène *glut2* dans un modèle murin induit une diminution de la filtration rénale

du glucose et de la concentration d'insuline dans le plasma (Guillam et al., 1997). De plus, les pancréas isolés de ces souris knockout pour *glut2* ne répondent pas correctement au GSIS alors que la réponse à différents métabolites de la glycolyse, comme le D-glycéraldéhyde, est maintenue (Guillam et al., 2000, 1997). Ces observations permettent de mettre en évidence l'importance de l'entrée du glucose dans la cellule permise par GLUT2 dans les cellules  $\beta$  de rongeurs lors du GSIS (McCulloch et al., 2011).

Dans les cellules  $\beta$  humaines, le rôle des GLUTs est controversé. Certaines études montrent que GLUT2 est présent dans des îlots d'humains adultes (Ferrer et al., 1995) confortant des études cliniques mettant en avant un défaut de GLUT2 comme responsable de diabètes gestationnels et néonataux (Sansbury et al., 2012). Ces études suggèrent que GLUT2 est nécessaire à la fonction des cellules  $\beta$ . D'autres études discutent l'expression de GLUT2 dans les îlots humains (De Vos et al., 1995) appuyant de récentes études démontrant que l'expression de *SLC2A1* (transcrit du gène codant pour GLUT1) est supérieure à celle de *SLC2A2* (transcrit du gène codant pour GLUT2) dans les cellules  $\beta$  humaines, précisant une forte hétérogénéité dans l'expression de *SLC2A2* (Saponaro et al., 2020). Malgré ces observations contradictoires au sujet de GLUT2, certaines études proposent GLUT1 et GLUT3 jouant le rôle majeur de transporteur de glucose dans les cellules  $\beta$  humaines (Coppieters et al., 2011; De Vos et al., 1995; Gunton et al., 2005; McCulloch et al., 2011). Cependant, les faibles constantes d'activité ( $K_m$ ), représentant la concentration en glucose pour laquelle la vitesse initiale de la réaction enzymatique est à la moitié de la vitesse initiale maximale ( $V_{max}$ ), de GLUT1 et GLUT3 induisent une  $V_{max}$  de ces transporteurs lorsque le glucose circulant atteint 4-6 mmol/L. De ce fait, l'augmentation de la concentration sanguine de glucose (de 5 à 20 mmol/L) ne devrait, en théorie, pas conduire à une augmentation massive de l'entrée de glucose dans la cellule  $\beta$  grâce à l'expression de GLUT1 et GLUT3. Finalement il n'existe aujourd'hui pas encore de consensus à ce propos et nous pouvons émettre l'hypothèse que GLUT1 et GLUT3 sont exprimés dans les cellules  $\beta$  mais joueraient un rôle mineur par rapport à GLUT2.



**Figure 17 : La glycolyse est une voie catabolique de réduction du glucose en pyruvate.**

Cette voie métabolique à un rendement de production d'énergie faible, réduisant 2  $\text{NAD}^+$  et renouvelant 2 ATP par molécule de glucose dégradée. ● : carbone, ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, GTP : guanosine triphosphate, GDP : guanosine diphosphate,  $\text{P}_i$  : phosphate inorganique,  $\text{NAD}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide,  $\text{NADH,H}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, HK : hexokinase, G6PI : glucose-6-phosphate isomérase, FK : fructokinase, PFK : phosphofructokinase, ALD : fructose-bisphosphate aldolase, TPI : triose-phosphate isomérase, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, PGK : phosphoglycérate kinase, PGM : phosphoglycérate mutase, ENO : énalase, PK : pyruvate kinase, ALAT : alanine transaminase, LDH : lactate déshydrogénase, G3PDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénases, GK : glycérolkinase.

### **III. B. 2 La glycolyse, point d'entrée du glucose dans le catabolisme**

Une fois entré dans la cellule, le glucose subit une succession de dix étapes de dégradation médiées par des enzymes, cette voie métabolique est appelée glycolyse (Kumari, 2018). Dans la majorité des cellules, la glycolyse est régulée au niveau de 3 différentes étapes (Chaudhry and Varacallo, 2021). Dans le cas des cellules  $\beta$ , ces étapes sont débridées, permettant de maximiser le flux de carbones du glucose vers le métabolisme mitochondrial (Schuit et al., 1997). Des études utilisant du glucose marqué au carbone 14 sur des cellules  $\beta$  ont mis en évidence que plus de 90% du glucose consommé par ces cellules est intégralement dégradé au cours de la glycolyse laissant moins de 10% pour des voies branchées à cette voie métabolique telles que les voies de la synthèse du glycogène ou des pentoses phosphates (MacDonald, 1993a; Schuit et al., 1997). La glycolyse et différentes voies métaboliques branchées sont représentées en figure 17.

#### **III. B. 2.1 La glycolyse dans les cellules $\beta$**

La première étape de la glycolyse est irréversible en conditions physiologiques. Celle-ci consiste à phosphoryler le glucose en glucose-6-phosphate (G6P) grâce à une hexokinase. Les mammifères possèdent 4 isoformes d'hexokinase avec différentes propriétés. Une étude a mis en évidence que 75% des ARNm d'hexokinase exprimés par les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques de souris et les Min6 sont des ARNm de l'hexokinase 4, aussi appelée glucokinase (GCK) comparé à sa très faible représentation dans les autres tissus, à l'exception du foie (Quintens et al., 2008). Cette observation peut s'expliquer par les propriétés spécifiques de cette isoenzyme. En effet, les hexokinases 1, 2 et 3 ont des faibles constantes de Michaelis ( $K_m$ ) et une grande affinité pour le glucose, atteignant leur vitesse initiale maximale ( $V_{max}$ ) à de faibles concentrations de glucose (Van Schaftingen, 1993; Wilson, 2003). Plus le  $K_m$  d'une enzyme, représentant la concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale de l'enzyme est à la moitié de sa  $V_{max}$ , est élevée et plus cette enzyme aura une activité importante et transformera vite son ou ses substrat(s) en produit(s). La GCK a un  $K_m$  d'environ 5,1mM dans les îlots pancréatiques humain (Bedoya et al., 1986) et de 14,5mM dans les îlots pancréatiques de rat (Bedoya et al., 1986, 1985). Cette concentration est dans l'échelle de concentration physiologique de glucose dans le sang (Lenzen et al., 1987). Cette

propriété permet à l'enzyme d'atteindre sa  $V_{max}$  aux alentours de 10 à 30mM de glucose circulant selon l'espèce, donc n'étant pas limitante à des concentrations physiologiques de glucose. La glucokinase a donc une vitesse s'adaptant à la concentration de glucose dans le cytoplasme permettant à la cellule  $\beta$  d'adapter la vitesse d'entrée de carbone dans la glycolyse. De manière intéressante, le  $K_m$  de la glucokinase pour le glucose est plus faible que celui des transporteurs faisant de cette étape une étape limitante pour la captation ou la détection du glucose par la cellule  $\beta$  à des concentrations de glucose supraphysiologiques.

La glycolyse possède d'autres points de contrôles importants pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. La phosphofructokinase-1 (PFK-1), une enzyme glycolytique convertissant le fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate (Goldhammer and Paradies, 1979), est connue depuis une trentaine d'années comme étant un de ces points de contrôle (Dunaway et al., 1988). L'implication de cette enzyme dans la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  est peu étudiée mais sa position dans la glycolyse et sa déficience chez des patient causant un défaut de sécrétion d'insuline mènent certaines équipes de recherche à émettre l'hypothèse que la PFK-1 joue un rôle nécessaire à la sécrétion d'insuline (Randle, 1993; Ristow et al., 1997). La diminution de l'expression de cette enzyme diminue la sécrétion d'insuline en réponse au glucose chez la souris (Richard et al., 2007). La PFK-1 voit son activité diminuée par l'ATP et le citrate (Kemp and Gunasekera, 2002; Parmeggiani and Bowman, 1963; Sola et al., 1994; Underwood and Newsholme, 1965) permettant comme nous le verrons plus tard, la communication entre la mitochondrie et la glycolyse.

La pyruvate kinase (PK) est un autre point de contrôle de la glycolyse lié à la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  en réponse au glucose. Récemment, cette enzyme a été décrite comme ayant aussi un autre rôle que la simple conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate. En effet, elle catalyse la formation d'un ATP à partir d'un ADP et cette réaction jouerait un rôle dans la balance ATP/ADP permettant la sécrétion d'insuline (Lewandowski et al., 2020) par le biais d'un cycle nécessitant la PK et la phosphoénolpyruvate carboxykinase 2, mitochondriale (PCK2), détaillée plus loin (Stark et al., 2009).

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme permettant la conversion du pyruvate en lactate. Cette enzyme est normalement utilisée dans la glycolyse anaérobie afin de réoxyder le  $NADH, H^+$ , un cofacteur de la glycolyse, en  $NAD^+$ . Cependant les gènes de la lactate



déshydrogénase et du transporteur du lactate sont beaucoup moins exprimés dans les cellules  $\beta$  ainsi que dans des îlots pancréatiques de souris comparés à la majorité des autres tissus (Pullen et al., 2010; Quintens et al., 2008; Sekine et al., 1994). De plus, la régulation de son expression dans les cellules  $\beta$  semble nécessaire à la sécrétion régulée d'insuline en réponse au glucose (Alcazar et al., 2000). Une des explications à ces observations serait de diriger le flux de carbones de la glycolyse jusqu'à la mitochondrie afin de transférer un maximum de carbones issus du glucose extracellulaire jusqu'au métabolisme mitochondrial (Alcazar et al., 2000). La glycolyse étant une voie métabolique nécessitant beaucoup de réduction de cofacteurs, en absence de LDH, la réoxydation des cofacteurs des cellules  $\beta$  est permise par les navettes mitochondriales présentées ci-après (Brun and Maechler, 2016).

La suite de mon exposé se focalise sur les impacts de la glucotoxicité et du diabète sur la glycolyse et altérant la sécrétion d'insuline.

### **III. B. 2.2 Altération de la glycolyse par la glucotoxicité**

La glycolyse étant impliquée dans la détection du glucose, une augmentation chronique de sa concentration induit une adaptation de cette voie métabolique. En effet, une étude de protéomique et transcriptomique sur un modèle de souris diabétiques montre une augmentation du transcrit et de l'expression protéique de la plupart des enzymes de la glycolyse (Haythorne et al., 2019). Malgré l'augmentation des enzymes impliquées dans cette voie métabolique, en condition de glucolipotoxicité, l'utilisation du glucose est réduite d'environ 25% (Haythorne et al., 2019) diminuant la capacité des cellules  $\beta$  dans ces conditions de répondre efficacement à une stimulation au glucose. Malinowski *et al.* ont observé par RMN hyperpolarisée une accumulation de pyruvate, lactate et alanine dans les premières heures de glucotoxicité (Malinowski et al., 2020). Une étude par MS décrit aussi l'augmentation significative de la concentration intracellulaire de plusieurs intermédiaires glycolitiques lors de la glucotoxicité : le glucose, le G6P, le pyruvate et l'alanine (Fernandez et al., 2008). Ces deux études ont aussi montré une accumulation de citrate dans les cellules  $\beta$  lors de la glucotoxicité (Fernandez et al., 2008; Malinowski et al., 2020). En inhibant l'activité de la PFK, le citrate peut en partie expliquer la diminution d'utilisation du glucose par la glycolyse observée dans ces études. L'absence ou l'altération fonctionnelle de la PFK est de plus liée à une forte prédisposition au DT2 non insulino-dépendant (Ristow et al., 1997; Yaney

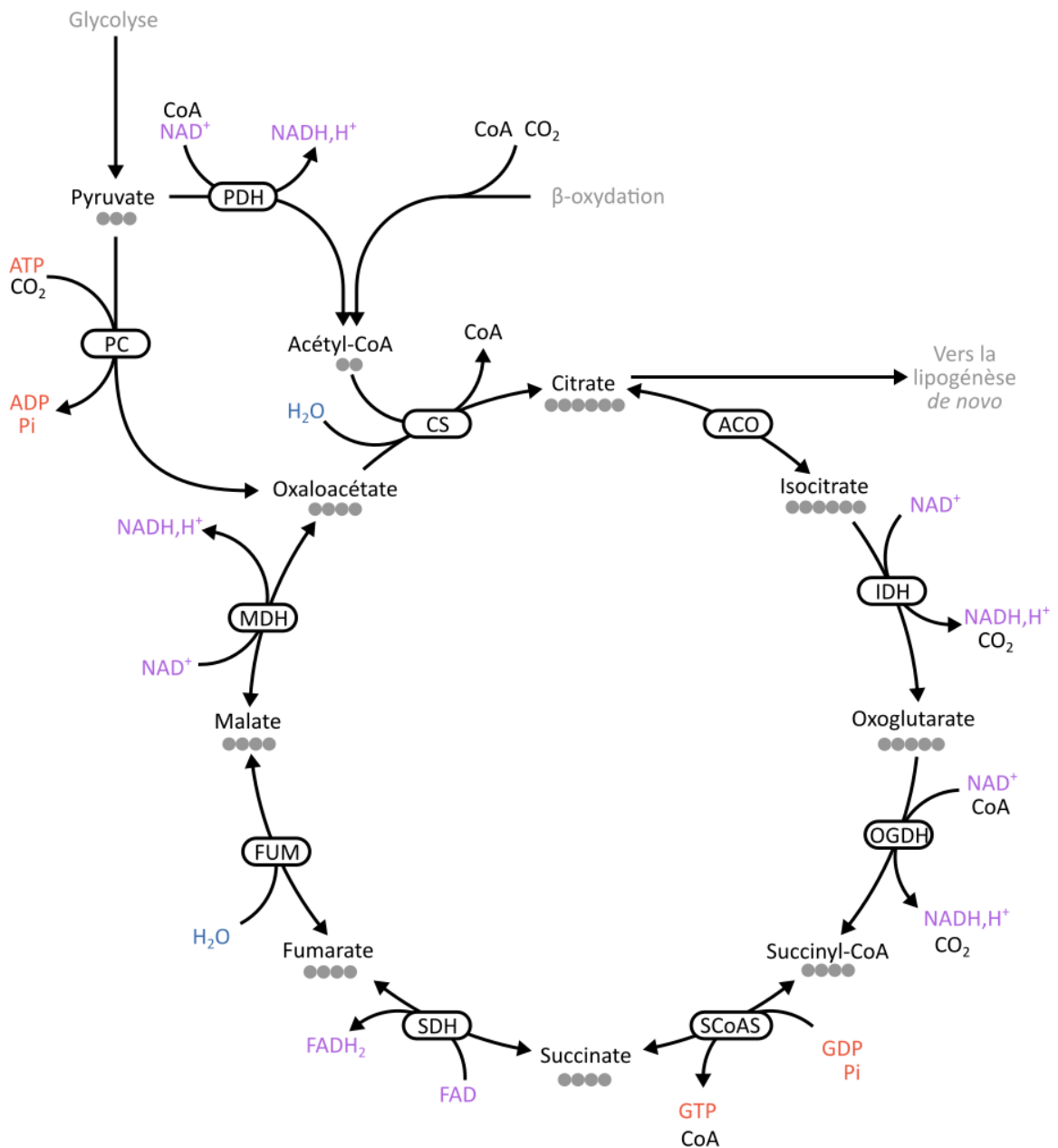
et al., 1995) appuyant son rôle potentiel dans la diminution de la fonction de la cellule  $\beta$  lors du développement de DT2. La diminution de l'activité de la PFK seule n'explique cependant pas l'accumulation de pyruvate et d'alanine dans les cellules  $\beta$  pancréatiques lors de la glucotoxicité. Une des hypothèses possibles à l'altération de la détection du glucose et à l'accumulation d'intermédiaire glycolytique tel que le pyruvate ou l'alanine est la diminution de l'utilisation des métabolites en aval de la glycolyse dès les premières heures de la glucotoxicité. C'est ce que nous allons explorer ici en nous intéressant au cycle de l'acide citrique.

### **III. B. 3 Le cycle de l'acide citrique, une voie métabolique complexe mais essentiel à la cellule $\beta$**

Le cycle de l'acide citrique ou cycle du citrate a été identifié en 1930 lors des travaux d'Albert Szent-Gyorgyi sur le fumarate dans le muscle cardiaque de pigeon, puis finalement décrit en 1937 par Hans Adolf Krebs et William Arthur Johnson, le nommant initialement « Cycle de Krebs ». Cette découverte a permis tout d'abord à Szent-Gyorgyi en 1937 puis à Krebs et Johnson en 1953 de recevoir chacun le prix Nobel de physiologie ou de médecine.

#### **III. B. 3.1 Le cycle du citrate est une voie catabolique complexe**

Chez les eucaryotes, le cycle du citrate prend place dans la mitochondrie uniquement (Martínez-Reyes and Chandel, 2020). Avant de s'intéresser à son implication dans les cellules  $\beta$ , cette partie va nous permettre de comprendre cette voie métabolique ainsi que son implication dans le métabolisme énergétique.



**Figure 18 : Le cycle de l'acide citrique est une voie métabolique reliée à la glycolyse, la lipogénèse et la  $\beta$ -oxydation.**

Cette voie métabolique permet le renouvellement de GTP, la réoxydation d'un grand nombre de cofacteurs ( $\text{NAD}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ). Elle est reliée à la phosphorylation oxydative, qui utilisera les  $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  afin de renouveler une grande quantité d'ATP. Les ronds gris sous le nom des métabolites représentent le nombre de carbone composant le métabolite. ● : carbone, ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, GTP : guanosine triphosphate, GDP : guanosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique,  $\text{NAD}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide,  $\text{NADH, H}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide réduit, FAD : flavine adénine dinucléotide,  $\text{FADH}_2$  : flavine adénine dinucléotide réduite, CoA : Coenzyme A, PDH : pyruvate déshydrogénase, PC : pyruvate carboxylase, CS : citrate synthase, ACO : aconitase, IDH : isocitrate déshydrogénase, OGDH : oxoglutarate déshydrogénase, SCoAS : succinyl-CoA synthétase, FUM : fumarase, MDH : malate déshydrogénase.

Le cycle de l'acide citrique est une voie métabolique cyclique composée de huit réactions. Il est utilisé pour générer de l'énergie et des cofacteurs utilisables par la phosphorylation oxydative à partir de l'oxydation d'acétyl-CoA ou du pyruvate dérivé majoritairement de la glycolyse. Une fois le pyruvate entré dans la mitochondrie il peut soit être directement intégré au cycle de l'acide citrique par l'intermédiaire de la pyruvate carboxylase (PC) sous forme d'oxaloacétate, ou converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), une enzyme catalysant la décarboxylation du pyruvate (Patel and Korotchkina, 2001; Sugden and Holness, 2011). La  $\beta$ -oxydation des acides gras peut aussi être une source d'acétyl-CoA dans la mitochondrie. Le cycle du citrate ainsi que ses liaisons avec d'autres voies métaboliques sont représentés en figure 18.

Il est communément admis que le cycle du citrate commence par une réaction combinant l'acétyl-CoA (2 carbones) pouvant provenir de différentes voies métaboliques avec une molécule d'oxaloacétate (4 carbones) du cycle du citrate pour générer une molécule à 6 carbones : le citrate. Celui-ci peut sortir de la mitochondrie ou être converti en isocitrate pouvant lui aussi quitter la mitochondrie. Puis, deux étapes de décarboxylations oxydatives induisent sa conversion en oxoglutarate (5 carbones) par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) puis en succinyl-CoA (4 carbones) par l'oxoglutarate déshydrogénase (OGDH) induisant la formation de deux molécules de  $\text{CO}_2$  et deux  $\text{NADH, H}^+$ . Le succinyl-CoA est ensuite converti en succinate, cette réaction est en plus couplée avec la régénération du GTP à partir de GDP. La production du fumarate à partir du succinate permet la réduction du FAD en  $\text{FADH}_2$ . Cette réaction est permise par la succinate déshydrogénase, impliquée dans la chaîne respiratoire. Finalement le fumarate est converti en malate, puis en oxaloacétate réduisant un  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH, H}^+$  et permettant un nouveau cycle (Martínez-Reyes and Chandel, 2020) (Figure 18).

La production d'énergie du cycle de l'acide citrique est permise en partie grâce à la production de GTP, pouvant être convertie en ATP, mais surtout grâce à la chaîne respiratoire présentée au chapitre I. Celle-ci est formée de quatre complexes (I, II, III et IV) permettant la formation d'un gradient de protons grâce à l'oxydation des coenzymes générées par le cycle du citrate ( $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ) au travers de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient entraîne la formation d'un flux de proton à travers le domaine ( $\text{F}_0$ ) de l'ATP-synthase permettant le franchissement de la membrane interne mitochondriale depuis l'espace intermembranaire

vers la matrice mitochondriale. Ce flux de proton induit la rotation d'une partie du domaine (F1) de l'ATP-synthase fournissant l'énergie nécessaire à la phosphorylation d'ADP en ATP. Cette réaction est qualifiée de couplage osmo-chimique (Figure 6). Ainsi, grâce à la chaîne respiratoire, chaque NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub> produit permet l'accumulation d'énergie par le gradient de protons. Cette source de production d'ATP est environ 15 fois supérieure à la production d'ATP par la glycolyse seule (Rich, 2003), appuyant l'importance de la mitochondrie dans l'augmentation du ratio ATP/ADP dans la cellule β lors d'une stimulation par le glucose.

Maintenant que le fonctionnement du cycle est décrit, nous allons voir comment celui-ci s'intègre dans le métabolisme de la cellule β pancréatique.

### **III. B. 3.2 L'entrée des carbones venant du glucose dans le cycle du citrate est nécessaire au GSIS**

La stimulation des cellules β avec différentes sources de carbones à différentes concentrations a permis de mettre en évidence que le métabolisme mitochondrial est une étape limitante de la sécrétion d'insuline en cas d'excès de substrat (Antinozzi et al., 2002).

Eto *et al.* ont mis en évidence dès la fin du XX<sup>ème</sup> siècle l'importance de l'ATP dans le GSIS en diminuant la régénération d'ATP par la mitochondrie. En effet, à partir d'un modèle d'îlots murins déficients en une enzyme limitante à la navette glycérol phosphate nécessaire à la génération de l'ATP : la mitochondrial glycérol 3-phosphate déshydrogénase (mGPDH), et l'utilisation d'aminooxyacetate, un inhibiteur de la navette malate aspartate, a permis de mettre en évidence l'altération du GSIS par diminution du renouvellement de l'ATP (Eto et al., 1999). De plus, des études réalisées sur des cellules β où les gènes mitochondriaux encodant les sous unités I, III, IV et V de la chaîne respiratoires ont été supprimés montrent que la sécrétion d'insuline est inhibée bien que l'ATP non mitochondrial permette encore la synthèse et le stockage de l'insuline (Noda et al., 2002). Des études utilisant des métabolites activant la synthèse d'ATP comme le méthyl-succinate, un composé pouvant passer à travers la membrane plasmique, ou le pyruvate ont été réalisées afin de quantifier l'implication de la synthèse d'ATP mitochondrial dans la synthèse et la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques. Pour mener à bien ces expériences des îlots pancréatiques de rats transduits

avec le transporteur de métabolites monocarboxylés, permettant l'entrée du pyruvate dans les cellules  $\beta$ , ont été utilisées. Ces expériences ont permis de placer l'ATP et sa synthèse mitochondriale comme nécessaire et suffisante à la sécrétion d'insuline (Ishihara et al., 2003).

Il existe une relation étroite entre la glycolyse et le métabolisme mitochondrial des cellules  $\beta$  (Malmgren et al., 2009). Dans les cellules  $\beta$ , 80% des carbones issus du glucose sont oxydés, ce qui est sensiblement supérieur au ratio d'autres types cellulaires (Heimberg et al., 1993; Schuit et al., 1997; Sekine et al., 1994). Le pyruvate, produit final de la glycolyse peut entrer dans la mitochondrie via le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC) (Herzig et al., 2012) exprimé dans les cellules  $\beta$  (Patterson et al., 2014). L'inhibition d'un des hétérodimères formant le MPC dans des lignées de cellules  $\beta$ , des îlots de rats et d'humains ou encore l'expression de formes tronquées du MPC dans des souris diminue le GSIS (Patterson et al., 2014; Vigueira et al., 2014). Les souris exprimant un MPC tronqué sont caractérisées par une capacité réduite d'oxydation mitochondriale du pyruvate ainsi qu'une hyperglycémie après administration orale de glucose. De plus les îlots isolés de ces souris présentent un défaut de GSIS sans modification de la réponse au  $Ca^{2+}$  (Vigueira et al., 2014) mettant en avant l'importance de l'entrée des carbones dans la mitochondrie lors du GSIS. Ces données permettent de conclure qu'il existe une relation étroite entre la glycolyse et le métabolisme mitochondrial des cellules  $\beta$  (Malmgren et al., 2009). Le rôle du transporteur MPC et le métabolisme mitochondrial sont donc des acteurs essentiels au GSIS et ainsi à la régulation de l'homéostasie glucidique par les cellules  $\beta$ .

Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est utilisé par la PC ou la PDH. Dans les cellules  $\beta$ , la faible conversion du pyruvate en lactate rend le devenir du pyruvate dépendant des activités de ces deux enzymes (Sugden and Holness, 2011). La PC est une enzyme ATP-dépendante catalysant la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate (Wallace et al., 1998). Cette réaction permet une intégration directe des carbones du pyruvate dans le cycle du citrate. Plusieurs études de fluxomique par RMN  $^{13}C$  suggèrent indirectement que la PC est une enzyme importante pour la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques (Cline et al., 2004; Lu et al., 2002). De plus, d'autres études utilisant des métabolites marqués au  $^{14}C$  mettent en avant que le taux de carboxylation du pyruvate est corrélé avec la quantité d'insuline sécrétée par des îlots pancréatiques de rats (MacDonald, 1993a, 1993b). Une autre

étude a permis de déterminer que la sécrétion d'insuline était diminuée lors de la réduction de l'expression de la PC dans des cellules INS-1 (Xu et al., 2008a). Dans ces mêmes conditions, l'activité de la PDH est augmentée, indiquant un possible mécanisme compensatoire lors de la sécrétion d'insuline (Xu et al., 2008a). La PDH est la deuxième voie d'entrée du pyruvate dans le cycle du citrate. Cette enzyme est inhibée par sa phosphorylation par les pyruvates déshydrogénases kinases (PDK), existantes sous quatre isoformes : PDK1-4. Lors d'expérience d'extinction de gène codant pour PDK1 dans un modèle INS-1, l'augmentation de l'activité de la PDH augmente la quantité de métabolites dans le cycle de l'acide citrique permettant la potentialisation du GSIS (Krus et al., 2010). Toutes ces observations positionnent l'entrée de carbones provenant de la glycolyse dans le cycle de l'acide citrique comme une étape cruciale de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Jusqu'à maintenant nous avons vu l'importance de la régulation de l'entrée des carbones dans la mitochondrie et leur insertion dans le cycle de l'acide citrique. Nous allons maintenant nous intéresser à leurs implications dans le cycle du citrate et le lien de cette voie métabolique avec la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

### **III. B. 3.3 Une régulation fine du cycle de l'acide citrique est nécessaire à la sécrétion régulée d'insuline**

De par son importance dans la formation d'énergie dans les cellules eucaryotes, le cycle du citrate a plusieurs régulations. Il a été remarqué depuis les années 1950 que la vitesse de régénération et d'utilisation de l'ATP ne corrélait pas avec la quantité de ses précurseurs : ADP ou Pi (Devin and Rigoulet, 2007; Hill, 1950). De plus, dans plusieurs types cellulaires, il est rapporté que la concentration d'ATP est maintenue à un niveau constant (Balaban, 2006, 2002; Hill, 1950; Hochachka and McClelland, 1997), impliquant une régulation métabolique fine de l'activité des enzymes mitochondriales permettant la régénération optimale de l'ATP pour son maintien dans l'équilibre homéostatique cellulaire.

#### **Les oscillations de la quantité des métabolites mitochondriaux**

Il a été remarqué que l'ajout de glucose sur des cellules INS-1 provoquait des oscillations de la concentration du citrate (MacDonald et al., 2003). L'ajout de pyruvate sur des

mitochondries isolées d'INS-1 ou d'îlots pancréatiques de rats induisent aussi des oscillations de la concentration du citrate sécrété par les mitochondries (MacDonald et al., 2003). Ces oscillations sont corrélées avec celles d'autres facteurs mitochondriaux tels que l'ATP ou le NAD(P) mettant en avant l'importance de cet organite dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (MacDonald et al., 2003). De plus, par son action inhibitrice de la PFK-1 dans la glycolyse (Kemp and Gunasekera, 2002, p. 2002; Parmeggiani and Bowman, 1963; Sola et al., 1994; Underwood and Newsholme, 1965), il est proposé que le citrate sécrété par les mitochondries de cellules  $\beta$  pancréatiques joue un rôle de messenger synchronisant la glycolyse et le métabolisme mitochondrial (MacDonald et al., 2003). Finalement, une autre étude démontre que ces oscillations sont à même d'affecter les oscillations calciques permettant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Deeney et al., 2001).

### **Le $\text{Ca}^{2+}$ joue un rôle primordial dans la régulation du cycle du citrate et la chaîne respiratoire en lien avec la sécrétion d'insuline**

Dans les années 1960, la mitochondrie est décrite comme pouvant consommer du  $\text{Ca}^{2+}$  (Deluca and Engstrom, 1961). Aujourd'hui, le  $\text{Ca}^{2+}$  est admis comme jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme menant à la régénération de l'ATP en modulant l'homéostasie cellulaire (Balaban, 2009; Cárdenas et al., 2010; Denton et al., 1980; Denton and McCormack, 1980; Hansford, 1991; McCormack et al., 1990a). Cette régulation est permise grâce à une modulation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie comme l'ont montré différentes études depuis les années 1990 (Duchen, 2000; Ricken et al., 1998; Rizzuto et al., 1994; Rizzuto and Pozzan, 2006; Robert et al., 2001; Trollinger et al., 2000). La découverte des uniporteurs calciques mitochondriaux MCU a permis d'expliquer plus finement les flux calciques impliqués dans la génération d'ATP (De Stefani et al., 2011; Jm et al., 2011).

Dans notre laboratoire, nous avons étudié les transferts calciques et leur perturbation dans les cellules  $\beta$  mais aussi les cellules insulino-sensibles. Comme décrit précédemment, Dingreville *et al.* ont montré que la perturbation de l'homéostasie calcique par la modification des MAMs est associée avec la perte de fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Dingreville et al., 2019; Madec et al., 2013). Ces travaux du laboratoire renforcent d'autres études montrant l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'activation mitochondriale, la génération d'ATP ainsi que dans la



sécrétion d'insuline (Wiederkehr and Wollheim, 2008, 2006). D'autres études ont aussi montré que la prolongation du signal mitochondrial du  $\text{Ca}^{2+}$  potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans des îlots pancréatiques de rats (Lee et al., 2003). La PDH, l'IDH et l'OGDH, trois déshydrogénases impliquées dans le cycle du citrate, ont été étudiées dans différents tissus incluant les cellules  $\beta$ . Celles-ci peuvent être stimulées par le  $\text{Ca}^{2+}$ , induisant une augmentation de la respiration et de la production de  $\text{CO}_2$  (Denton and McCormack, 1990; Glancy and Balaban, 2012; Satrústegui et al., 2007). La PDH est régulée de manière indirecte par le  $\text{Ca}^{2+}$  contrairement à l'IDH et l'OGDH qui voient leurs activités directement régulées par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Rossi et al., 2019) (Figure 19A). Des oscillations calciques mitochondriales observées par Tarasov et son équipe en 2013 ainsi que Gilon et son équipe en 2014 sur des îlots de souris et des cellules  $\beta$  leurs permettaient d'appuyer l'hypothèse proposée en 2002 par Kennedy et son équipe au sujet de l'activation des déshydrogénases mitochondriales par le  $\text{Ca}^{2+}$  lors de la stimulation au glucose (Gilon et al., 2014; Kennedy et al., 2002; Tarasov et al., 2013). De plus, plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire ont une activité directement augmentée par le  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial.

Nous allons voir maintenant plus précisément l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la PDH, les IDHs mitochondriales, l'OGDH et la chaîne respiratoire.

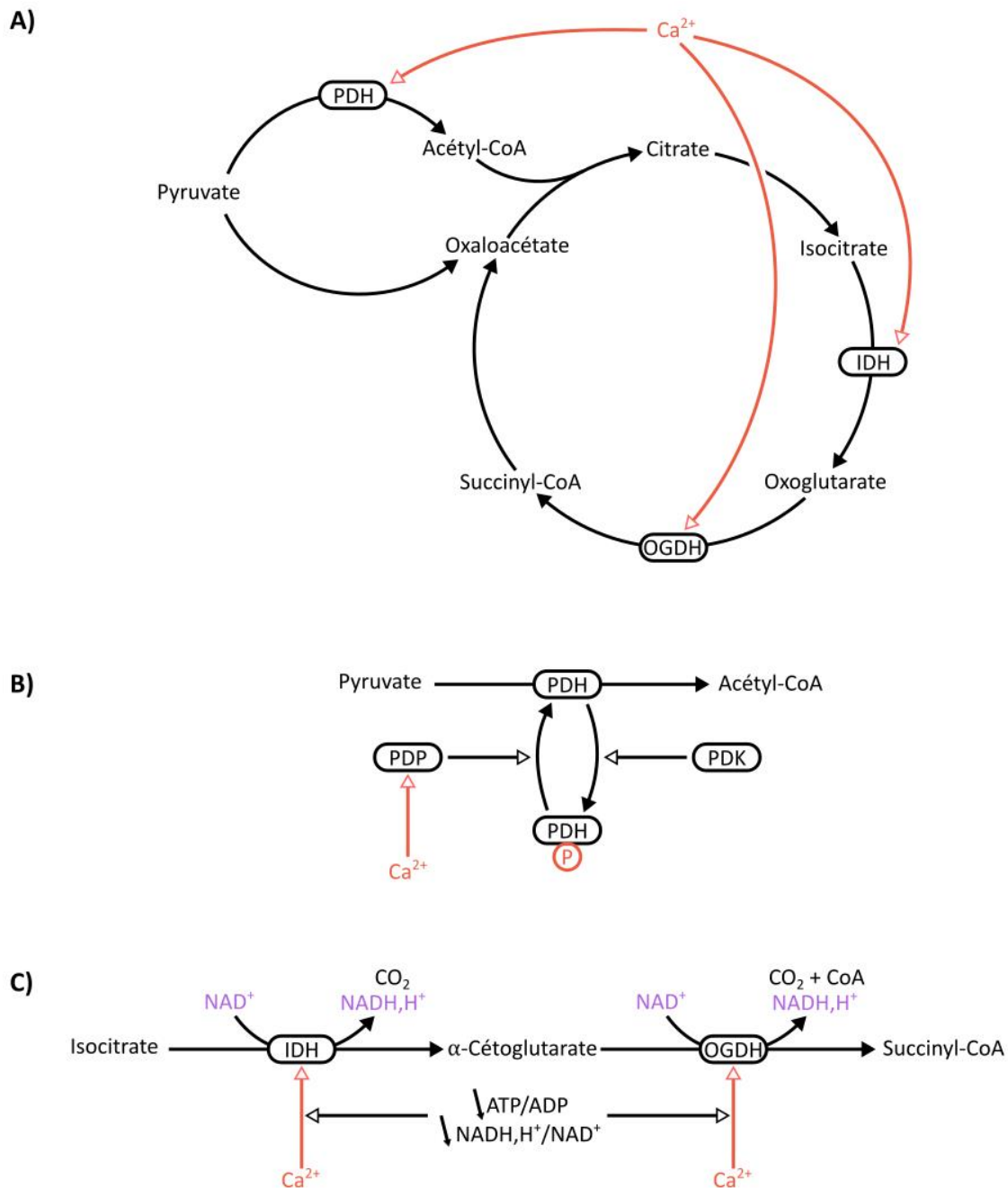
### **La régulation indirecte de la PDH par le $\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial**

Le statut de phosphorylation de la sous unité E1 de la PDH permet sa régulation. La forme non-phosphorylée permet son activation au contraire de sa forme phosphorylée. L'état de phosphorylation de l'enzyme est dynamique et peut notamment répondre à la concentration en pyruvate, son substrat, dans la mitochondrie (Sale and Randle, 1981, 1980). La phosphorylation de cette sous-unité est catalysée par des PDK et sa déphosphorylation par la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP). La PDP est activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  induisant la déphosphorylation de la sous unité E1 de la PDH et donc son activation (Aponte et al., 2009; Hopper et al., 2006; Randle et al., 1974). La hausse de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie stimule la PDP, augmentant l'activité de la PDH de manière indirecte par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Denton, 2009). A l'inverse, la diminution des transferts calciques du réticulum endoplasmique à la mitochondrie augmente la forme inactive de la PDH diminuant la régénération de l'ATP par la mitochondrie (Mallilankaraman et al., 2012) (Figure 19B). Ces observations sont

cohérentes avec l'augmentation de l'activité de la PDH lors d'une stimulation au glucose (McCormack et al., 1990b) et la rapide diminution du pyruvate observées dans les cellules  $\beta$  de hamster en réponse au  $\text{Ca}^{2+}$  (Civelek et al., 1996).

### **La régulation directe des IDHs et de l'OGDH par le $\text{Ca}^{2+}$ mitochondrial**

Il existe trois différentes IDHs : IDH1 et IDH2, partageant 70% d'homologie de séquence et une grande similarité de structure et les IDH3. Les IDHs ont des localisations et des cofacteurs différents en fonction de leur isoforme. En effet, IDH1 est cytosolique et  $\text{NADP}^+$  dépendant contrairement à IDH2 et IDH3 toutes deux mitochondriales mais respectivement  $\text{NADP}^+$  et  $\text{NAD}^+$  dépendantes. De par sa localisation, IDH1 est moins intéressante pour notre étude que les IDH2 et 3 participant toutes deux au cycle du citrate. En effet, bien que dans les cellules  $\beta$ , le KO de IDH2 ou IDH3 permet de mettre en avant un mécanisme de compensation maintenant le cycle du citrate et permettant la sécrétion d'insuline, le KO de ces deux isoformes mitochondriales rend les cellules  $\beta$  inaptes à la sécrétion d'insuline (Michael J. MacDonald et al., 2013). La modulation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial est décrite depuis les années 1980 comme jouant un rôle important dans la régulation de l'IDH3 sans pour autant être essentiel à son fonctionnement (Aogaichi et al., 1980). L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie stimule l'enzyme mais est pondérée par l'augmentation des ratios  $\text{ATP/ADP}$  et  $\text{NAD(P)H,H}^+/\text{NAD(P)}^+$ . En effet, plus ceux-ci seront faibles et plus l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sera élevé sur l'activité de l'IDH3 (Denton, 2009; Denton et al., 1978; Qi et al., 2011; Rutter and Denton, 1988). L'IDH2 quant à elle est étroitement associée au complexe PDC (Huret and Dessen, 2017) qui comme nous l'avons vu précédemment est activé par le  $\text{Ca}^{2+}$ . (Figure 19B). De plus, lors de stimulations d'îlots de souris par le glucose, les oscillations de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitochondrial sont corrélées avec des variations de concentration de  $\text{NAD(P)H}$ ,  $\text{H}^+$ , témoignant de l'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  des IDHs mitochondriales et d'autres enzymes du cycle du citrate (Luciani et al., 2006).



**Figure 19 : Des régulations des déshydrogénases mitochondriales par le  $\text{Ca}^{2+}$ .**

A) Le  $\text{Ca}^{2+}$  augmente l'activité de la PDH, des IDH et de l'OGDH. B) Mécanisme de régulation de la PDH. Sous forme déphosphorylée la PDH est activée contrairement à sa forme phosphorylée. La PDP, activée par le  $\text{Ca}^{2+}$  induit la déphosphorylation de la PDH contrairement aux PDKs qui elles la phosphorylent. C) Mécanisme de régulation directe des IDHs mitochondriales et de l'OGDH par le  $\text{Ca}^{2+}$ . L'activation de ces enzymes permet la synthèse de succinyl-CoA à partir d'isocitrate dans le cycle du citrate. PDH : pyruvate déshydrogénase, PDP : pyruvate déshydrogénase phosphatase, PDK : pyruvate déshydrogénase kinase, IDH : isocitrate déshydrogénase, OGDH : oxoglutarate déshydrogénase, ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate,  $\text{P}_i$  : phosphate inorganique,  $\text{NADP}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate,  $\text{NADPH,H}^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate dinucléotide réduit, CoA : Coenzyme A.

L'OGDC est une association de trois enzymes permettant la décarboxylation oxydative de l'oxoglutarate, le transfert d'un groupement succinyl au coenzyme A et permettant la production de NADH,H<sup>+</sup>. L'OGDH est la deshydrogénase de ce complexe. Plusieurs études ont mis en évidence que cette enzyme est régulée allostériquement par ses substrats et cofacteurs mais aussi par les ions calciques. L'augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> résulte en un abaissement du Km de l'enzyme augmentant l'affinité avec son substrat ainsi le flux de carbone à travers cette enzyme (Lawlis and Roche, 1981; McCormack and Denton, 1979; Panov and Scarpa, 1996; Qi et al., 2011). La diminution des ratios ATP/ADP et NADH,H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> rendent l'OGDH plus sensible au Ca<sup>2+</sup> (Rutter and Denton, 1989) (Figure 19C). Dans les îlots pancréatiques de rats, il est rapporté que lors d'une stimulation au glucose, l'accumulation de Ca<sup>2+</sup> mitochondrial double l'activité de l'OGDH (Sener et al., 1990).

### **La modulation de l'activité de la chaîne respiratoire par le Ca<sup>2+</sup>**

La modulation de la génération d'ATP par le Ca<sup>2+</sup> mitochondrial n'implique pas seulement les enzymes directement impliquées dans le cycle du citrate. En effet, les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire sont décrits comme étant directement stimulés par le Ca<sup>2+</sup> dans des mitochondries isolées augmentant sa vitesse (Glancy et al., 2013; Territo et al., 2000). De plus l'ATP-synthase est aussi activée par le Ca<sup>2+</sup> (Territo et al., 2000). L'augmentation de l'activité de ces enzymes en cas d'influx de Ca<sup>2+</sup> mitochondrial au cours du GSIS permettrait aussi d'augmenter la balance ATP/ADP dans les cellules β permettant la sécrétion d'insuline en réponse au stimulus.

Les observations décrites sur différents modèles de cellules β sont cohérentes avec l'activation du cycle de l'acide citrique par le Ca<sup>2+</sup> mitochondrial, permettant l'augmentation de l'activité globale du cycle du citrate. De plus, la potentialisation de la chaîne respiratoire par le Ca<sup>2+</sup> permet l'augmentation du renouvellement de l'ATP. Finalement, toutes ces données permettent de définir le Ca<sup>2+</sup> mitochondrial comme un acteur majeur de la potentialisation du métabolisme énergétique des cellules β menant à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Malgré cela, d'autres cofacteurs en plus de l'ATP sont nécessaires à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose comme le NADPH,H<sup>+</sup>. Certaines équipes de chercheurs estiment que des navettes mitochondriales, que nous allons parcourir dans le paragraphe suivant permettent l'augmentation de ces cofacteurs.

### **III. B. 3.4 Les navettes mitochondriales, une autre manière de régénérer des cofacteurs et potentialiser la réponse des cellules $\beta$ lors d'une stimulation au glucose**

Dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, les carbones jouant un rôle dans le métabolisme mitochondrial ne sont pas tous utilisés en vue d'alimenter la chaîne respiratoire. En effet, plusieurs études démontrent que lors du GSIS, l'augmentation de la concentration d'intermédiaires du cycle du citrate induit leur export dans le cytosol. De ce fait, ces intermédiaires sont impliqués dans des navettes mitochondriales, nécessaires à la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Farfari et al., 2000; MacDonald, 1995). L'utilité de ces navettes est encore discutée mais leurs nécessités ainsi que leurs implications dans la régénération de cofacteurs nécessaires à la sécrétion d'insuline comme le NADPH, H<sup>+</sup> leur confèrent un rôle clé pour la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Jitrapakdee et al., 2010). Ces différentes navettes sont représentées en figure 20.

#### **La navette pyruvate/malate**

Lors d'une stimulation au glucose, l'abondance du pyruvate entrant dans la mitochondrie induit une augmentation d'OAA (MacDonald, 1995). Celui-ci peut être utilisé par la malate déshydrogénase mitochondriale catalysant la formation du malate (Jitrapakdee et al., 2010). Le malate produit peut sortir de la mitochondrie et être oxydé par l'enzyme malique cytosolique pour produire du pyruvate qui retourne ensuite dans la mitochondrie (MacDonald, 1995). Cette navette nécessite le NADP<sup>+</sup> cytosolique comme cofacteur induisant la production de NADPH, H<sup>+</sup> dans le cytosol (Figure 20). La réelle nécessité de cette navette comme support du GSIS est encore discutée de nos jours car plusieurs études montrent des résultats contradictoires. En effet certaines études montrent que la suppression de l'enzyme malique cytosolique par siRNA ou knock-down (KD) diminue le GSIS dans des cellules INS-1 (Guay et al., 2007; Pongratz et al., 2007). De plus la réduction de l'activité de l'enzyme malique cytosolique de 50% induit une réduction de 50% du GSIS (Xu et al., 2008b). Au contraire, d'autres études montrent que la suppression ou le KD de cette enzyme dans des îlots pancréatiques de rats, de souris ou d'INS-1 n'induit pas de modification de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Brown et al., 2009; MacDonald and Marshall, 2001; Ronnebaum et al., 2008). Finalement, il est possible que cette voie métabolique permettant

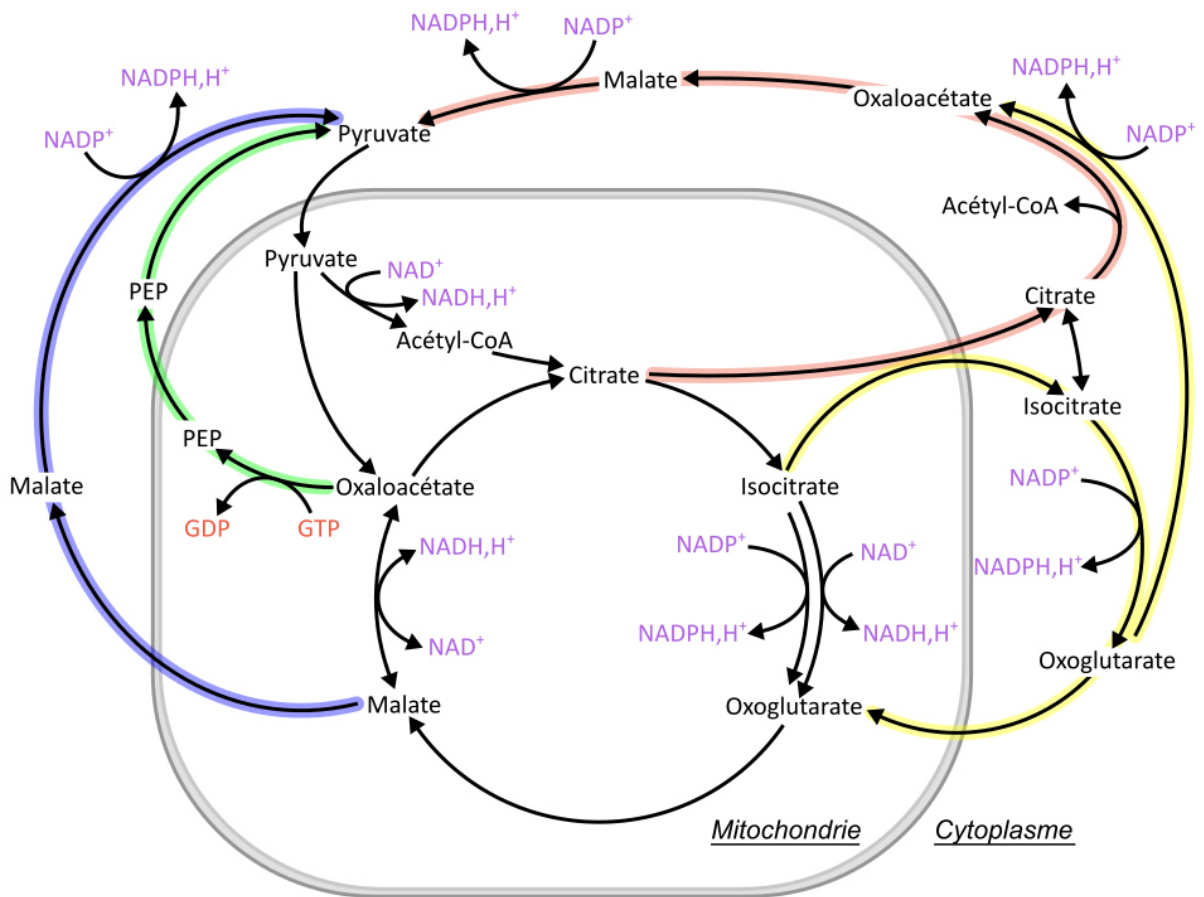
la production de NADPH,H<sup>+</sup> supportant la sécrétion d'insuline bénéficie de redondances métaboliques permettant, malgré sa suppression, une sécrétion normale d'insuline dans certains modèles et certaines conditions (Jitrapakdee et al., 2010).

### **La navette pyruvate/citrate et acyl-CoAs**

Lors d'une stimulation avec de fortes quantités de glucose, le citrate est plus fortement sécrété dans le cytoplasme par la mitochondrie via le transporteur dicarboxylate/tricarboxylate (Dolce et al., 2014; Farfari et al., 2000). Une fois dans le cytoplasme, le citrate peut être le substrat de l'ATP citrate lyase (ACLY), produisant une molécule d'oxaloactétate (OAA) et un acetyl-CoA en hydrolysant une molécule d'ATP en ADP (Feng et al., 2020). L'OAA est alors converti en malate par la malate déshydrogénase, puis en pyruvate par l'enzyme malique cytosolique catalysant la formation d'un NADPH,H<sup>+</sup>. L'acétyl-CoA produit peut entrer dans la voie de la lipogénèse discutée dans une partie ci-après (Farfari et al., 2000; Jitrapakdee et al., 2010) (Figure 20). L'inhibition pharmacologique du transporteur dicarboxylate/tricarboxylate inhibe le GSIS dans des cellules INS-1 mettant en avant la nécessité de la sécrétion du citrate mitochondrial dans le cytosol lors de la sécrétion régulée de l'insuline (Guay et al., 2007).

### **La navette pyruvate/isocitrate**

La navette pyruvate/isocitrate utilise l'isocitrate produit par le cycle du citrate et sécrété hors de la mitochondrie via le transporteur citrate/isocitrate (Dolce et al., 2014). Celui-ci est ensuite converti en oxoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase cytosolique nécessitant du NADP et produisant du NADPH,H<sup>+</sup>. L'oxoglutarate peut être soit converti en OAA et compléter la navette de manière similaire à la navette pyruvate/citrate en retournant dans la mitochondrie sous forme de pyruvate ou peut directement retourner sous forme d'oxoglutarate dans la mitochondrie (Jitrapakdee et al., 2010) (Figure 20). Cette navette est décrite comme étant nécessaire au bon fonctionnement du GSIS. En effet, l'utilisation de siRNA contre le transporteur citrate/isocitrate ou la suppression de l'IDH1, cytosolique et dépendante du NADP<sup>+</sup>, induisent tous deux la diminution du ratio NADPH,H<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> ainsi que celle du GSIS dans des cellules INS-1 et des îlots pancréatiques isolés de rat (Joseph et al., 2006; Ronnebaum et al., 2006).



**Figure 20 : Représentation des navettes et cycles mitochondriaux présentés autour du cycle du citrate en lien avec la sécrétion d'insuline.**

La navette pyruvate/malate (bleu), la navette pyruvate/citrate (rouge), la navette pyruvate/isocitrate (jaune) et le cycle du phosphoénolpyruvate (vert). GTP : Guanosine triphosphate, GDP : Guanosine diphosphate, PEP : phosphoénolpyruvate,  $NADP^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate,  $NADPH, H^+$  : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate dinucléotide réduit, CoA : Coenzyme A.

### **Le cycle du phosphoénolpyruvate via la mitochondrie**

Le cycle du PEP est permis grâce à la mitochondrie dans les cellules  $\beta$ . Celui-ci est nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lewandowski et al., 2020). Le GTP produit par la mitochondrie a aussi été montré comme nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose indépendamment des canaux potassiques et l'inhibition de celle-ci inhibe la sécrétion d'insuline (Kibbey et al., 2007). Ces deux acteurs jouent un rôle majeur dans la balance ATP/ADP des cellules  $\beta$  pancréatiques. En effet, le PEP provenant de la glycolyse est converti en pyruvate puis en OAA comme décrit précédemment. Une fois formé, l'OAA peut être converti en PEP par la PCK2, nécessitant la transformation d'un GTP en GDP. Le PEP ressort de la mitochondrie par un transporteur pour boucler le cycle induisant l'augmentation de la balance ATP/ADP stimulant la sécrétion d'insuline (Stark et al., 2009) (Figure 20). L'importance de ce cycle dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est soulignée par l'utilisation de souris déplétées en PCK2 qui malgré un activateur de la PK voient leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose diminuée (Abulizi et al., 2020).

Le cycle du citrate, l'impact du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial sur le renouvellement de l'ATP et les navettes mitochondriales sont nécessaires en vue de sécréter de l'insuline en réponse au glucose. Lors du DT2, de la gluco- et/ou lipotoxicité les perturbations de l'homéostasie de ces acteurs sont des facteurs majeurs de la perte de fonction de la cellule  $\beta$ . C'est ce que nous allons voir dans la prochaine partie traitant de ce sujet.

#### **III. B. 3.5 Le métabolisme mitochondrial est très impacté par la glucolipotoxicité**

Notre équipe a récemment montré que la glucotoxicité réduit la respiration des cellules  $\beta$  pancréatiques (Dingreville et al., 2019). La mitochondrie et son métabolisme énergétique sont aussi touchés au bout de 24h d'exposition à une mixture d'acide gras (Velasquez et al., 2017). De récentes études décrivent une diminution de la quantité d'ARNm de protéines de la chaîne respiratoire d'îlots humains lors de la gluco- ou la lipotoxicité (Brun et al., 2015; Brun and Maechler, 2016). Haythorne et son équipe mettent aussi en avant un découplage de protons dans les mitochondries de souris diabétiques, ne permettant pas la création efficace du gradient de protons par la chaîne oxydative et le renouvellement de l'ATP lors d'une



augmentation de glucose (Haythorne et al., 2019). Cette observation peut être expliquée par d'autres études s'intéressant plus particulièrement à UCP2. En effet, la lipotoxicité causée par des acides gras à longues chaînes stimule UCP2 réduisant la transduction du signal du GSIS entre l'entrée de glucose dans la cellule  $\beta$  et la production d'ATP par la chaîne oxydative (Ježek et al., 2015). Des études sur des patients diabétiques aboutissent à la même conclusion, la stimulation de UCP2 causée par un excès de substrat énergétique diminue la production d'ATP réduisant la sécrétion d'insuline des îlots pancréatique (Anello et al., 2005). Finalement, en plus de réduire le métabolisme mitochondrial impactant la formation de cofacteurs permettant la phosphorylation et le renouvellement de l'ATP, la glucolipotoxicité cause aussi une diminution de l'efficacité de la chaîne respiratoire ainsi qu'un découplage des protons dans la mitochondrie. Ces altérations ne permettent pas un renouvellement optimal de l'ATP impactant la fonction des cellules  $\beta$ .

Par son étude de transcriptomique et protéomique sur des souris diabétiques, Haythorne et son équipe ont mis en évidence une diminution de l'expression de la totalité des enzymes du cycle du citrate à l'exception de la PDH et l'OGDH (Haythorne et al., 2019). Dans cet article, Haythorne décrit aussi une augmentation de la quantité de PDK1 (Haythorne et al., 2019). Un résultat cohérent avec d'autres études de transcriptomique réalisées sur des îlots humains de donneurs sains en condition de gluco- et/ou lipotoxicité montrant une augmentation des ARNm de PDK1, PDK2 et PDK4 dans ces différentes conditions (Jimenez-Sánchez et al., 2020) ainsi que sur des INS-1E en condition de glucotoxicité (Brun et al., 2013). L'augmentation des PDKs aboutissant à la phosphorylation inhibitrice de la PDH, l'activité de cette dernière s'en retrouve diminuée. Ces résultats sont cohérents avec la réduction du GSIS observée à la suite de la diminution de l'activité de PDH lors d'une surexposition chronique au glucose (Liu et al., 2004; Wallace et al., 2013). L'étude d'Haythorne et son équipe ont aussi mis en avant sur des souris ayant subi une induction de DT2 une quantité plus faible d'IDH2 que les souris contrôles mettant en avant cette protéine dans la régulation de la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques (Haythorne et al., 2019). De plus, suite à 72h de glucotoxicité, l'expression des transporteurs du malate, du citrate, de l'OAA ou du glutamate est augmentée contrairement à celle du transporteur du pyruvate (Brun and Maechler, 2016). Ces observations peuvent expliquer l'accumulation de citrate observée par RMN hyperpolarisée dès les premières heures de glucotoxicité (Malinowski et al., 2020) ainsi que d'autres

métabolites impliqués dans le métabolisme mitochondrial : le fumarate et le malate (Fernandez et al., 2008). Finalement, ces observations permettent de confirmer la congestion du flux métabolique sur l'axe glycolyse-cycle du citrate expliquant l'accumulation de métabolite glycolytique décrite précédemment en plus de mettre en avant une possible fuite de certains métabolites du cycle du citrate.

Les impacts décrits sur les MAMs dans notre équipe par la glucotoxicité (Dingreville et al., 2019), la lipotoxicité et le DT2 (Thivolet et al., 2017) altèrent les transferts calciques mitochondriaux ne permettant plus l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  mitochondrial lors d'une stimulation au glucose. De ce fait la stimulation au glucose ne permet pas l'activation de la PDC, l'augmentation de l'activité d'OGDH, des IDHs, de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase réduisant d'autant plus le flux mitochondrial et l'efficacité du renouvellement d'ATP tous deux nécessaires à la sécrétion d'insuline dans ces conditions. La diminution de l'utilisation des métabolites mitochondriaux peut induire leurs accumulations et leurs détournements vers d'autres voies métaboliques.

Ces observations nous permettent de conclure que le défaut de fonctionnement du métabolisme mitochondrial induit la sécrétion de la mitochondrie de plusieurs métabolites comme le citrate. Ces métabolites peuvent alors être utilisés par la lipogénèse *de novo* aussi nécessaire au fonctionnement de la cellules  $\beta$ .

### **III. B. 4 La synthèse de lipides, une voie impliquée dans la fonction de la cellule $\beta$**

La synthèse lipidique ou lipogénèse *de novo* est la voie métabolique de synthèse des acides gras. Couplés à des coenzymes A, ces acides gras forment des acyl-CoA. Les acides gras peuvent être liés au glycérol-3-phosphate par estérification formant des triglycérides utilisés dans le stockage de l'énergie (Ameer et al., 2014) et la synthèse membranaire. La lipogénèse *de novo* se déroule principalement dans le tissu adipeux. Le foie peut aussi être considéré comme un contributeur mineur de l'homéostasie des triglycérides dans le sérum (Björntorp and Sjöström, 1978). Les cellules  $\beta$  pancréatiques ont le matériel protéique permettant la synthèse d'acides gras et celui-ci est nécessaire pour sa fonction de sécrétion d'insuline en réponse au glucose *in vivo* (Dobbins et al., 1998) et *ex vivo* (Prentki et al., 2020; Roduit et al.,

2004). Le mécanisme par lequel la synthèse d'acyl-CoA dans les cellules  $\beta$  est impliqué dans la sécrétion d'insuline en réponse à un stimulus n'est pas encore bien compris (Deeney et al., 2000; Roduit et al., 2004, p. 204) mais certaines études indiquent que leur production peut modifier la capacitance membranaire (Ammälä et al., 1993; Neher and Marty, 1982) augmentant la fusion des granules d'insuline avec la membrane plasmique (Deeney et al., 2000).

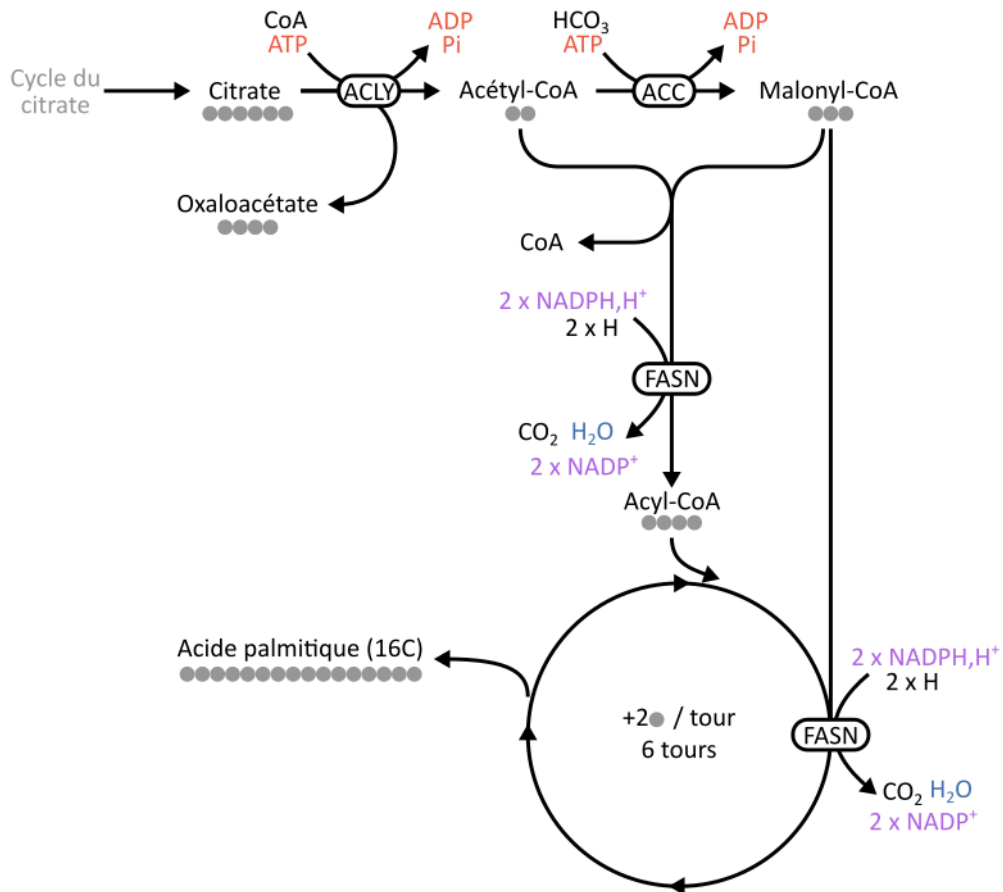
La synthèse de lipides *de novo* ou lipogénèse *de novo*, se déroule en plusieurs étapes, impliquant principalement 3 enzymes : l'ACLY, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la synthase d'acide gras de mammifères, plus communément appelée fatty acid synthase (FAS). Cette voie métabolique nécessite aussi des précurseurs carbonés venant du cycle de l'acide citrique sous forme de citrate, quittant la mitochondrie par le transporteur dicarboxylate/tricarboxylate (Dolce et al., 2014) (Figure 21).

### **III. B. 4.1 Les différentes étapes de la lipogénèse**

Une fois sortie de la mitochondrie, le citrate peut être le substrat de l'ACLY, une enzyme cytoplasmique fortement exprimée dans les îlots pancréatiques humains et de rat (M. J. MacDonald et al., 2013). Le citrate est clivé par l'ACLY, donnant un acétyl-CoA et un OAA. Cette réaction est permise par l'hydrolyse concomitante d'une molécule d'ATP en ADP et Pi (Feng et al., 2020). Une fois formé, l'OAA est utilisé par la navette pyruvate/citrate décrite précédemment et l'acétyl-CoA est utilisé comme précurseur lipidique par l'ACC. A partir d'acétyl-CoA, cette enzyme catalyse la formation de malonyl-CoA, une molécule clé dans la formation des acides gras (Brownsey et al., 2006). Cette étape de la biosynthèse lipidique, ATP dépendante, est limitante (Hunkeler et al., 2018). Il existe deux différentes isoformes d'ACC (Hunkeler et al., 2018). ACC1 est la forme prédominante dans les tissus lipogéniques comme le tissu adipeux, le foie mais aussi dans les îlots pancréatiques et la lignée INS-1 alors que ACC2 est retrouvée dans les tissus dits oxydatifs tels que les muscles cardiaque et squelettiques (Abu-Elheiga et al., 2005; MacDonald et al., 2008; Oh et al., 2005; Pender et al., 2006). L'ajout d'une molécule de malonyl-CoA à une molécule d'acétyl-CoA permet la formation d'un acyl-CoA. Cette réaction est catalysée par la FAS, une protéine homodimérique multifonctionnelle catalysant les différentes étapes de formation et élongation de l'acyl-CoA grâce à 6 réactions (Smith et al., 2003). En effet, la FAS est aussi impliquée dans l'élongation des acyl-CoA saturés

jusqu'à l'obtention du palmitate (C16 : 0) par ajouts successifs de deux carbones provenant du malonyl-CoA (Smith et al., 2003) (Figure 21).

Lors d'une stimulation au glucose, la mitochondrie sécrète du citrate dans le cytosol (Farfari et al., 2000). Cette sécrétion est décrite comme étant nécessaire au GSIS par le biais notamment des navettes mitochondriales décrites précédemment mais la synthèse lipidique semble aussi jouer un rôle dans l'utilisation de ce citrate en lien avec la sécrétion d'insuline (Guay et al., 2007). De plus, la stimulation au glucose induit l'augmentation rapide de la synthèse d'acides gras dans les cellules INS-1 (MacDonald et al., 2008). Le citrate étant un précurseur de la synthèse de lipide, la stimulation au glucose approvisionne en substrats nécessaires à la lipogénèse *de novo*, activant ainsi cette voie. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de l'ACLY diminue la sécrétion d'insuline en réponse au glucose chez le rat *in vivo* (Chen et al., 1994), *ex vivo* (Flamez et al., 2002) et *in vitro* sur la lignée cellulaire INS 832/13 (Guay et al., 2007). Chez l'Homme, il a été mesuré que l'expression de cette enzyme est diminuée de 60% dans les îlots d'individus souffrants d'un défaut de sécrétion d'insuline comparés à des individus sains (MacDonald et al., 2009). L'inhibition chimique de l'ACC et/ou la FAS bloque la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Antinozzi et al., 1998; MacDonald et al., 2008) et la surexpression de la malonyl-CoA carboxylase, catalysant la réaction inverse à l'ACC, induit aussi une diminution du GSIS (Roduit et al., 2004). Ces observations mettent en avant l'importance de la lipogénèse *de novo* et de chacune des enzymes impliquées dans cette voie métabolique pour la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique.



**Figure 21 : La lipogénèse *de novo* permet la synthèse de palmitate à partir de citrate venant du cycle de l'acide citrique.**

La fusion d'un malonyl-CoA avec une molécule d'acétyl-CoA permet la formation d'un acyl-CoA. Cet Acyl-CoA est allongé de 2 carbones à chaque tour du cycle. Au bout de 6 tours, la molécule aura atteint la taille de 16 carbones correspondant au palmitate. ● : carbone, ATP : adénosine-triphosphate, ADP : adénosine diphosphate, Pi : phosphate inorganique, NADP<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADPH, H<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate dinucléotide réduit, CoA : Coenzyme A, ACLY : ATP citrate lyase, ACC : acétyl-CoA Carboxylase, FASN : fatty acid synthase.

### **III. B. 4.2 La glucolipotoxicité altère la synthèse de lipides des cellules $\beta$ pancréatiques**

La lipotoxicité est décrite comme perturbant le métabolisme du palmitate (Cacicedo et al., 2005). L'accumulation d'acyl-CoA et d'acides gras à longues chaînes (C16 – C18) saturés dans le cytoplasme des cellules  $\beta$  induite par la lipotoxicité (Lupi et al., 2002) potentialise la synthèse de céramides, causant des dommages cellulaires et favorisant leur apoptose. Les effets délétères des céramides sur les cellules  $\beta$  peuvent être expliqués de part leur implication dans la transduction du signal d'apoptose des ROS (Cacicedo et al., 2005) et l'inactivation des voies impliquées dans la survie cellulaire (Beeharry et al., 2004). De plus, les îlots pancréatiques de souris diabétiques montrent une augmentation de la quantité d'enzymes impliquées dans la synthèse d'acides gras dont ACLY, ACC et FAS (Haythorne et al., 2019). Cette observation permet d'émettre l'hypothèse qu'une partie des carbones venant du glucose lors de la glucotoxicité est détournée vers la synthèse d'acides gras réduisant les carbones disponibles par le cycle du citrate. Cette hypothèse est cohérente avec la diminution de renouvellement de l'ATP par la mitochondrie décrite précédemment en condition de gluco- et/ou lipotoxicité, impliquant le reroutage des métabolites mitochondriaux.

Toutes ces études montrent que la cellule  $\beta$  pancréatique a besoin d'une situation bien particulière pour fonctionner et permettre la régulation de la glycémie dans l'organisme. Il existe malgré tout des lacunes, notamment concernant les échanges métaboliques entre les cellules  $\beta$  et leur milieu pour mieux caractériser le dérèglement métabolique de ces cellules en condition de glucolipotoxicité. Cependant, les différences entre les modèles immortalisés et murins par rapport à un modèle humain peuvent mener à des conclusions biaisées. L'utilisation d'îlots pancréatiques humains, un matériel rare, permettrait des avancées plus concrètes dans la compréhension des mécanismes conduisant les cellules  $\beta$  à perdre leur fonction dans des conditions de glucolipotoxicité. Finalement, un modèle permettant de relier des altérations cellulaires, comme celles du  $\text{Ca}^{2+}$ , et le métabolisme de ces cellules dans des conditions de glucolipotoxicité permettrait de mieux comprendre l'impact de ces toxicités et du DT2 sur le fonctionnement de la cellule  $\beta$  pancréatique. L'objectif de ces travaux sera de réaliser un modèle plus précis des altérations métaboliques des îlots pancréatiques humains

en conditions de glucolipotoxicité et de savoir si ce modèle est transposable aux îlots pancréatiques de personnes souffrant de DT2.







# Résultats

# **Etude des flux énergétiques par une approche de Résonance Magnétique Nucléaire en temps réel dans des systèmes acellulaires eucaryotes pour la synthèse de protéines**

En première année de Master à l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Lyon, j'ai réalisé un stage de 19 semaines au Centre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à très hauts champs (CRMN). C'est lors de ce stage que je me suis familiarisé avec la métabolomique par RMN dans l'équipe dirigée par Bénédicte Elena-Herrmann. Mon rôle dans cette étude a été de préparer les échantillons en amont de leur acquisition par RMN. Puis j'ai attribué les signaux RMN obtenus aux métabolites correspondants sur des spectres d'échantillons de références en utilisant la base de données en ligne Human Metabolom Database (HMDB). J'ai également phasé et calibré les spectres RMN obtenus avec le logiciel TopSpin afin de préparer leurs analyses ainsi que la quantification absolue des métabolites au cours du temps. J'ai pu tester différentes méthodes de quantification et différents logiciels pour analyser les spectres RMN : quantification relative par Amix, quantification absolue par ChenomX et quantification automatique par la méthode Batman. J'ai finalement participé à l'interprétation des résultats.

L'objectif de cette étude était de comprendre les différences d'efficacité de traduction entre plusieurs systèmes de synthèse protéique acellulaires (CFPS). Une question majeure reposait sur l'utilisation possiblement différente de l'énergie apportée aux systèmes CFPS. Pour étudier les flux énergétiques, nous avons utilisé la RMN en temps réel (RT-RMN). Cette technique de métabolomique permet de mesurer la quantité de plusieurs métabolites au cours du temps sans interférer sur le processus de synthèse protéique qui se maintient dans l'échantillon.

Dans cet article nous avons suivi, dans différents lysats cytoplasmiques issus de lignées cellulaires, l'évolution des concentrations des substrats énergétiques : le glucose et la phosphocréatine. Nous avons aussi suivi le maintien de l'ATP et du GTP, deux intermédiaires énergétiques nécessaires à la synthèse protéique. Au bout de 30mn, le glucose et la phosphocréatine étaient entièrement consommés impactant le renouvellement du GTP et de l'ATP dans les lysats classiques mettant en évidence une forte consommation d'énergie au cours de l'expérience. Le suivi de la consommation énergétique dans un système hybride où la fraction ribosomale était réduite permettait une réduction drastique de la vitesse de consommation des substrats énergétiques. Ces résultats mis en parallèle avec la durée de synthèse protéique pour un lysat classique et un lysat hybride démontraient que la majeure partie de l'énergie était consommée par d'autres voies métaboliques non essentielles à la synthèse protéique. L'approche hybride, se basant sur une réduction de la fraction ribosomale ainsi que la concentration d'enzymes cytoplasmiques, limitait un métabolisme parasite et énergivore. Cette approche hybride s'avérait être une stratégie de choix pour mieux réorienter les substrats énergétiques vers la synthèse protéique.

# Cell-Free Protein Synthesis Enhancement from Real-Time NMR Metabolite Kinetics: Redirecting Energy Fluxes in Hybrid RRL Systems

*Baptiste Panthu*<sup>1</sup>, *Théophile Ohlmann*<sup>2</sup>, *Johan Perrier*<sup>3</sup>, *Uwe Schlattner*<sup>4</sup>, *Pierre Jalinot*<sup>1</sup>, *Bénédicte Elena-Herrmann*<sup>3</sup>, *Gilles J P Rautureau*<sup>3</sup>

1. Univ. Lyon, ENS de Lyon, Univ. Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, 46 allée d'Italie Site Jacques Monod, F-69007 Lyon, France.
2. CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Univ. Lyon, F-69007 Lyon, France.
3. Univ. Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France.
4. Univ. Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics (LBFA), 38058 Grenoble cedex, France.

## Corresponding Author

Pr. Baptiste Panthu

Laboratoire CarMeN : Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition.

INSERM U.1060 / Université Lyon 1 / INRA U.1397 / INSA Lyon / Hospices Civils Lyon

Hôpital Lyon Sud Secteur 2

Bâtiment CENS ELI-2D

165 Chemin du grand Revoyet

F - 69310 PIERRE BENITE

Postale : F-69495 Pierre Bénite CEDEX

Web: <http://carmen.univ-lyon1.fr>

E-mail: [baptiste.panthu@univ-lyon1.fr](mailto:baptiste.panthu@univ-lyon1.fr)



## Cell-Free Protein Synthesis Enhancement from Real-Time NMR Metabolite Kinetics: Redirecting Energy Fluxes in Hybrid RRL Systems

Baptiste Panthu,<sup>\*,†,‡</sup> Théophile Ohlmann,<sup>‡</sup> Johan Perrier,<sup>§</sup> Uwe Schlattner,<sup>||</sup> Pierre Jalinot,<sup>†</sup> Bénédicte Elena-Herrmann,<sup>\*,§,#,¶</sup> and Gilles J. P. Rautureau<sup>§,#,¶</sup>

<sup>†</sup>Univ. Lyon, ENS de Lyon, Univ. Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, 46 allée d'Italie Site Jacques Monod, F-69007 Lyon, France

<sup>‡</sup>CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Univ. Lyon, F-69007 Lyon, France

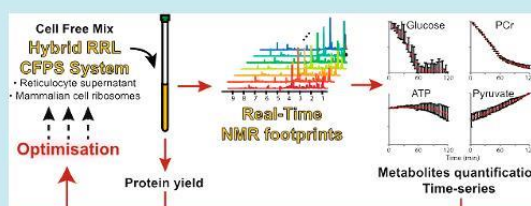
<sup>§</sup>Univ. Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France

<sup>||</sup>Univ. Grenoble Alpes, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics (LBFA), 38058 Grenoble cedex, France

### Supporting Information

**ABSTRACT:** A counterintuitive cell-free protein synthesis (CFPS) strategy, based on reducing the ribosomal fraction in rabbit reticulocyte lysate (RRL), triggers the development of hybrid systems composed of RRL ribosome-free supernatant complemented with ribosomes from different mammalian cell types. Hybrid RRL systems maintain translational properties of the original ribosome cell types, and deliver protein expression levels similar to RRL. Here, we show that persistent ribosome-associated metabolic activity consuming ATP is a major obstacle for maximal protein yield. We provide a detailed picture of hybrid CFPS systems energetic metabolism based on real-time nuclear magnetic resonance (NMR) investigation of metabolites kinetics. We demonstrate that protein synthesis capacity has an upper limit at native ribosome concentration and that lower amounts of the ribosomal fraction optimize energy fluxes toward protein translation, consequently increasing CFPS yield. These results provide a rationalized strategy for further mammalian CFPS developments and reveal the potential of real-time NMR metabolism phenotyping for optimization of cell-free protein expression systems.

**KEYWORDS:** cell-free protein synthesis, *in vitro* translation, hybrid system, cell-free metabolism, real-time NMR



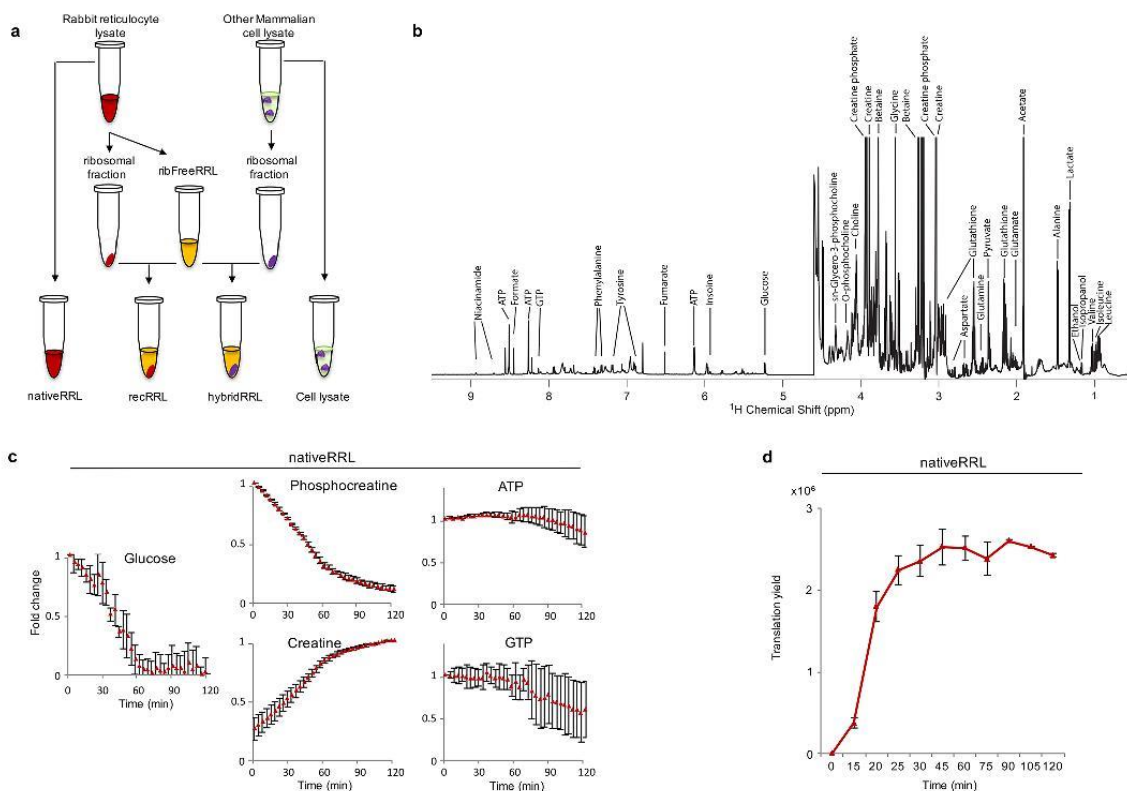
Cell-free protein synthesis (CFPS) systems have become central tools for protein research or biotechnology.<sup>1,2</sup> For example, they can be used to produce not only therapeutic proteins such as antibodies, vaccine components or cytokines,<sup>3–6</sup> but also key pharmaceutical targets for drug design assays and structural biology,<sup>7</sup> or viral particles.<sup>8</sup> CFPS also constitutes excellent opportunities for direct sampling and screening of molecules in a close-to-physiological context, e.g., for numerous *in vitro* translational assays such as ribosome display techniques.<sup>9</sup> CFPS has been at the origin of ground breaking studies, such as elucidation of the genetic code,<sup>10</sup> and has been instrumental in the discovery of biological pathways involved in mRNA translation, stability, processing and regulation<sup>11</sup> or viral replication.<sup>8</sup> Yet, the development of CFPS systems to their full potential has been hampered by the complexity of their molecular machinery, which involves many cellular processes and regulatory circuits.<sup>12</sup> Only few active CFPS systems have been successfully developed so far, with lysates derived from *E. coli*, wheat germ, insect cells or rabbit reticulocytes being the most commonly used.<sup>1</sup> *E. coli* and wheat germ can produce large amounts of a given protein and have

been optimized and routinely used in continuous CFPS protocols. However, such plant- or bacteria-based CFPS systems suffer from problems related to expression, folding and post-translational modifications of eukaryotic proteins. Thus, expression of many key protein targets in their active form is still a challenge.<sup>1</sup> On the other hand, mammalian CFPS systems are still believed to provide the most adequate machinery for *bona fide* protein production and downstream processing. Disappointingly, rabbit reticulocyte lysate (RRL), the main commercialized mammalian CFPS system (along with Chinese hamster ovary (CHO) and HeLa systems), is so far not optimal to deliver high protein production yield,<sup>1</sup> neither in its untreated form (uRRL) nor in its S7 nuclease treated RRL counterpart.<sup>13</sup>

We and others have recently proposed a novel *in vitro* CFPS system<sup>14–17</sup> based on rabbit reticulocyte ribosome-free lysate supernatant (ribFreeRRL) complemented with different ratios

Received: August 4, 2017

Published: September 15, 2017



**Figure 1.** CFPS energy consumption monitoring by real-time NMR. (a) RRL-derived CFPS reconstitution approach and nomenclature used in this article. Ribosomal fractions are easily isolated through ultracentrifugation under sucrose cushion. (b) Typical  $^1\text{H}$  NMR spectrum of a translating nativeRRL mix. Active CFPS reactions ( $200\ \mu\text{L}$ ) were monitored in real time inside the NMR spectrometer at  $30\ ^\circ\text{C}$ . (c) Evolution of metabolite concentrations quantified by real-time NMR during 2 h and normalized to their initial or final concentration. (d) Protein production yield based on luciferase activity measurement through a Renilla reporter gene expression. Each batch is supplemented by  $27\ \text{nM}$  of *in vitro* transcribed mRNA. Error bars represent the standard deviation of three experiments.

of purified ribosomal fractions, either from rabbit reticulocytes (reconstituted RRL or recRRL) or from diverse other cell types (hybrid RRL) (Figure 1a). Using this approach, protein expression became detectable through radiolabeling or luciferase reporter gene expression,<sup>14,15,18,19</sup> which allowed to decipher canonical translation mechanisms in the context of viral subversion<sup>18</sup> and tissue development.<sup>19</sup> This hybrid RRL approach allows a wide range of biological and technical observations as it maintains cellular properties such as specific mRNA translation regulation. Interestingly, hybrid RRL and recRRL initiate translation with the same rate than native RRL but are capable to maintain it for several hours, while translation rapidly levels off after 30 min in RRL, an effect that is not due to mRNA stability.<sup>15</sup>

Here, we show that this persistence of translation in hybrid or reconstituted RRL systems is not directly due to metabolite supply, as both RRL and hybrid RRL are equally supplied with amino acids and tRNA. However, using real-time NMR, we identify persistent free energy-consuming metabolic activities associated with the ribosome fraction that monopolize most of the energy supply, independently of protein synthesis. Our results evidence that the energetic metabolism is the most crucial factor for efficient CFPS, and demonstrate that energy supply is essential to sustain long lasting translation. Using

concentrations of ribosomal fractions lower than their native ratios significantly optimizes this issue.

## MATERIALS AND METHODS

**DNA Constructs and *In Vitro* Transcription.** The  $\beta$ -globin and CrPV IRESes p0-renilla were previously described.<sup>20</sup> The pGEM-Renilla vector was used as template to generate polyadenylated transcripts by digestion with *EcoRI*. The 80 nt region containing the T7 promoter was deleted by *PvuII*/*BamHI* digestion and the resulting vector was used to insert the different 5'-UTRs. The human  $\beta$ -globin 5'-UTR with the authentic initiation codon was obtained by hybridizing two synthetic oligodeoxyribonucleotides (Eurogentec) and cloned into the double-digested vector (*PvuII* and *BamHI* restriction sites and T7 promoter were added with the oligos) generating the  $\beta$ -globin p0-renilla vector. The Cricket paralysis virus (CrPV) IRES was obtained by polymerase chain reaction (PCR) using cDNA prepared from infected flies.<sup>21</sup> PCR products was digested by *PvuII* and *BamHI* and cloned in the double-digested vector (T7 promoter and restriction sites were added by PCR) generating CrPV IRES p0-renilla vector.

RNAs were transcribed using the T7 RNA polymerase from templates linearized at the *AflIII* site. Uncapped CrPV-Renilla mRNAs were obtained by using  $1\ \mu\text{g}$  of linear DNA template,

20 U of T7 RNA polymerase (Promega), 40 U of RNasin (promega), 1.6 mM of each ribonucleotide triphosphate, 3 mM DTT in transcription buffer (40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidine and 10 mM NaCl). For capped  $\beta$ -globin-Renilla mRNAs, the rGTP concentration was reduced to 0.32 mM and 1.28 mM of m7GpppG cap analogue (New England Biolabs) was added. The transcription reaction was carried out at 37 °C for 2h and mRNAs were precipitated with ammonium acetate at 2.5 M final concentration. The RNA pellet was resuspended in 30  $\mu$ L RNase free water and RNA concentration was determined by reading the absorbance using Nanodrop technology. RNAs integrity was checked by electrophoresis on nondenaturing agarose gel.

**Cell Culture.** HeLa, 293T and MEF cells were obtained originally from American Tissue Type Culture Collection and were typically grown in DMEM containing 10% fetal calf serum supplemented with 50 U/mL of penicillin, 50  $\mu$ g/mL of streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C.

**Preparation of RRL and Cell Lysate.** Homemade cell lysate. All following steps were performed at 4 °C. 80% confluent cells from 20 10 cm diameter dishes were collected by centrifugation at 1000g for 5 min, rinsed 3 times with PBS, resuspended in an isovolume of hypotonic buffer (Hepes 10 mM, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 10 mM, (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Mg, 1 mM and DTT 1 mM) and lysed using a Potter–Elvehjem homogenizer. The lysate was then centrifuged at 16 000g for 10 min and the supernatant was collected to yield the S10 supernatant extract. S10 protein total concentration was determined by the Bradford method and stored at 20 mg/mL concentration at –80 °C.

RRL and homemade cell lysate complementation. The method used has been described previously:<sup>22</sup> 1 mL of commercial untreated RRL (RRL) (Promega) or homemade cell lysate were supplemented with 25  $\mu$ M hemin (Fluka), 25  $\mu$ g creatine kinase (Sigma-Aldrich), 5 mg phosphocreatine (Fluka), 50  $\mu$ g of bovine liver tRNAs (Sigma-Aldrich) and 2 mM of D-glucose (Sigma-Aldrich).

The *in vitro* translational assay was realized by adding 27 nM of *in vitro* transcribed mRNAs to a final volume of 200  $\mu$ L (50% v/v RRL or homemade cell lysate) supplemented with 75 mM KCl, 0.75 mM MgCl<sub>2</sub> and 20  $\mu$ M amino acids mix. The translation reaction was realized in the NMR spectrometer at 30 °C. Unless otherwise stated in the text, the gloRenilla construct was used for every protein translation assays.

**Protein Quantification.** The reaction was stopped by addition of renilla lysis buffer (PJK). Renilla activity was measured using the renilla luciferase Assay System (PJK) in a Mithras (Berthold technologies) with 50  $\mu$ L substrate injection and 10 s of signal integration program. Absolute quantification of *in vitro* translated protein yields was calibrated by 35S labeling for the commercial RRL luciferase. [35S]-methionine labeled radioactive protein was translated in the presence of 20  $\mu$ M of amino acids mix minus methionine and 5  $\mu$ Ci of [35S]-methionine (PerkinElmer) for 30 mn before the reaction was stopped by addition of SDS loading buffer. Samples were resolved on a 12% SDS-PAGE, dried and subjected to autoradiography for 12 h by the use of Kodak Biomax films (Fisher Scientific) and the signal was quantified by using a Molecular Dynamics PhosphoImager FLA 5100 (Fuji). Protein concentration was determined relative to a serial dilution of [35S]-methionine stock.

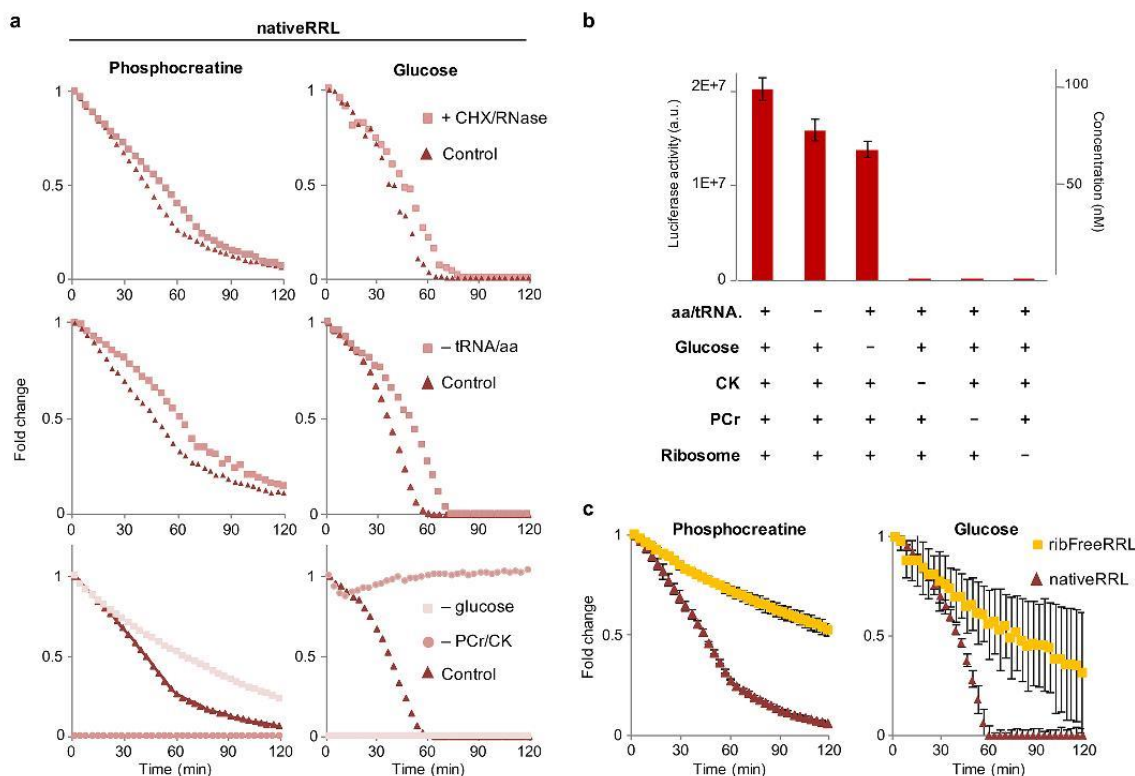
**RRL Fractionation and Reconstitution.** The strategy and nomenclature are illustrated in Figure 1a. All steps were performed at 4 °C. After centrifugation of 1 mL of RRL for 2 h 15 min at 75 000 rpm in a TLA 100.3 rotor (Beckmann), 900  $\mu$ L of ribosome free RRL was collected, frozen and stored at –80 °C. The extent of ribosome depletion from reticulocyte lysate was checked by translating 27 nM of *in vitro* transcribed capped and polyadenylated globin-renilla mRNA in the ribosome free RRL and validated when no luciferase activity could be detected. The ribosomal pellet was then rinsed three times in buffer R2 (Hepes 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.1 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 7 mM) and resuspended in 100  $\mu$ L of R2 buffer to get a 10 $\times$  final concentration. For ribosome salt wash experiments, the ribosomal pellet was washed using a 1 M sucrose cushion prepared with a R2 buffer including 25 mM to 1000 mM KCl, as stated in the text. After 2 h of centrifugation at 240 000g, the pellet containing the ribosomes was resuspended in R2 buffer.

The reconstituted lysate is then assembled by mixing 100  $\mu$ L of ribosome free RRL with a fraction of scale from 0.02 to 1 $\times$  ribosomal pellet. Typically, the standard reaction for NMR contains 100  $\mu$ L of ribosome free RRL with 20  $\mu$ g ribosomal pellet (annotated 0.1 $\times$ ) in a final volume of 200  $\mu$ L. Upon reconstitution, the translation mixture is supplemented with 75 mM KCl, 0.75 mM MgCl<sub>2</sub> and 20  $\mu$ M amino acids mix.

**NMR Acquisition.** Sample preparation was as follows: 20  $\mu$ L of D<sub>2</sub>O and 2  $\mu$ L of 100 mM trimethylsilyl propionate (TMSP) were added to 200  $\mu$ L of CFPS mix. Solutions were mixed thoroughly and 200  $\mu$ L were transferred to 3 mm NMR tubes. All the solutions were strictly kept on ice until NMR acquisition. All NMR experiments were carried out on a Bruker 600 MHz NMR spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryoprobe. The temperature was controlled at 30.0 °C throughout the experiments. Time series of standard <sup>1</sup>H 1D NMR pulse sequence Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) with water presaturation (Bruker pulse program cpmgpr1d) were acquired. CPMG experiments were preferred in this study to focus on small molecules by removing the important background contribution of large molecules such as proteins and nucleic acids. 32 free induction decays (FIDs) were collected with 48 074 data points and an acquisition time of 1.99 s. The relaxation delay was set to 4 s. The total acquisition time for each spectrum was 3 min 27 s. The acquisition was repeated during 2 to several hours. Identification of the metabolites was carried out from the 1D NMR data using the software ChenomX NMR Suite 7.0 (ChenomX Inc., Edmonton, Canada) and confirmed from analysis of 2D <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC and J-Resolved NMR spectra recorded with standard parameters. The measured chemical shifts were compared to reference shifts of pure compounds using the HMDB<sup>23</sup> database. Metabolite concentrations were determined by manual fitting of the proton resonance lines for the compounds available in the ChenomX database. For comparison purposes, we normalized the data quantified by <sup>1</sup>H NMR in CFPS reactions as fold changes using the following equation:  $X(t) = C(t)/C_{ref}$ , in which  $C_{ref}$  is respectively the initial or final concentration, whether the metabolite is consumed or produced during the reaction.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Energetic Metabolism Evolution in RRL.** In order to study metabolic activities and the related energy conversions occurring in translating RRL reactions, we used a quantitative



**Figure 2.** Energy consumption in CFPS is maintained even when translation is blocked. (a) Phosphocreatine and glucose evolution during 2 h of *in vitro* translation: comparison of a nativeRRL control ( $\Delta$ ) versus an elongation-blocked nativeRRL ( $\square$ ) by addition of cycloheximide (CHX) and RNase A (top panel); comparison between a nativeRRL control ( $\Delta$ ), and without tRNA and amino acids (aa) supplementation ( $\square$ ) (middle panel); nativeRRL control ( $\Delta$ ) versus nativeRRL without glucose ( $\square$ ) or without CK and phosphocreatine (O) supplementation (bottom panel). (b) Protein production yield based on luciferase activity measurement through a Renilla reporter gene expression in nativeRRL (left) or without addition of amino acids and tRNA, glucose, CK, phosphocreatine or ribosomal fraction (ribosome). Absolute luminescence intensity is plotted on left y-axis. Concentration was determined using methionine 35S labeling and is plotted on right y-axis. Error bars represent the standard deviation of three experiments. (c) Comparison of a nativeRRL translating ( $\Delta$ ) versus a ribFreeRRL ( $\square$ ) system: phosphocreatine and glucose evolution during 2 h of *in vitro* translation. Error bars represent the standard deviation of three experiments.

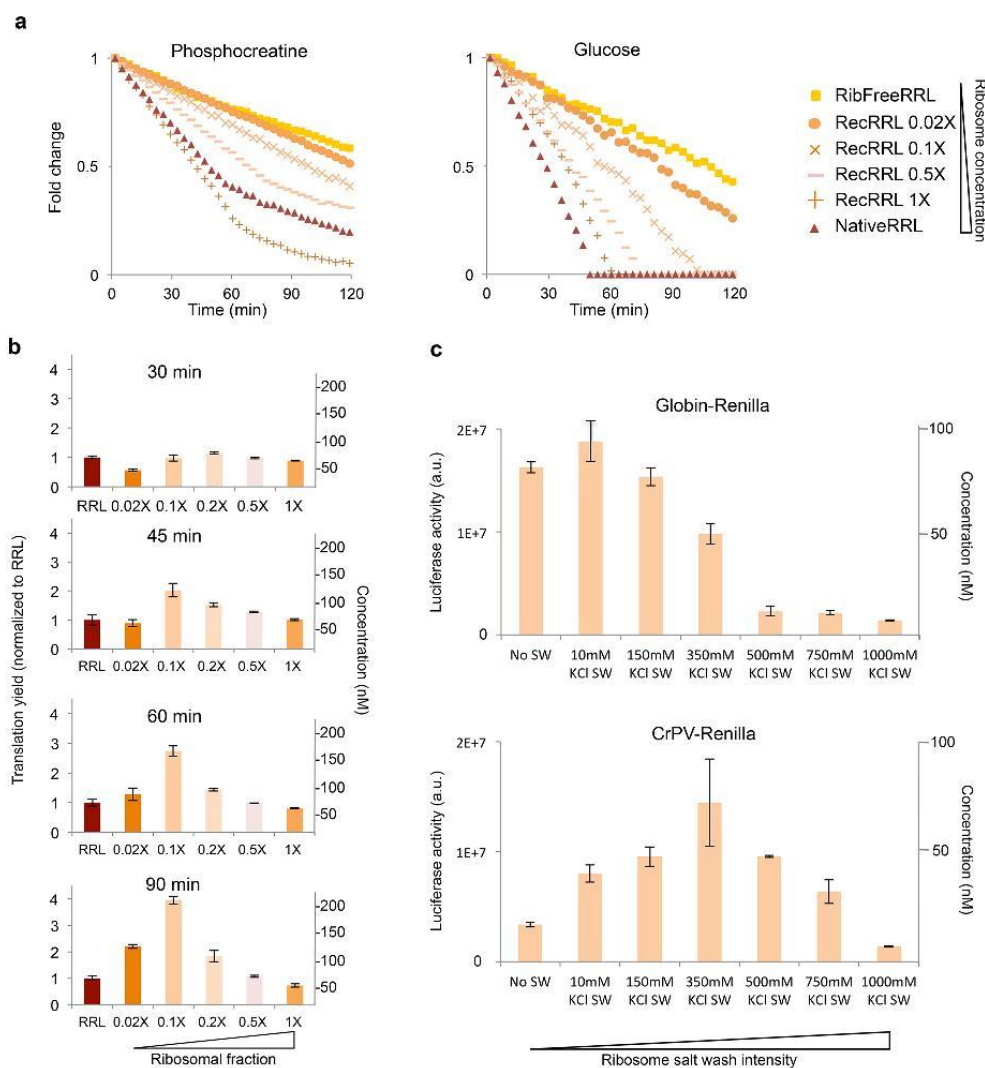
real-time NMR strategy to monitor intact, translating samples over two to 6 h. As a primary energy source, an ATP regenerating system was used that is commonly applied for eukaryote CFPS, namely supplementation with 10 mM phosphocreatine (PCr) in the presence of creatine kinase (CK:  $\text{ADP} + \text{PCr} \rightarrow \text{ATP} + \text{Cr}$ ), with an additional 2 mM glucose supplementation. From the complex CFPS  $^1\text{H}$  NMR fingerprint (Figure 1b), a number of signals could be unambiguously assigned to specific metabolites and the evolution of their relative concentration followed over time, characterizing production, consumption, or steady-state behavior. This included PCr consumption and creatine production, but also the time course of other energy intermediates (ATP, GTP, glucose), metabolites and cellular constituents (e.g., Figure 1c,d).

Classical RRL translation (native RRL) was run as a control experiment. It revealed that the given PCr pool could maintain maximal energy supply for about 60 min, thus keeping ATP and also GTP concentrations globally stable during this time period (Figure 1c). At that time point, glucose was also entirely exhausted, and a drop in ATP and GTP occurred. Protein yield indicated very active translation during the first 30 min, which

then slowed down and ceased after 45 min (Figure 1d). The GTP necessary for translation was apparently provided by an endogenous and nonlimiting nucleoside diphosphate kinase reaction ( $\text{NDPK: GDP} + \text{ATP} \rightarrow \text{GTP} + \text{ADP}$ ), as seen by the coupling of ATP and GTP concentrations (Figure 1c and Supporting Figure S1), a well documented process<sup>24,25</sup> that occurs in the cytoplasm.<sup>26</sup> All these kinetics are similar to those observed in prokaryotic systems,<sup>27</sup> except that we did not detect changes in  $\alpha$ -ketoglutarate, consistent with the absence of mitochondria in our system,<sup>28</sup> and we observed production of pyruvate and lactate (data not shown). These data evidenced a considerable energy flux occurring during CFPS.

**Energy Consumption Is Mostly Independent from Protein Production Yield of the Native RRL.** To better understand energy expenditure during CFPS, we conducted experiments in which protein synthesis was blocked by cycloheximide (CHX), which inhibits the elongation process, and RNase A, to induce mRNA degradation. Surprisingly, at 60 min of reaction time (end of linear regime), PCr consumption was reduced by less than 20% (Figure 2a) as compared to the control RRL reaction. A slight reduction of glucose consumption was also tentatively detected, though the very



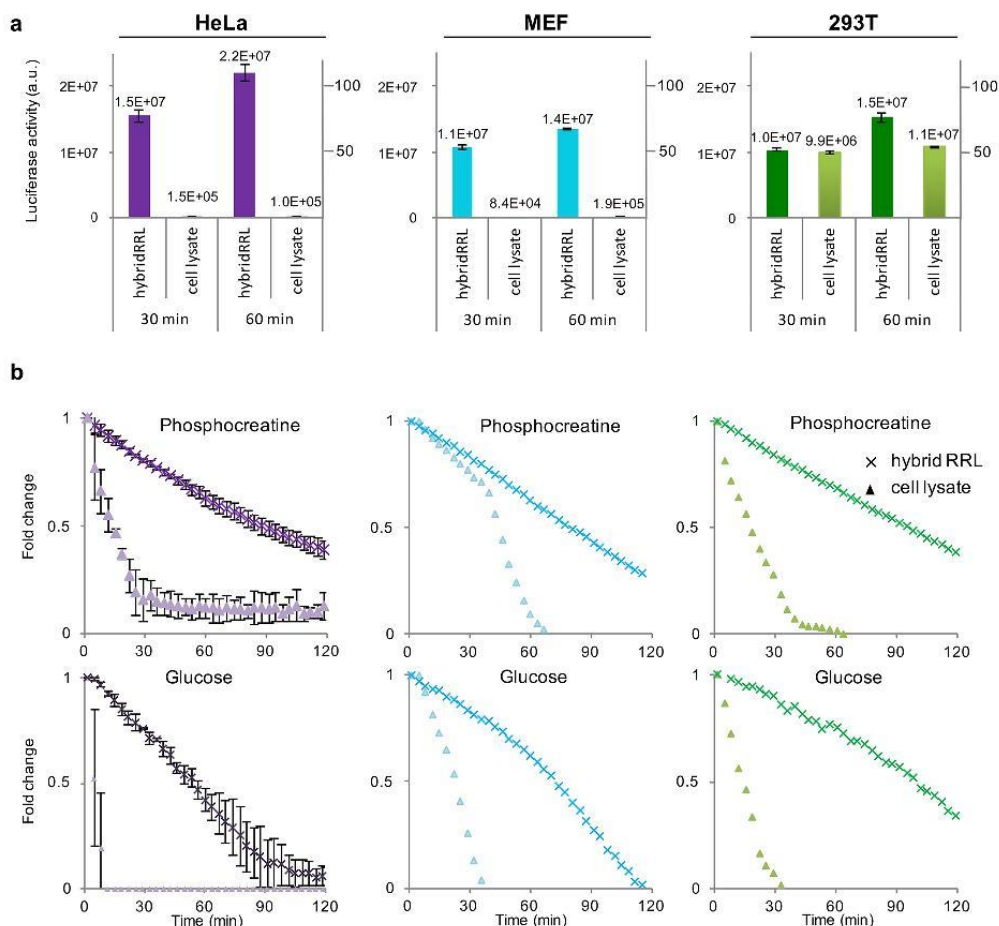


**Figure 3.** Lowering the ribosome ratios increases the protein production yield. (a) Phosphocreatine and glucose evolution during 2 h of *in vitro* translation in nativeRRL ( $\Delta$ ), ribFreeRRL ( $\square$ ), recRRL with 0.02 $\times$  ( $\circ$ ), 0.1 $\times$  ( $\times$ ), 0.5 $\times$  ( $-$ ) and 1 $\times$  ( $+$ ) ribosomal fraction addition. (b) Protein production yield evaluated as luciferase activity by luminometry at different time of incubation (30, 45, 60, and 90 min). Protein production was normalized to nativeRRL (RRL). RecRRL was supplemented with an increasing amount of ribosomal fraction from 0.02 $\times$  to 1 $\times$ . (c) recRRL comparison of protein production for 2 different constructs with ribosomes washed with 10 mM KCl to 1 M KCl through sucrose cushion. Error bars represent the standard deviation of three experiments. Absolute luminescence intensity is plotted on left y-axis. Concentration was determined using methionine 35S labeling and is plotted on right y-axis.

low signal-to-noise at long reaction times for this metabolite prevents conclusion of a significant trend. This clearly demonstrated that translation was not the main consumer of ATP in the CFPS system. However, pyruvate and lactate production was reduced (data not shown), indicating that inhibition of translation reduces glycolytic flux.

**Major Energy Consuming Processes Associate with the Ribosomal Fraction.** To assess the origin of translation-independent energy consumption, we designed further experiments. First, we diminished regeneration of aminoacyl-tRNAs, which consumes at least 3 ATP per amino acid/tRNA coupling (Supporting Figure S2), by avoiding tRNA and amino acid

additions to the reaction mixture. As compared to control RRL experiments, this decreased protein yield by about 20% (Figure 2b; in accordance with ref 29). PCr consumption in the absence of tRNA/aa show slightly different behaviors for independent RRL batches, probably indicating variations of endogenous tRNA and amino acids concentrations in RRLs (Figure 2a; Supporting Figure S3). We observe either no difference or a maximum of 20% PCr consumption reduction in the absence of tRNA/aa supplementation (evaluated at 60 min reaction time), which indicates that, at most, 20% of the PCr available in a standard RRL reaction was used to regenerate aminoacyl-tRNAs. Altogether, at most 40% of the energy (a



**Figure 4.** Application of the hybrid strategy to mammalian cell based CFPS delivers protein production levels comparable to RRL by energy consumption optimization. (a) Protein production yield after 30 and 60 min of *in vitro* translation at 30 °C for HeLa (purple, left), MEF (blue, middle), 293T (green, right) cell lysates and corresponding hybrid RRL. Error bars represent the standard deviation of three experiments. Absolute luminescence intensity is plotted on left y-axis. Concentration was determined using methionine 35S labeling and is plotted on right y-axis. (b) Phosphocreatine and glucose evolution determined by real-time NMR during 2 h of *in vitro* translation in cell lysates ( $\Delta$ ) and in corresponding hybrid RRL ( $\times$ ). HeLa were run in duplicate experiments, MEF and 293T as single experiments.

conservative overestimation) appeared to be spent for translation-related processes.

Next, we investigated the respective importance of PCr and glucose for protein yield. Removing PCr (or CK) led to an immediate drop in ATP and GTP levels (Supporting Figure S1), which precluded glucose utilization (Figure 2a; Supporting Figure S3) and protein synthesis (Figure 2b). In the context of high competition for ATP in RRL, and in the absence of an efficient ATP regenerating system, the low net ATP production of glycolysis is insufficient to fuel both glycolysis initial steps and competitive RRL metabolism. Consistently, glucose removal had no apparent effect on steady state ATP and GTP levels (Supporting Figure S1), confirming that the PCr/CK system is the primary and essential energy source, but interestingly glucose reduction lowered protein synthesis by about 30% (Figure 2b). Glycolysis thus appears to contribute to protein translation, either through NADH regeneration or *via* production of intermediate metabolites that may indirectly

benefit translation. Notably, this is contrary to bacterial lysates, where glucose can be used as the major source of energy.<sup>30,31</sup> Finally, we conducted an experiment that omitted the ribosomal fraction, thus avoiding protein synthesis (Figure 2b). Under these conditions, PCr and glucose were still consumed, but at a much lower rate compared to the native RRL (Figure 2c) or to native RRL after CHX inhibition of protein synthesis (Figure 2a; Supporting Figure S3). Therefore, translation-independent free energy consumption seems to be largely driven by components copurified with the ribosomal fraction, or by the ribosome itself (Supporting Figure S1).

Our data suggest that energy fluxes during a CFPS reaction are complex. While a significant amount of free energy appears to be directed toward protein synthesis (at most 40%), a majority supports alternative pathways that are associated with the ribosomal fraction. This ribosomal fraction has recently been shown to be strikingly complex, with more than 1000 proteins associated with the ribosome machinery, constituting

the riboproteome.<sup>32</sup> Those proteins are believed to create *in vivo* a favorable microenvironment necessary for driving, regulating, and securing specificity of the translation process. Interestingly, the riboproteome contains also many enzymes involved in common metabolic pathways,<sup>32–34</sup> consistent with the free energy-consuming processes that we found associated with the ribosomal fraction.

**Riboproteome Dilution Is a Compromise between Translation-Independent Metabolism and Protein Synthesis.** We explored the effect of riboproteome concentration on both translation-independent metabolism and protein synthesis in our CFPS system. Reducing the amount of the ribosomal fraction in ribosome free RRL (recRRL; Figure 1a) directly correlated with reduced free energy consumption of the system (Figure 3a), while protein synthesis was reduced in a more complex manner. In fact, reducing the ribosomal fraction of the original lysate (1X) to only 10% (0.1X) increased protein yield after 90 min of synthesis by about 4-fold (Figure 3b; Supporting Figure S4). Further reduction of the ribosomal fraction to 2% (0.02X) reduced protein yield. Under this condition, the yield was nonetheless higher than the one of the 1X controls. At native concentrations, the translation apparatus seems therefore saturated, an effect previously observed *in vitro*.<sup>14,35</sup> These differences in protein yield were not apparent at shorter reaction times (30 min), suggesting similar initial translation rates (Figure 3b; Supporting Figure S4). In fact, the different mixtures differed in the time course, with nativeRRL and 1X recRRL ceasing protein synthesis after 30–45 min, while recRRL, depending on the ribosome dilution, remained productive for longer reaction times.

These results suggest that the metabolic activities associated with the ribosomal fraction contribute to the reduced translation yield in CFPS reactions by competing for energy supply. Using lower ribosomal fraction ratios than native systems appeared to be very beneficial: dilution of the competing free energy-consuming processes liberated energy reserves, which were then efficiently used by the ribosome translational machinery because of its saturated capacity down to concentration ratios of 0.1X. This conclusion is consistent with the longer-lasting ATP availability observed in the PURE system developed by Shimizu *et al.*<sup>36</sup> However, translation of this approach to eukaryotic CFPS seems not feasible, since individual components of the translation machinery have to be purified, which already limits large-scale commercial application of the *E. coli* system.

We evaluated whether ribosome purification by high salt washes is advantageous as an alternative approach to deal with competing energy-consuming activities in the ribosomal fraction. Ribosome fractions were washed with up to 1 M KCl then rinsed with a 25 mM KCl buffer before being resuspended in assay buffer to avoid any effect of residual salt on translation efficiency (see Materials and Methods and ref 14). More stringent washes during the ribosomes purification steps (using more than 350 mM, and up to 1 M KCl) progressively led to a loss of such ATP-consuming processes as compared to unwashed controls (Supporting Figure S5). Unfortunately, at the efficient KCl concentrations, the protein yield rapidly dropped by 50% at 350 mM KCl to even 90% at 500 mM KCl (Figure 3c) when using glo-Renilla mRNA (a capped and polyadenylated mRNA-dependent translation control). The result was slightly different when using the CrPV-Renilla construct (an mRNA that displays a viral intergenic IRES that does not need any eIF factors to be

translated), with a maximal protein yield observed at 350 mM KCl, and a drop occurring only at higher KCl concentrations (Figure 3c). These experiments suggest that washes with low salt concentration can already dissociate not only metabolic enzymes, but also initiation factors and potentially other important translation components.

**Evaluation of the Hybrid CFPS Approach Using Ribosomal Fractions from Various Cell Types.** Finally, we studied such hybrid RRL approaches by using ribosomal fractions of different cell types (HeLa, MEF and HEK-293T cells) and comparing them to total cell lysates (Figure 1a). Protein yield was again quantified by Renilla protein production (Figure 4a). For experiments using HeLa and MEF cells, protein yield after 30 min was two logs lower in the standard cell lysates as compared to the hybrid RRL systems, while both were similar in HEK-293T experiments. For all three cell lines, protein yield after 60 min further increased in the hybrid systems, but not in the total cell lysates. As reported earlier, HeLa lysates display a very low protein production capacity (2 logs lesser than native RRL),<sup>14</sup> while the hybrid RRL complemented with a HeLa ribosomal fraction shows protein expression yields similar to native RRL for short incubation time (30 to 45 min) and similar to recRRL for longer incubation time. Similar results were observed for MEF cell lysate and hybrid RRL with MEF ribosomal fraction. On the opposite, both HEK-293T standard cell lysate and hybrid RRL performed well at short incubation time, demonstrating that the low yields obtained with HeLa and MEF lysates were not caused by our experimental conditions or chemicals. We further compared energy availability between cell lysates and the hybrid RRL with reduced ribosomal fraction ratio (equivalent to 0.1X RRL) similar as above. For HeLa lysates, glucose and PCr half-lives were only 5 min and 12 to 15 min respectively (Figure 4b). In striking contrast, the HeLa hybrid CFPS half-lives for glucose and PCr were increased to 55 and 85 min, respectively. This indicates that in our experimental setup the energy sources in the HeLa cell lysate (15 mM PCr, 2 mM glucose) are unable to fuel protein synthesis for much longer than 20–30 min, while in the hybrid CFPS they last for more than 2 h. Similar results were obtained for MEF and 293T cell lysates (Figure 4b). In comparison, HeLa cell lysates showed by far the fastest consumption of energy reserves, *i.e.*, of ATP-consuming metabolic reactions, consistent with their cancer cell origin. We note that the duration of CFPS reactions is highly dependent on the energy supplies and experimental conditions.<sup>37</sup>

Altogether, we emphasize here the cell-specific energy consuming activities associated with the ribosomal fraction as crucial factors for protein translation yield. Dilution of the ribosomal fraction limits the waste of energy by translation-independent ATP-consuming pathways, promotes significantly longer lasting CFPS reactions, and thus maximizes ribosome activity and protein yield. While competing energy-consuming activities of the ribosomal fraction do not appear to contribute to translation, they may in fact be necessary for translation *in vivo*, but appear nonlimiting under the conditions tested. Manipulating the ribosome ratio was already used to enhance protein production in yeast CFPS,<sup>35</sup> but the underlying energetic aspects were not investigated. Alternative approaches to circumvent the energy issue would be to engineer the metabolic pathways or to specifically eliminate the futile cycles that are likely to drain energy resources in cellular lysates. While these strategies have proven successful for prokar-

yotes,<sup>36,38</sup> adapting them to eukaryotes appears so far not feasible due to the lack of information on the involved competing free energy consuming processes. The hybrid system approach investigated here appears therefore as an accessible, solid and pragmatic tool to improve protein yield. In fact, by emphasizing the importance of energy resource management, it could present a breakthrough for the elaboration of cell free protein synthesis systems. Both the hybrid approach and real-time NMR follow-up of CFPS appear as experimental strategies adaptable to a large variety of mammalian cell types, paving the way for the development of novel eukaryotic CFPS systems and versatile platforms for high yield protein production, riboproteome investigation, or gene expression studies.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssynbio.7b00280.

Figures S1–S6 (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: baptiste.panthu@ens-lyon.fr.

\*E-mail: benedict.elena@ens-lyon.fr.

### ORCID

Bénédicte Elena-Herrmann: 0000-0002-0230-1590

Gilles J. P. Rautureau: 0000-0002-1064-0293

### Present Address

<sup>†</sup>CIRI, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de Lyon, Univ. Lyon, F-69007, Lyon, France

### Author Contributions

<sup>#</sup>B.E.-H. and G.J.P.R. contributed equally to this work.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Dr. Neil Ferguson for long-term support, critical reading of the manuscript and stimulating discussions. The authors wish to thank the SFR Biosciences Lyon Gerland for contributing to the development of the project.

## ■ REFERENCES

- (1) Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., and Jewett, M. C. (2012) Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol. Adv.* 30, 1185–1194.
- (2) Schinn, S. M., Broadbent, A., Bradley, W. T., and Bundy, B. C. (2016) Protein synthesis directly from PCR: progress and applications of cell-free protein synthesis with linear DNA. *New Biotechnol.* 33, 480–487.
- (3) Kanter, G., Yang, J., Voloshin, A., Levy, S., Swartz, J. R., and Levy, R. (2007) Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood* 109, 3393–3399.
- (4) Yang, J., Kanter, G., Voloshin, A., Levy, R., and Swartz, J. R. (2004) Expression of active murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in an Escherichia coli cell-free system. *Biotechnol. Prog.* 20, 1689–1696.
- (5) Yang, J., Kanter, G., Voloshin, A., Michel-Reydellet, N., Velkeen, H., Levy, R., and Swartz, J. R. (2005) Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 503–511.
- (6) Zawada, J. F., Yin, G., Steiner, A. R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S. M., Gold, D. S., Heinsohn, H. G., and Murray, C. J. (2011) Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1570–1578.
- (7) Terada, T., Murata, T., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2014) Cell-free expression of protein complexes for structural biology. *Methods Mol. Biol.* 1091, 151–159.
- (8) Machida, K., and Imataka, H. (2015) Production methods for viral particles. *Biotechnol. Lett.* 37, 753–760.
- (9) Pluckthun, A. (2012) Ribosome display: a perspective. *Methods Mol. Biol.* 805, 3–28.
- (10) Nirenberg, M. W., and Matthaei, J. H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 1588–1602.
- (11) Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., and Sonenberg, N. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764–1767.
- (12) Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.
- (13) Pelham, H. R., and Jackson, R. J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247–256.
- (14) Panthu, B., Decimo, D., Balvay, L., and Ohlmann, T. (2015) In vitro translation in a hybrid cell free lysate with exogenous cellular ribosomes. *Biochem. J.* 467, 387–398.
- (15) Panthu, B., Mure, F., Gruffat, H., and Ohlmann, T. (2015) In vitro translation of mRNAs that are in their native ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* 472, 111–119.
- (16) Penzo, M., Carnicelli, D., Montanaro, L., and Brigotti, M. (2016) A reconstituted cell-free assay for the evaluation of the intrinsic activity of purified human ribosomes. *Nat. Protoc.* 11, 1309–1325.
- (17) Penzo, M., Rocchi, L., Brugiere, S., Carnicelli, D., Onofrillo, C., Coute, Y., Brigotti, M., and Montanaro, L. (2015) Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation. *FASEB J.* 29, 3472–3482.
- (18) Panthu, B., Terrier, O., Carron, C., Traversier, A., Corbin, A., Balvay, L., Lina, B., Rosa-Calatrava, M., and Ohlmann, T. (2017) The NS1 protein from influenza virus stimulates translation initiation by enhancing ribosome recruitment to mRNAs. *J. Mol. Biol.*, DOI: 10.1016/j.jmb.2017.04.007.
- (19) Mazelin, L., Panthu, B., Nicot, A. S., Belotti, E., Tintignac, L., Teixeira, G., Zhang, Q., Risson, V., Baas, D., Delaune, E., Derumeaux, G., Taillandier, D., Ohlmann, T., Ovize, M., Gangloff, Y. G., and Schaeffer, L. (2016) mTOR inactivation in myocardium from infant mice rapidly leads to dilated cardiomyopathy due to translation defects and p53/JNK-mediated apoptosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 97, 213–225.
- (20) Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S., Limousin, T., de Breyne, S., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2012) DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J.* 31, 3745–3756.
- (21) Chtarbanova, S., Lamiable, O., Lee, K. Z., Galiana, D., Troxler, L., Meignin, C., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Daeflfer, L., and Imler, J. L. (2014) Drosophila C virus systemic infection leads to intestinal obstruction. *J. Virol.* 88, 14057–14069.
- (22) Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D., Moncorge, O., and Ohlmann, T. (2007) Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res.* 35, e121.
- (23) Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R., and Scalbert, A.

- (2013) HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D801–807.
- (24) Spirin, A. S. (2004) High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* 22, 538–545.
- (25) Jewett, M. C., Miller, M. L., Chen, Y., and Swartz, J. R. (2009) Continued protein synthesis at low [ATP] and [GTP] enables cell adaptation during energy limitation. *J. Bacteriol.* 191, 1083–1091.
- (26) Bosnar, M. H., Bago, R., and Cetkovic, H. (2009) Subcellular localization of Nm23/NDPK A and B isoforms: a reflection of their biological function? *Mol. Cell. Biochem.* 329, 63–71.
- (27) Jewett, M. C., Calhoun, K. A., Voloshin, A., Wu, J. J., and Swartz, J. R. (2008) An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.* 4, 220.
- (28) Goodman, S. R., Kurdia, A., Ammann, L., Kakhniashvili, D., and Daescu, O. (2007) The human red blood cell proteome and interactome. *Exp. Biol. Med. (London, U. K.)* 232, 1391–1408.
- (29) Jackson, R. J., and Hunt, T. (1983) [4] Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA, In *Methods Enzymol.*, pp 50–74, Academic Press.
- (30) Calhoun, K. A., and Swartz, J. R. (2005) Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 606–613.
- (31) Caschera, F., and Noireaux, V. (2014) Synthesis of 2.3 mg/mL of protein with an all Escherichia coli cell-free transcription-translation system. *Biochimie* 99, 162–168.
- (32) Reschke, M., Clohessy, J. G., Seitzer, N., Goldstein, D. P., Bretkopf, S. B., Schmolze, D. B., Ala, U., Asara, J. M., Beck, A. H., and Pandolfi, P. P. (2013) Characterization and analysis of the composition and dynamics of the mammalian riboproteome. *Cell Rep.* 4, 1276–1287.
- (33) Beckmann, B. M., Horos, R., Fischer, B., Castello, A., Eichelbaum, K., Alleaume, A.-M., Schwarzl, T., Curk, T., Foehr, S., Huber, W., Krijgsvelde, J., and Hentze, M. W. (2015) The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat. Commun.* 6, 10127.
- (34) Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., Krijgsvelde, J., and Hentze, M. W. (2012) Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* 149, 1393–1406.
- (35) Bonander, N., Darby, R. A., Grgic, L., Bora, N., Wen, J., Brogna, S., Poyner, D. R., O'Neill, M. A., and Bill, R. M. (2009) Altering the ribosomal subunit ratio in yeast maximizes recombinant protein yield. *Microb. Cell Fact.* 8, 10.
- (36) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* 19, 751–755.
- (37) Ho, K. K., Murray, V. L., and Liu, A. P. (2015) Engineering artificial cells by combining HeLa-based cell-free expression and ultrathin double emulsion template. *Methods Cell Biol.* 128, 303–318.
- (38) Liu, Y., Link, H., Liu, L., Du, G., Chen, J., and Sauer, U. (2016) A dynamic pathway analysis approach reveals a limiting futile cycle in N-acetylglucosamine overproducing *Bacillus subtilis*. *Nat. Commun.* 7, 11933.



# Revue sur le rôle des interactions MAMs et des échanges calciques dans le développement du diabète de type 2

Cette revue dresse un état des lieux des connaissances actuelles sur les membranes réticulaires associées à la mitochondrie (MAMs), de leur implication dans l'homéostasie calcique jusqu'à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus cette revue questionne le lien entre l'altération des MAMs et le développement du diabète de type 2 (DT2). Dans cette revue qui est au cœur de mon travail de thèse, j'ai participé à la mise à jour des données, à la bibliographie et à la relecture finale du manuscrit.

La glucolipotoxicité, exposant les cellules  $\beta$  à de fortes concentrations de glucose et de lipides sur des temps prolongés, impacte les MAMs. Nous avons montré que la glucotoxicité seule induit une régulation positive des MAMs *in vitro* dans les îlots pancréatiques humains, réduisant la distance entre les mitochondries et le RE (Dingreville et al., 2019). Au contraire, la lipotoxicité semble diminuer les MAMs *in vitro*, ce que notre équipe a aussi observé sur des coupes de pancréas humains de sujets DT2 (Thivolet et al., 2017). Par l'altération des MAMs, ces toxicités induisent des perturbations de l'homéostasie calcique dans les cellules  $\beta$ , nécessaires à la sécrétion régulée d'insuline (Cassel et al., 2016; Dingreville et al., 2019). Ensemble, ces résultats semblent décrire les MAMs comme des acteurs centraux de la perte de fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète de type 2.

Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse d'une altération évolutive des MAMs lors du DT2. En effet, au départ les MAMs sont augmentées pour compenser l'apport massif en carbohydrates puis dans un second temps réduites par défaut de régulation des lipides. Malgré ces hypothèses, d'autres études seront nécessaires pour comprendre le développement de ces altérations ainsi que les mécanismes associés avec le développement du DT2.

# **Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAMs) interactions and calcium exchange in the development of type 2 diabetes**

*Anne-Marie Madec<sup>1</sup>, Johan Perrier<sup>1</sup>, Baptiste Panthu<sup>1</sup>, Florian Dingreville<sup>1</sup>*

1. CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Lyon, France.

## Corresponding Author

Pr. Anne-Marie Madec

Laboratoire CarMeN : Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition.

INSERM U.1060 / Université Lyon 1 / INRA U.1397 / INSA Lyon / Hospices Civils Lyon

Hôpital Lyon Sud Secteur 2

Bâtiment CENS ELI-2D

165 Chemin du grand Revoyet

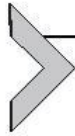
F - 69310 PIERRE BENITE

Postale : F-69495 Pierre Bénite CEDEX

Web: <http://carmen.univ-lyon1.fr>

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





# Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAMs) interactions and calcium exchange in the development of type 2 diabetes

Anne-Marie Madec\*, Johan Perrier, Baptiste Panthu, and Florian Dingreville

CarMeN Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Lyon, France

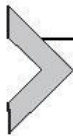
\*Corresponding author: e-mail address: anne-marie.coquelet-madec@univ-lyon1.fr

## Contents

1. Introduction	170
2. Key role of ER and mitochondria in $\beta$ cell function	171
2.1 Pancreatic $\beta$ cells	171
2.2 Endoplasmic reticulum	171
2.3 ER stress and $\beta$ cell dysfunction induced by gluco/lipotoxicity	173
2.4 Mitochondria and calcium	174
2.5 Mitochondrial dynamics	177
2.6 Role of mitochondrial dynamics in insulin secretion by the $\beta$ cell	179
3. Physiological roles of MAMs	180
3.1 Ultrastructure of MAMs	180
3.2 Calcium exchanges	181
3.3 Role of MAMs in mitochondrial dynamics	184
3.4 ER Stress and MAMs	185
3.5 Autophagy/mitophagy and MAMs	185
3.6 Distance of ER-mitochondria contacts and functions	186
4. MAMs and T2D	186
4.1 The role of MAMs in hepatic, muscular and adipocyte insulin resistance	186
4.2 The role of MAMs in the pancreatic $\beta$ cell in T2D	188
5. Conclusion	192
Acknowledgments	194
Funding	194
Credit authorship contribution statement	194
Declaration of competing interest	194
References	194

## Abstract

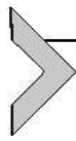
Glucotoxicity-induced  $\beta$ -cell dysfunction in type 2 diabetes is associated with alterations of mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER). Mitochondria and ER form a network in cells that controls cell function and fate. Mitochondria of the pancreatic  $\beta$  cell play a central role in the secretion of insulin in response to glucose through their ability to produce ATP. Both organelles interact at contact sites, defined as mitochondria-associated membranes (MAMs), which were recently implicated in the regulation of glucose homeostasis. Here, we review MAM functions in the cell and we focus on the crosstalk between the ER and Mitochondria in the context of T2D, highlighting the pivotal role played by MAMs especially in  $\beta$  cells through inter-organelle calcium exchange and glucotoxicity-associated  $\beta$  cell dysfunction.



## 1. Introduction

Diabetes now affects 463 million adults worldwide. By 2045 this will rise to 700 million and caused 4.2 million deaths. Type 2 diabetes (T2D), the most common type of diabetes, accounting for around 90% of all diabetes cases, is generally characterized by insulin resistance such as skeletal muscle, liver or fat tissue and involves impaired insulin secretion (IDF, 2020). Indeed, to compensate for this hyperglycemia, the pancreatic  $\beta$  cells secrete more insulin but eventually become depleted and die with a 25–60% loss of pancreatic  $\beta$  mass in advanced diabetes (Butler et al., 2003; Rahier et al., 2008). The exact causes of T2D and the precise molecular mechanisms involved have yet to be elucidated. Nevertheless, it is recognized that a diet high in sugar and fat and low physical activity are two key factors in the development of T2D associated with a certain genetic susceptibility. Pancreatic  $\beta$  cell dysfunction and apoptosis are hallmarks of advanced T2D. Several hypotheses exist to justify the loss and dysfunction of the pancreatic  $\beta$  mass. The most recognized to date show that pancreatic  $\beta$  dysfunction could be due to glucolipotoxicity (toxicity of high carbohydrate and lipid concentrations) inherent in overeating. This glucolipotoxicity would eventually cause apoptosis of  $\beta$  cells. This hypothesis recently faces the idea that  $\beta$  cells could dedifferentiate and lose their ability to secrete insulin (Cinti et al., 2016).

In this review, we focus on the crosstalk between the ER and Mitochondria in the context of T2D and after listing roles of MAMs in the cell, we highlight their pivotal role in T2D, especially in  $\beta$  cells through inter-organelle calcium exchange and glucotoxicity-associated  $\beta$  cell dysfunction.



## 2. Key role of ER and mitochondria in $\beta$ cell function

### 2.1 Pancreatic $\beta$ cells

Pancreatic  $\beta$  cells are glucose-sensors adjusting insulin secretion to glycaemia via a triggering pathways including glucose oxidation by glycolysis and citric acid 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 (Henquin et al., 2003; Rutter et al., 2015). 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 (Maechler et al., 2006) and ER controls the synthesis, correct folding and sorting of insulin in response to glucose (Arunagiri et al., 2018). Furthermore, both ER and mitochondria control  $Ca^{2+}$  dynamics by regulating  $Ca^{2+}$  uptake and release from/into intracellular organelles.

Repeated or sustained exposure of  $\beta$  cells to supra-physiological glucose levels, referred as glucotoxicity, contributes to  $\beta$  cell dysfunction during T2D (Bensellam et al., 2012). Particularly, chronic exposure of  $\beta$  cells or pancreatic islets to high glucose (HG) concentrations impairs their glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and decreases the processing of insulin (Eizirik et al., 1992). Interestingly, mitochondria dysfunction (Fex et al., 2018) and ER stress (Karunakaran et al., 2012) as well as perturbations of  $Ca^{2+}$  homeostasis (Madec et al., 2013), have been largely associated with glucotoxicity-mediated  $\beta$  cell dysfunction, highlighting the crucial role of these two organelles in T2D-related  $\beta$  cell failure. Particularly, changes in mitochondria structure (Anello et al., 2005), decreased mitochondrial respiration (Barlow and Affourtit, 2013), reduced mitochondrial ATP production (Masini et al., 2014) and altered mitochondria dynamics (Yoon et al., 2011) underlies glucotoxicity-mediated  $\beta$  cell dysfunction. In addition, ER  $Ca^{2+}$  depletion (Madec et al., 2013) and activation of the unfolded protein response (UPR) (Karunakaran et al., 2012) are associated with glucotoxicity-induced  $\beta$  cell dysfunction.

### 2.2 Endoplasmic reticulum

The ER constitutes nearly 50% of the total membrane making up an animal cell, however this percentage can vary depending on the cell type. The ER forms a network of flattened saccules and interconnected tubules extending

throughout the cytosol from the nuclear envelope to the cell cortex, occupying 9% of the total cell volume (Alberts, 2000; Chen et al., 2013). The ER also undergoes dynamic rearrangements, such as the extension of tubules and their movement. As a result, the reticulum is not isolated in the cell, but connected to other organelles such as the mitochondria, but also forms close contacts with the plasma membrane, endosomes, lysosomes, peroxisomes and the Golgi apparatus. It thus directs cell function and fate through lipid and calcium exchanges, these contact zones being called MCS (Membrane Contact Site) (Wang and Dehesh, 2018). Thus, the ER allows different functions to be performed, depending on the zone where it is found.

Structural alteration of the morphology of the ER has already been associated with various pathologies such T2D, for example, through the observation of ER dilatation in pancreatic  $\beta$  cells of diabetics (Masini et al., 2017), but also neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (Katayama et al., 2004), classified in the category of diseases called "Organelle diseases."

The structure of the ER can vary according to cell type or physiological state: in cells with a high secretory capacity, the ER is very dense and organized in a thin layer of cisterns. In the  $\beta$  cell, the ER forms an extensive network throughout the cell, consisting mainly of RERs (Rough ER).

The ER has a key role in the biosynthesis of proteins, whether transmembrane or water-soluble, and also serves as the cell calcium reserve. The concentration of calcium in the ER lumen is of the order of 1–2mM, which is 1000–10,000 times higher than the cytosolic concentration which is within the range of 0.1–1  $\mu$ M; despite such an amount of calcium, fine decreases in calcium within the ER can lead to cellular dysfunction (Wiel et al., 2014). On the other hand, the majority of calcium is bound to Ca<sup>2+</sup>-Binding Protein in the ER lumen. Calcium flows between the ER and the cytoplasm are regulated via calcium channels present in the membrane of the ER such as the STIM (Stromal Interaction Molecule Receptor), Ryanodine Receptor (RyR) and IP3R (Inositol Tri-phosphate Receptor) which are able to export calcium into the cytosol but also to transfer calcium from the reticulum to the mitochondria. The SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase) pump allows the recapture of calcium from the cytosol into the ER lumen and thus restores calcium homeostasis of the endoplasmic reticulum. In the  $\beta$  cell, there are 2 isoforms SERCA2b (Ubiquitous) and SERCA3 ( $\beta$  cell specific) (Ravier et al., 2011). The role of RyRs in the  $\beta$  cell is currently debated due to their very low expression in primary cells (Rorsman and Ashcroft, 2018). The translocon has also recently been incriminated by our team as also

playing the role of a calcium leakage channel under conditions of overexposure to fatty acids in the pancreatic  $\beta$  cell (Cassel et al., 2016).

Because of its control of calcium homeostasis and insulin conformation, the endoplasmic reticulum plays a particularly important role in the secretion of insulin in response to glucose in the pancreatic  $\beta$  cell, making it very sensitive to energy overloads such as those induced by prolonged exposure to glucose or lipids (see Section 2.3).

### 2.3 ER stress and $\beta$ cell dysfunction induced by gluco/lipototoxicity

ER stress or UPR (Unfolded Protein Response) is the ER inability to conform proteins in response to excessive energy requirement and will induce the accumulation of misfolded proteins in the ER lumen. This adaptive response aims to boost the ER functionality but also to slow down the arrival of newly synthesized proteins. ER stress is characterized by an increase in the transcription of chaperone proteins, enzymes involved in protein folding and ER dilatation (Cnop et al., 2017; Walter and Ron, 2011) and by the activation of three signaling pathways, the PERK (Protein Kinase RNA-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) or IRE1 (Inositol-requiring protein 1) pathway. In homeostasis conditions, PERK, IRE1 and ATF6 are associated with the chaperone protein Grp78 (Glucose related protein 78) which prevents their activation. In case of accumulation of misfolded proteins, Grp78 dissociates from PERK, ATF6 and IRE1, which induces their activation.

The primary function of the  $\beta$  cell is the secretion of insulin in response to glucose. During glucose stimulation, insulin synthesis accounts for about 50% of the total protein synthesized. It is estimated that, in a hyperglycemic context, about 1 million pro-insulin molecules per minute are produced (Schuit et al., 1988). In addition, proinsulin requires the formation of three disulfide bridges in the ER. It is not surprising that such a bioenergetic demand activates the UPR pathways, an activation that becomes deleterious to the cell when this activation is chronic.

It is now clearly established that glucotoxicity and lipotoxicity are stress inducers of the ER in the pancreatic  $\beta$  cell (Kaufman et al., 2010). It is also accepted that glucotoxicity may amplify ER stress induced by lipotoxicity (Bachar et al., 2009). The oxidoreductases PDI (Protein Disulfide Isomerase) and Ero1 (ER oxidoreductin 1) are abundant in the ER and facilitate the oxidative folding of proinsulin. Ero1 $\alpha$  overexpression in cells expressing a mutated form of proinsulin results in less ER stress in these cells

(Wright et al., 2013). Prolonged ER stress induced by chronic exposure to high glucose concentrations causes apoptosis of  $\beta$  cells via activation of CHOP, JNK and caspase 12. Overexpression of CHOP stops cell growth and induces apoptosis (Matsumoto et al., 1996). CHOP, also known as GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible gene 153), is a transcription factor regulating genes associated with cell survival or death. For example, it regulates the Bcl2 (B-cell lymphoma 2), TRB3 (tribbles-related protein3), GADD34, DOCS (Down-stream of CHOP) genes (Li et al., 2014; Liew et al., 2010). CHOP expression also appears to be dependent on other actors such as ERK1/2, a protein whose expression reflects the secretory demand in the  $\beta$  cell (Lawrence et al., 2008). It is also noted that glucotoxicity or lipotoxicity also both alter reticular calcium homeostasis. It is through the decreased expression of SERCA2b that the ER calcium stocks are reduced accordingly (Hara et al., 2014), but also through calcium leakage from the translocon (Cassel et al., 2016).

Islets of T2D also express ER stress markers, with increased expression of p53, CHOP, ATF3 (Activating Transcription Factor 3) and Grp78 (Cnop et al., 2017). On the other hand, Engin et al. show a decrease in the expression of ATF6, XBP1s and P-eIF2 $\alpha$  in islets of T2D, which could suggest a functional defect of the UPR pathways after advanced diabetes (Engin et al., 2014). Conversely, in islets of obese Ob/Ob or HFD (High Fat Diet) mice, the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is increased, as well as there is a decrease in ATF6 expression (Engin et al., 2014). ER structure is also altered in the context of T2D in which a net dilatation of the endoplasmic reticulum is observed (Masini et al., 2017).

Together, these results demonstrate the primary involvement of the ER in the functional alterations associated with glucolipotoxicity and T2D.

## 2.4 Mitochondria and calcium

Like the ER, mitochondria play a key role in  $\beta$  cell function by coupling glucose metabolism to insulin secretion and regulating apoptotic cell death via the production of reactive oxygen species (ROS) and release of Cytochrome C. Mitochondria play also a central emerging role in  $\beta$  cells by mediating the suppression of insulin secretion in T2D (Las et al., 2020).

The mitochondria consists of a double membrane, the inner membrane (IMM, Inner Mitochondrial Membrane) forming crests surrounding the mitochondrial matrix, the outer membrane (OMM, Outer Mitochondrial Membrane) delimiting the contours of the mitochondria and in contact with

the cytosol, the OMM is also in contact with the inter-membrane space located between the OMM and the IMM (De Pinto et al., 2010; Ghadially, 1975). These mitochondrial membranes have different permeability and composition. Thus the IMM contains cardiolipins which render it impermeable to ions and other molecules, and includes the different complexes of the respiratory chain (Complex I to IV) as well as ATP synthase (Complex V) and allows mitochondrial respiration (Nouette-Gaulain et al., 2016). The matrix is the seat of the  $\beta$ -oxidation of fatty acids and pyruvate, but also the initiating point of the citric acid cycle; this enzyme-rich space is also the starting point of cellular respiration. The OMM contains channel proteins called porins which render it freely permeable to ions and small molecules of about 10 kilodaltons or less. It is also the site of lipid exchanges and of numerous proteins that stabilize contacts between the mitochondria and other organelles (Tagaya and Arasaki, 2017).

The regulation of calcium homeostasis is essential in  $\beta$  cell by its role in driving insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis, in proliferation and in viability; all processes that fail during the development of T2D (Sabatini et al., 2019). Cytosolic calcium and reticular calcium have long remained at the forefront as major actors in calcium signaling, leaving aside mitochondria; however, the appearance of new probes specific for mitochondrial calcium (such as 4mtD3CPV) (Palmer et al., 2006) has brought back the importance of calcium in mitochondrial and broader scale in cell function. Calcium concentrations in the mitochondria are of the order of 100 nM, 10,000 times lower than in the ER, however, fine changes in these concentrations play a major role in mitochondrial function and dysfunction. It is now accepted that the role of the mitochondria is central to cellular metabolism through its regulation of cytosolic calcium signals, oxidative phosphorylation, cell death and secretory mechanisms (Mammucari et al., 2018; Takeuchi et al., 2015).

Different calcium channels and transporters are involved in the regulation of mitochondrial calcium, located either on the OMM or the IMM. The mitochondria is capable of responding rapidly to an increase in cytosolic calcium and acts as a buffer that helps regulate calcium homeostasis. It is indeed easy for calcium to pass through the IMM due to the presence of a key actor, mitochondrial porin VDAC which interacts with the ER receptor ITPR to control the calcium entry. However, the passage of calcium within the matrix is more difficult due to the impermeability of the IMM and is only allowed by a few key proteins. VDAC exists in three isoforms, VDAC1, VDAC2, VDAC3, but VDAC1 is the most expressed isoform

(De Pinto et al., 2010). VDAC1, also allows the entry of metabolites into the mitochondria such as pyruvate, ATP and NADH (Gincel et al., 2000; Rostovtseva and Colombini, 1997; Shoshan-Barmatz et al., 2017). Only since 2011, a new actor in mitochondrial calcium control has emerged, the MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) (De Stefani et al., 2011). The MCU is located in the IMM and controls the entry of calcium into the mitochondrial matrix. The MCU is composed of different ancillary subunits such as MCUb, MICU1/2 (Mitochondrial Calcium Uptake 1/2), EMRE (Essential MCU Regulator). These different subunits form a complex of about 480 kDa (Baughman et al., 2011). MICU1/2 regulates MCU activity through its calcium-binding capacity, MICU2 as an inhibitor and MICU1 as either an activator or inhibitor depending on the cytosolic calcium concentrations (Logan et al., 2014). The under-expression of MCU or its partners is also responsible for impaired insulin secretion, raising the important role of mitochondrial calcium control in pancreatic  $\beta$  cell function (Mammucari et al., 2018; Wiederkehr et al., 2011). There are also two major pathways for calcium exit from the matrix provided by  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}$  Exchangers (NCLX) and  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchangers (HCX). They are activated to avoid a deleterious effect of calcium accumulation in the mitochondria (Palty et al., 2010). Nita et al. (2014) were able to demonstrate the contribution of NCLX to pancreatic  $\beta$  function. The under-expression of NCLX by siRNA (Small interfering Ribo Nucleic Acid) results in mitochondrial calcium accumulation but slow reflux, resulting in a delay in insulin secretion in response to glucose, demonstrating the critical role of mitochondrial calcium regulation in  $\beta$  function. NCLX also constitutes the major mitochondrial  $\text{Na}^+$  uptake pathway.  $\text{Na}^+$  channels also elicit a strong glucose-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  rise by depolarizing the cells and thereby upregulating  $\text{Ca}^{2+}$  influx of the L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (LTCC). This cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  response was propagated by mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake that was followed by enhanced metabolic activity and ATP production. Thus, the NCLX plays a dual role in pancreatic  $\beta$  cells in triggering  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Both signals propagate into the mitochondria and control the metabolic activity, and the insulin secretion (Kostic and Sekler, 2019; Nita et al., 2015).

The consequences of calcium accumulation in the mitochondria were first described in 1961 (Deluca and Engstrom, 1961) linking mitochondrial calcium to ATP production. Rutter et al. have also demonstrated the importance of increased mitochondrial calcium in ATP synthesis in the  $\beta$  cell, which is dependent on the activity of the MCU (Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$



Uniporter) allowing the passage of calcium in the mitochondrial matrix (Rutter et al., 2006). The importance of calcium accumulation in the mitochondria in the functionality of the  $\beta$  cell has been elegantly demonstrated by the use of the S100G protein, which buffers calcium from the mitochondrial matrix and reduces ATP production and consequently insulin production (Wiederkehr et al., 2011), results that were later found by others (Alam et al., 2012; Quan et al., 2015; Tarasov et al., 2013). The entry points for calcium into the mitochondria can be multiple. The close contact between the ER (the cell calcium stock) and the mitochondria promotes calcium exchange by creating microdomains (Csordás et al., 2006).

Increased calcium concentrations in the mitochondria can also cause deleterious effects, such as the production of Reactive Oxygen Species (ROS) (Satrústegui et al., 2007). Prolonged induction of calcium accumulation in the mitochondria can lead to the opening of the Permeability Transition Pore (PTP). Its opening causes depolarization of the IMM leading to decoupling of the respiratory chain, but also the release of cytochrome C (Cyt C), which is the cause of apoptosis induction (Bernardi et al., 2006). Similarly, the increase in VDAC1 expression induces an oligomerization between several VDAC1s causing the release of Cyt C and consequently the apoptosis of the cell (Zalk et al., 2005). Interestingly, Cyclophilin D (CypD) located in the mitochondrial matrix seems to play a role in the opening of PTP, its ablation (KO CypD) doubles the calcium threshold required at the opening of PTP; on the other hand, the overexpression of CypD desensitizes the cell to apoptosis (Basso et al., 2005).

Mitochondria play a central role in glucose metabolism in liver, the main target of insulin signaling and the role of their dysfunction in hepatic metabolic diseases as obesity and T2D was recently discussed by our team (Morio et al., 2020). Mitochondria also play a key role in glucose metabolism and insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. The regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  of mitochondrial function in pancreatic  $\beta$  cells and the evidence that mitochondrial dysfunction in  $\beta$  cells is associated with T2D was extensively discussed in a recent review by Georgiadou and Rutter (2020).

## 2.5 Mitochondrial dynamics

Mitochondria, like ER, are dynamic cellular organelles with a pivotal role for the physiology of the cell and especially in  $\beta$  cells, by coupling glucose metabolism to insulin secretion. In most eukaryotic cells including  $\beta$  cells, mitochondria constitute a dynamic and interconnected fused/tubular

network with fissioned, fragmented, or punctiform populations, allowed by the plasticity of the organelle. They can move along the microtubules, by fission or fusion, forming a constantly evolving network that adapts precisely to the energy demands of the subcellular compartments (Benard et al., 2007).

The main proteins involved in the regulation of OMM fusion are Mfn1 (Mitofusin 1) and Mfn2 (Mitofusin 2), members of the dynamin-related GTPase family. Despite their homologies, these two isoforms have different roles. Mfn1/2 are embedded in the OMM and form bridges between the mitochondria through the generation of hetero-oligomers. Mfn1 has a ubiquitous expression (Ishihara et al., 2004), while Mfn2 has a tissue differential expression (Bertholet et al., 2016). Mfn1 promotes contact between mitochondria and is dependent on GTP hydrolysis. Nevertheless, mitochondrion-mitochondrial contacts by homotypic interaction of Mfn1 are 100 times stronger than those induced by Mfn2. Although the role of Mfn2 is still debated to date, both isoforms are essential for mitochondrial fusion, their under-expression is in favor of fission. Mfn2 also plays a role in the inter-organismal contacts notably with the ER (de Brito and Scorrano, 2008).

The fusion of the IMM is enabled by the GTPase OPA1 (Optic Atrophy 1). Its loss initiates a breakdown of mitochondrial dynamics and an increase in susceptibility to apoptosis (Meeusen et al., 2006). Conversely, its overexpression is protective against apoptosis (Cipolat et al., 2006). Its expression is ubiquitous, it is localized in the mitochondrial inter-membrane space and is anchored at the IMM (Olichon et al., 2002).

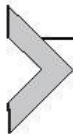
Drp1 (Dynamin-Related Protein 1) is a central actor in fission. This GTPase associates with the OMM via Fis1 (Fission protein 1) considered as the “receptor” of Drp1. After activation, DRP1 is recruited by specific receptors on the OMM which leads to the oligomerization of DRP1 and the formation of a ring of Drp1 around the mitochondrion allowing its constriction. The last step leading to division or fission of the organelle is obtained by hydrolysis of GTP to PIB via Drp1 (Frank et al., 2001).

The relationship between mitochondrial dynamics and bioenergetics could be bi-directional, i.e., the mitochondrial function influences its morphology and vice versa (Benard et al., 2007). Picard and Turnbull (2013) have suggested that the balance between fission and fusion processes is positively correlated with the ability of mitochondria to adapt to the nutritional environment. Excessive food consumption has been shown to lead to fission of the mitochondrial network in association with mitochondrial dysfunction, increased ROS production and insulin resistance (Putti et al., 2015).

Fission is also necessary for mitochondrial biogenesis (Cho et al., 2017) and a means for the cell to eliminate dysfunctional mitochondria by mitophagy (Youle and Narendra, 2011).

## 2.6 Role of mitochondrial dynamics in insulin secretion by the $\beta$ cell

The secretion of insulin in response to glucose requires mitochondrial production of ATP, which is responsible for the membrane depolarization that induces the exocytosis of insulin vesicles. Insulin secretion is therefore a reflection of mitochondrial function. Involvement of mitochondrial dynamics in response to acute glucose stimulation was studied by Jhun et al. on the INS1-E rat  $\beta$  cell line. They observed first of all that before stimulation, the percentage of cells in a state of fusion, i.e., associated with tubular mitochondria, was in the majority. Nevertheless, as soon as glucose is added after only 5 min and with a peak at 15 min, the mitochondria fission punctually to return after 1 h to their initial tubular state. Inhibition of mitochondrial fission by a truncated Drp1 adenovirus blocks glucose-induced point fission but also blocks insulin secretion, which is correlated with a decrease in ATP production, membrane potential and respiration blockade (Jhun et al., 2013). This study highlights the important role of mitochondrial dynamics in the mitochondrial functionality of respiration and thus in insulin secretion in response to glucose. Moreover, changes in the expression of mitochondrial fission/fusion proteins as Drp1 by glucotoxicity and/or lipotoxicity in response to metabolic stresses have been shown to impair mitochondrial dynamic and ultrastructure in  $\beta$  cells, and so organelle energetics leading to  $\beta$  cell death (Men et al., 2009; Park et al., 2008). Likewise, Drp1 is overexpressed in the  $\beta$  cells from hyperglycemic T2D mice (Reinhardt et al., 2016). Very recently, Vig et al. reviewed in various in vitro models of murine  $\beta$  cells that Drp1 or Fis1 overexpression was generally associated with increased mitochondrial fission, altered mitochondrial bioenergetics,  $\beta$  cell GSIS and survival (Vig et al., 2021). But precise Fis1 expression maintaining mitochondrial network was required for glucose responsiveness in INS-1 cells (Schultz et al., 2016). Moreover, restoring mitochondrial network by increasing fusion and reducing fission protects beta cells from nutrient-induced stress and apoptosis (Molina et al., 2009). But the precise role of mitochondrial dynamics in the secretion of insulin in response to glucose remains to be elucidated.



### 3. Physiological roles of MAMs

The notion of inter-organizational contacts emerged in the 1970s and they are now called MCS (Membrane Contact Sites) (Simmen and Tagaya, 2017). To date, many MCS have been discovered, the endoplasmic reticulum is one of the major actors at the center of these contacts due to its occupation of more than 50% of the cytoplasm. The major MCS are the contacts ER-mitochondria, ER-plasmic membrane, ER-Golgi apparatus, ER-lysosome, ER-lipid droplet, ER-endosome, Mitochondria-Peroxisome, Lysosome-Lipid droplet, Peroxisome-Lipid droplet and Lysosome-Endosome. These contact zones are the seat of ionic and lipid exchanges between organelles (Simmen and Tagaya, 2017) and are present in all the Eukaryotic cells. The first study proving the existence of contact between ER and mitochondria was that of Bernhard in 1952 in the liver (Bernhard et al., 1952). Linked to the evolution of imaging tools, this observation was confirmed by others (Mannella et al., 1998; Meier et al., 1981; Perkins et al., 1997), until the development of protocols for isolating these ER-mitochondrial contacts (Vance, 1990), which are now classically called “Mitochondria-Associated ER Membranes” or MAMs or sometimes MERCs (mitochondria-ER contacts).

#### 3.1 Ultrastructure of MAMs

The contact between the ER and the mitochondria is defined as the proximity between these two organelles between 0 and 50 nm. They result from membrane apposition between these two organelles, but are in no way a fusion (Csordás et al., 2006). These contacts occur over about 20% of the mitochondrial surface, although the frequency and proximity of these contacts depends on the cellular conditions and cell type (Bravo et al., 2011). These contact points can be formed with both RER and SER (Smooth ER) (Giacomello and Pellegrini, 2016). The most frequently found distances are those between 10–15 and 25–30 nm. Moreover, a mitochondria can have several contact points and the same ER tubule can be associated with several mitochondria, which makes the analysis even more complex. These ER-mitochondrial interactions are dynamic interactions that evolve, for example, according to the metabolic status or the stress state of the cell. But there are also functional interactions that allow both calcium and lipid exchanges.

## 3.2 Calcium exchanges

The endoplasmic reticulum is the major source of calcium in the cell, its release takes place at the contacts between the ER and the mitochondria via calcium channels such as IP3R on the ER side and VDAC1 on the OMM side (Rizzuto et al., 1998). These calcium transfers allow physiological regulation of mitochondrial function but can also be pro-apoptotic. These ER-mitochondrial contacts are defined as micro-domains, seats of calcium influxes to the mitochondria. The proximity between IP3R and VDAC1 is allowed by the presence of the chaperone protein Grp75 (Glucose Related Protein 75) which associates with both VDAC1 and IP3R. The VDAC-IP3R-Grp75 complex ensures the passage of calcium to the inter-membrane space, the passage to the mitochondrial matrix is less easy because it is dependent on MCU, which must face the VDAC1 channel for the transfer to take place (Rizzuto et al., 2012). The release of reticular calcium to the mitochondria can have different functions:

### 3.2.1 Activation of calcium signaling within the mitochondria

Calcium accumulation in the mitochondria activates the function of certain mitochondrial enzymes and promotes oxidative phosphorylation and thus the production of ATP (Satrústegui et al., 2007). Notably mainly through the activation of three dehydrogenases of the citric acid cycle, PDH (Pyruvate Dehydrogenase), ODGH (Oxoglutarate Dehydrogenase) and ICDH (Isocitrate Dehydrogenase) (Biamonti et al., 2018). The small amounts of calcium in the cytosol cannot allow a calcium increase as great as that resulting from the direct transfer between the two organelles. Thus the presence of these micro-domains in contact with the ER is essential to induce calcium-dependent processes. Under physiological conditions, ER-mitochondrial contacts promote these calcium transfers to the mitochondria and coordinate the production of ATP, but contacts that are too close or too prolonged sensitize the mitochondria to calcium overload and eventually to apoptosis by opening the PTP permeabilization pore as demonstrated by Csordas et al. in several cell lines as lymphoma and also in purified hepatic mitochondria (Csordás et al., 2006).

Although logic would dictate that chaperones are found only near the translocon to ensure folding of the proteins forming in the ER, they are dispersed throughout the ER. Many of these chaperones nevertheless perform many different functions apart from folding and handling misfolded proteins. In particular, these numerous chaperones are capable of regulating calcium

flows either directly by regulating the activity of the IP3R channel, or indirectly by controlling the availability or quantity of calcium within the ER (Gutiérrez and Simmen, 2018). It is therefore not surprising to find them at the MAMs.

Calnexin is one of these chaperones, when palmitoylated, it interacts with the SERCA2b calcium recapture pump and favors calcium recapture and thus preserves the balance of reticular calcium stocks by limiting transfers. Conversely, during ER stress, calnexin becomes less palmitoylated and its function changes from calcium regulation to chaperone function. Moreover, during ER stress, it is less present in the MAMs, whereas in basal condition calnexin is enriched (Lynes et al., 2013). The location of calnexin within specific microdomains in the ER could be done in particular through a “tether” to MAMs such as Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS-2) (Li et al., 2020; Thomas et al., 2017). This localization to MAMs is made possible by the presence of a transmembrane domain in addition to the cytosolic domain in its structure. In addition, the palmitoylation state of calnexin may condition its interaction with the translocon.

Together with calnexin, calreticulin allows the management of proteins that are not completely folded in the reticulum. Through SERCA it can also play a role in calcium fluxes. Because of its ability to bind calcium, its over-expression increases reticular calcium stocks and decreases calcium fluxes to the mitochondria as well as contact between the ER and the mitochondria (Wang et al., 2012).

Grp78 also plays an important role in the control of RE-mitochondrial calcium fluxes, indeed Grp78 is able to bind calcium but also the IP3R channel (Lièvreumont et al., 1997). Its binding with the IP3R channel allows to regulate its assembly in the form of tetramer and thus to positively regulate its activity. This interaction is disrupted under the influence of ER stress, as Grp78 takes up the misfolded proteins (Higo et al., 2010). The ability of Grp78 to bind calcium may be important in the early stages of development of ER stress. Indeed, ER stress is generally accompanied by an increase in Grp78 expression and a greater calcium transfer between the two organelles. Grp78 could thus promote a greater availability of calcium for transfer. Moreover, Grp78 regulates calcium stocks through its interaction with the translocon by preventing calcium leakage (Schäuble et al., 2012).

Sig1R (Sigma 1 receptor) is a chaperone protein that forms a complex with Grp78/at MAMs. Calcium depletion of the ER (caused by ER stress) induces its dissociation with Grp78 and leads to prolonged calcium transfer to the mitochondria via the IP3R channel (Hayashi and Su, 2007). The

generation of a truncated form of Sig1R, unable to interact with IP3R, has highlighted the crucial role of Sig1R in the positive regulation of calcium flows between the ER and the mitochondria and the production of ATP. The truncated form of Sig1R, on the other hand, decreases ATP production and promotes apoptosis (Shioda et al., 2012).

There are other less described proteins that also have a role in calcium flow control such IP3R regulators, either negative such as ERp44 (Endoplasmic resident protein 44) or positive such as Ero1 $\alpha$  (Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1) or PML (Promyelocytic leukemia) that could contribute to this dysfunction (Anelli et al., 2012; Higo et al., 2005).

### **3.2.2 Activation of mitochondrial fission by calcium**

The precise events involved in mitochondrial fission remain unclear, however recent studies show that IMM constriction occurs through calcium-dependent mechanisms at the MAM level (Chakrabarti et al., 2018; Cho et al., 2017). These studies define the important role of MAMs in the IMM constriction that precedes the recruitment of Drp1 (necessary for MMO constriction). IMM constriction occurs at the areas of contact between the ER and the mitochondria. The intra-mitochondrial calcium fluxes generated by these contacts thus potentiate the constriction of the IMM, causing K<sup>+</sup> to enter the mitochondrial matrix, the depolarization of the IMM, the activation of OMA1 (Overlapping with the M-AAA protease 1 homolog) which ensures the cleavage of OPA1 into S-OPA1 and neutralizes the attachment of the OMM to the IMM by the rupture of the MICOS complex (Mitochondrial contact site and Cristae Organizing System) (Kozjak-Pavlovic, 2017). In addition, this phenomenon is abolished by the loss of the MCU, which induces mitochondrial elongation. This model could also be dependent on actin filament polymerization by IFN2 (Inverted formin 2), an ER protein promoting the formation of contacts between the ER and the mitochondria and the transfer of calcium to the mitochondria, as recently demonstrated by Chakrabarti et al. using INF2-KO cell line (Chakrabarti et al., 2018). However, the precise role of actin filament polymerization in mitochondrial fission remains to be clarified.

### **3.2.3 Induction of apoptosis by calcium**

The role of prolonged calcium accumulation in apoptosis has already been described in beta cells and in the development of T2D (Sabatini et al., 2019). When VDAC (in the OMM) faces ANT (IMM), they form PTP and allow cytochrome C output and induction of apoptosis (Kumarswamy and

Chandna, 2009). In our team, we have been able to show the presence of CypD in MAM fractions, as well as its role in controlling the interactions and calcium exchanges between ER and mitochondria in the heart (Paillard et al., 2013) and liver (Rieusset et al., 2016; Tubbs et al., 2014). However, its precise role in this regulation remains to be elucidated.

### 3.3 Role of MAMs in mitochondrial dynamics

There is a very close link between mitochondrial and reticular dynamics. Mitochondrial fission takes place at a point where the ER tubules wrap around the mitochondria and apply persistent constriction throughout mitochondrial fission. Recruitment of the ER to the mitochondrion at the fission site takes place independently of the recruitment of Drp1 and Mff (Mitochondrial fission factor) (Friedman et al., 2011), but the mechanisms underlying the approximation of the ER that precedes the recruitment of these two proteins remain unclear. The diameter of the mitochondria is reduced at the contact zone with the ER. The zone of contact between the ER and the mitochondria is also the site of Drp1 recruitment. Drp1 nevertheless seems to play a role in the structural maintenance of the mitochondria and the ER, as demonstrated by the generation of Drp1 mutants where the mitochondria have a swollen or tubular appearance and a stronger proximity to the nucleus (Pitts et al., 1999). In addition, these two organelles also remain linked when they move along the microtubules. The movements of the ER are more frequent than those of the mitochondria and it would seem that the ER “finds” the mitochondria to form the MAMs and not the other way around (Friedman et al., 2011).

Many candidates could be chosen among the proteins making up MAMs. Mfn2 is known for its involvement in the regulation of fusion/fission mechanisms. It is localized on both the ER and the mitochondria. Several studies show that Mfn2 by homologous (Mfn2-Mfn2) or heterologous (Mfn2-Mfn1) oligomerization forms bridges between the ER and the mitochondria and thus its invalidation destabilizes the ER-mitochondrial interactions (de Brito and Scorrano, 2008; Naon et al., 2016). Other studies show that the under-expression or KO of Mfn2 induces an increase in ER-mitochondrial contacts associated with induction of calcium transfer to the mitochondria (Filadi et al., 2015; Wang et al., 2015). These contradictory results reveal the complexity of the role of Mfn2 in the formation of contacts between the mitochondria and the ER and the debate remains open (Filadi et al., 2017). In addition, Mfn2 is a known actor in the regulation of



mitochondrial dynamics, but it also plays a role in the control of organelle stress and autophagosome formation (Filadi et al., 2018). It cannot be excluded that underexpression of Mfn2 could generate compensatory mechanisms of protein overexpression or protein relocation at MAMs which would explain these contradictory results. Finally, the partial functional redundancy between the two isoforms Mfn1/Mfn2 could justify this hypothesis.

### 3.4 ER Stress and MAMs

Pharmacological induction of ER stress by tunicamycin or thapsigargin increases contact between the ER and the mitochondria, but the mechanisms underlying this increase are still poorly understood (Arruda et al., 2014; Bravo et al., 2011). The adaptive UPR response, a key factor in ER stress, induces the activation of different adaptive pathways such as the PERK-ATF4 pathway. PERK underexpression decreases ER-mitochondrial contacts, a decrease restored by PERK re-expression in PERK<sup>-/-</sup> cells. These results show the importance of PERK in the formation of contacts between the ER and mitochondria during ER stress. PERK contributes to the induction of apoptosis by maintaining the expression of the pro-apoptotic factor CHOP but also by facilitating the transfer of calcium to the mitochondria, in addition it promotes the propagation of ROS between the ER and the mitochondria (Verfaillie et al., 2012).

Mfn2 is regulated by Glycoprotein 78 (Gp78), an ubiquitin ligase of the ERAD system. It degrades Mfn2 and promotes ER-mitochondrial interactions, but the underlying mechanisms are still complex.

### 3.5 Autophagy/mitophagy and MAMs

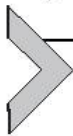
Autophagy is a process that allows the degradation and recycling of cellular components. A membrane extension is formed around the cellular compound to be degraded and forms an autophagosome, which will then fuse with the lysosome to form the autolysosome and thus degrade a cytosolic fraction or an entire organelle. The autophagosome is formed at the site of the ER-mitochondrial contacts. After dietary restriction, the markers ATG5 (Autophagy related gene 5) and ATG14 are located at the MAMs. The presence of syntaxin 17 at the ER also allows the recruitment of ATG14 at the MAMs (Hamasaki et al., 2013). The under-expression of MAMs proteins such as PACS2 or Mfn2 reduces the number of

autophagosomes, which reinforces the involvement of MAMs in autophagy (Naon and Scorrano, 2014).

### 3.6 Distance of ER-mitochondria contacts and functions

Current technical advances now allow us to determine the exact proximity between the ER and the mitochondria within MAMs, raising new questions: Are there different types of MAMs? Does proximity matter in the protein and functional composition of ER-mitochondrial contacts? A recent review proposes the elegant hypothesis that each distance of MAMs could be associated with different functionalities: linking distances between 0 and 10 nm to lipid exchanges, those around 20 nm to calcium exchanges and those close to 30 nm to mitochondrial fission, categorizing these interactions between MAMs-lipid, MAMs-Ca<sup>2+</sup>, MAMs-fission (Giacomello and Pellegrini, 2016). This model has been partly studied in hepatocytes by using linkers of different sizes to artificially create ER-mitochondrial contacts. A study in leukemia and cardiomyocyte cell lines showed that contacts that are too close, incompatible with the size of the IP3R channel, block inter-organite calcium transfers, directly implying the importance of the proximity between the ER and the mitochondria (Csordás et al., 2010).

The type of ER, smooth or rough, could also be involved in the determination of the type of MAMs, with a differential effect of the under-expression of Gp78 on RER-mitochondria and SER-mitochondria contacts (Wang et al., 2015). It cannot be excluded, however, that there may be a cell type-specific profile of MAMs.



## 4. MAMs and T2D

MAMs are now also involved in inflammatory processes and the development of many pathologies, such as diabetes, neurodegenerative diseases and cancer (Perrone et al., 2020). But we focus on T2D in this review.

### 4.1 The role of MAMs in hepatic, muscular and adipocyte insulin resistance

Alterations in mitochondria and ER have long been associated with insulin resistance in peripheral tissues and pancreatic  $\beta$  cell dysfunction during the development of T2D. Very recently, several studies suggest that MAMs are regulated by nutritional intake and may be involved in the development of insulin resistance, particularly hepatic and muscle resistance (Arruda et al., 2014; Tubbs et al., 2014, 2018). In peripheral tissues such as liver, muscle

or fat, the action of insulin is central to the control of energy catabolism. The mechanisms underlying insulin resistance remain poorly understood to date and the role of MAMs in the development of insulin resistance has only just emerged.

ER and mitochondria are sensors of nutritional status. Within our team, we were able to demonstrate that nutritional status (fasting/feeding) could impact the structure of MAMs. In particular, the liver of fed mice shows a decrease in contacts between the ER and the mitochondria compared to fasted mice and this regulation can be reproduced by feeding fasted mice with a sucrose solution (10%) (Theurey et al., 2016). Similarly in the HuH7 hepatocyte lineage, acute exposure (4h) to high glucose concentrations (22.5 mM Glc) decreases the number of MAMs and induces mitochondrial fission. On the other hand, the rupture of contacts between the ER and the mitochondria, via a siRNA directed against CypD or Grp75 (2 proteins at MAMs), mimics the effects of glucose on mitochondrial function and dynamics (Theurey et al., 2016). These results show that MAMs allow to adapt mitochondrial dynamics and function to nutritional status and more particularly to glucose concentrations, making MAMs metabolic sensors in hepatocytes. In addition, we have previously demonstrated in our team that the integrity of MAMs is necessary for insulin signaling in hepatocytes (Tubbs et al., 2014). In a pathological context such as in ob/ob obese mice or mice fed a diet high in sugar and fat (HFHS, High Fat High Sucrose), our team was able to show in these models a decrease in contacts between the ER and the mitochondria. This is accompanied by insulin resistance. Ex-vivo, insulin signaling can be restored by overexpression of cyclophilin D (Tubbs et al., 2014). Alteration of ER-mitochondria contacts in vitro and in vivo via modulation of MAM proteins (Grp75, Mfn2 or CypD) also induces hepatic insulin resistance (Rieusset et al., 2016; Theurey et al., 2016).

The muscle is another tissue called insulin-dependent and therefore sensitive to the action of insulin. It is the main site of insulin resistance during the development of T2D, as it is responsible for 75% of glucose utilization in response to insulin (Cheng et al., 2010; Siddle, 2011). As in the liver, we were able to demonstrate that the integrity of MAMs is essential for the development of a correct response to insulin. On the other hand, the skeletal muscles of obese mice (ob/ob or HFHS) show a rupture of the contacts between the ER and the mitochondria. Interestingly, this result was found in human myotubes made insulin-resistant by palmitate treatment and in the myotubes of obese and/or T2D patients compared to myotubes from

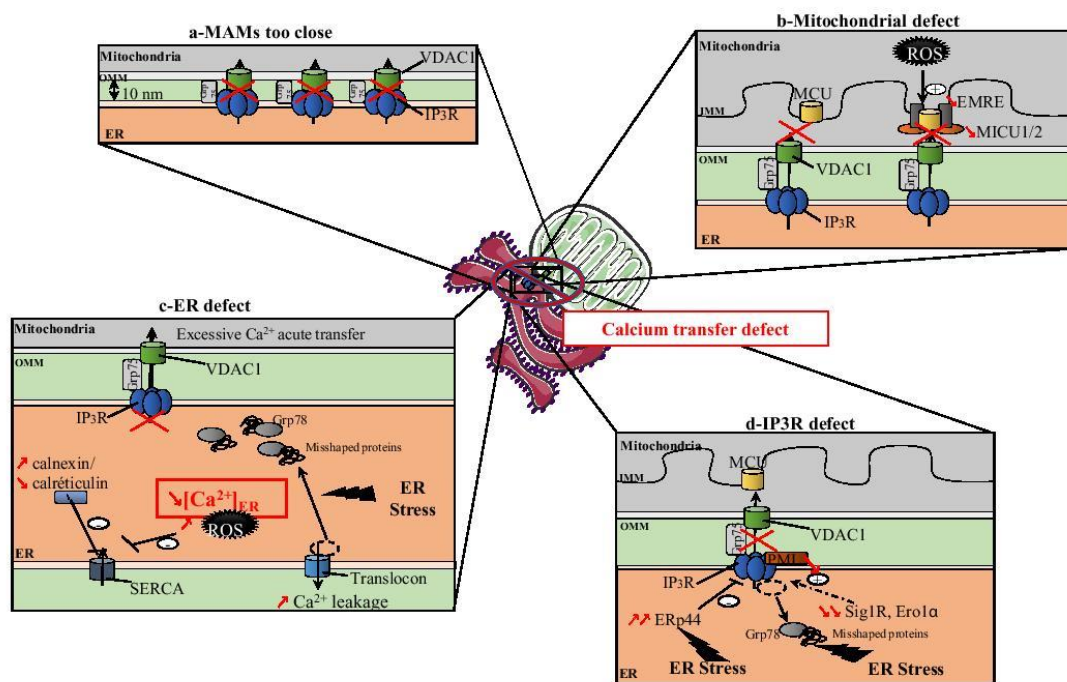
healthy subjects. Finally, decreasing ER-mitochondria contact by over-expression of the FATE1 spacer is sufficient to induce insulin resistance *in vitro* in human myotubes and *in vivo* in mouse muscle (Tubbs et al., 2018). These results place MAMs as potential novel therapeutic targets for restoring insulin sensitivity in peripheral tissues of patients with T2D but require further studies to understand the molecular mechanisms.

#### 4.2 The role of MAMs in the pancreatic $\beta$ cell in T2D

The role and phenotype of MAMs in the  $\beta$  cell have been recently explored within our team. We show, by proximity-ligation-assay (PLA) directed against IP3R1-VDAC1 that palmitate-induced lipotoxicity decreases ER-mitochondrial contact in MIN6B1 murine  $\beta$  cell line (Thivolet et al., 2017). This decrease is accompanied by an increase in the expression of various markers of ER stress, as well as a decrease in insulin secretion in response to glucose. We were also able to show by Proximity Ligation Assay (PLA) directed against IP3R2-VDAC1, on sections of pancreas from patients with T2D, a decrease in contacts between the two organelles, specifically in pancreatic  $\beta$  cells.

However, the role of MAMs in both  $\beta$  cell function and glucotoxicity-induced dysfunction remained largely unknown. In a more recent study (Dingreville et al., 2019), 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 toward a chronic disruption of organelle  $\text{Ca}^{2+}$  exchange, linked to an emptying of ER  $\text{Ca}^{2+}$  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-1E rat  $\beta$  cells stimulates ER-mitochondria interactions and  $\text{Ca}^{2+}$  exchange, in parallel with insulin secretion. Furthermore, we demonstrated that Grp75-mediated structural and functional disruption of MAMs alters GSIS in these cells, pointing out that organelle coupling is a new regulator of insulin secretion by  $\beta$  cells. As  $\text{Ca}^{2+}$  signaling at MAMs was reported to control mitochondrial bioenergetics (Cárdenas et al., 2010), and as  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria is essential for glucose-stimulated ATP increase in  $\beta$  cells (Tarasov et al., 2012), it is likely that this regulation participates in the stimulation of mitochondrial ATP production, which is required to stimulate insulin release. The dynamic increase of MAMs by transient exposure to HG is a new factor participating in GSIS and has a beneficial effect on

pancreatic  $\beta$  cells, supporting the previous notion that mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation is important for sustained insulin secretion (Wiederkehr et al., 2011). However, as often happens, critical processes in physiology can promote disease in chronic situations. We found that glucotoxicity-mediated alterations of GSIS involve a defect of both insulin content and secretion in human islets, as previously observed in T2D islets (Anello et al., 2005). We further demonstrated that glucotoxicity-associated  $\beta$  cell dysfunction also increased organelle tethering in human islets and INS-1E cells but blunted ER-mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  transfers over time (Fig. 1A). Furthermore, we show that glucotoxicity is also associated with an increase of basal  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial content and a reduction of ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores over time, without a significant change in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels (Dingreville et al., 2019). Altogether, these data point to an importance of the ER in HG-associated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  changes. Furthermore, HG-mediated induction in the expression of MICU1, and likely of MCU, may participate in increased basal mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  levels in INS-1E cells. Therefore, we propose that chronic HG stimulation empties the ER, due to the prolonged organelle  $\text{Ca}^{2+}$  exchange, leading to increased basal mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation and reduced  $\text{Ca}^{2+}$  transfer to mitochondria over time (Fig. 1B). Moreover, we found that glucotoxicity-related  $\beta$  cell dysfunction was also associated with ER stress resulting in calcium transfer defect as detailed in Section 3.2.1 (Fig. 1C and D) and with altered mitochondrial function and dynamics in both rodent and human  $\beta$  islets, in agreement with structural alterations of both organelles in  $\beta$  cells of T2D islets (Masini et al., 2017). Our data suggest that glucotoxicity-associated mitochondrial fission could be linked to mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation as the more mitochondria increase their  $\text{Ca}^{2+}$  contents the more they are fragmented, in agreement with other models (Chakrabarti et al., 2018; Cho et al., 2017). Interestingly, acute and hyperactivation of both UPR signaling and mitochondrial fission can also have beneficial and detrimental effects, respectively, on  $\beta$  cell function, as observed here for  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes at the MAM interface. Indeed, acute HG treatment induced mild UPR signaling, activating IRE1a and leading to glucose-induced insulin biosynthesis, whereas chronic HG stimulation caused hyperactivation of IRE1a, leading to the suppression of insulin expression (Lipson et al., 2006). Similarly, transient HG-induced mitochondrial fission is required for optimal GSIS (Jhun et al., 2013), whereas we and others (Molina et al., 2009) found that glucotoxicity induced mitochondrial fragmentation. Last, we demonstrate in INS-1E cells that ER-mitochondria tethering using a synthetic linker increased ER-mitochondria interactions



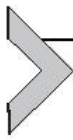
**Fig. 1** Hypothesis for calcium transfer failure in response to glucotoxicity in  $\beta$  cells as (A) MAMs too close, (B) mitochondrial defect, (C) ER defect and (D) IP3R defect. Abbreviations:  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium), EMRE (Essential MCU Regulator), ER (Endoplasmic reticulum), Ero1a (Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1), ERp44 (Endoplasmic reticulum protein 44), Grp75/78 (Glucose Related Protein 75/78), IMM (Inner Mitochondrial Membrane), IP3R (Inositol 3-Phosphate Receptor), MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter), MICU1/2 (Mitochondrial Calcium Uptake 1/2), OMM (Outer Mitochondrial Membrane), PML (Promyelocytic Leukemia), ROS (Reactive Oxygen Species), SERCA (Sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), Sig1R(Sigma 1 receptor), VDAC (Voltage Dependent Anion-selective Channel 1).

but disturbed organelle  $\text{Ca}^{2+}$  exchange (Dingreville et al., 2019), likely through a lack of structural arrangement of  $\text{Ca}^{2+}$  channels due to reduced contact gap between organelles (Csordás et al., 2010). However, we cannot exclude that the chronicity of over-expression participates in the reduction of organelle  $\text{Ca}^{2+}$  exchange. In these conditions, we observed mitochondria fission and altered GSIS in  $\beta$  cells, suggesting that sustained organelle tethering is detrimental for  $\beta$  cell function. It is likely that reinforcement of organelle interactions also empties the ER over time, leading to disrupted organelle  $\text{Ca}^{2+}$  exchange and to  $\beta$  cell dysfunction. In agreement, the rupture of ER  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, likely linked to a combination of  $\text{Ca}^{2+}$  store release and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx, was shown to play a major role in  $\beta$  cell dysfunction under diabetic conditions (Gwiazda et al., 2009; Kono et al., 2018).

We thus propose a model by which glucose differentially regulates functional ER-mitochondria interactions over time and subsequently regulates GSIS in  $\beta$  cells. An 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  $\text{Ca}^{2+}$  stocks, an increase in mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  content, and a disruption of  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from the ER to mitochondria. Simultaneously, a time-dependent alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling participates in 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  $\beta$ -cell function and thereby to the worsening of the disease over time. Therefore, disrupted  $\text{Ca}^{2+}$  signaling at the MAM interface might be a key feature of glucotoxicity-mediated  $\beta$  cell dysfunction as illustrated in Fig. 1.

A striking observation is the constant increase of organelle interactions with both acute and longer HG exposure, suggesting that the glucose-mediated increase of MAMs could be at the same time a stimulatory and a protective mechanism to compensate for reduced organelle  $\text{Ca}^{2+}$  exchange, respectively. However, we assume that the adaptive increase of MAMs in glucotoxic situations should be transitory as we observed reduced organelle interactions in  $\beta$  cells of patients with T2D as compared with control subjects (Thivolet et al., 2017). Furthermore, cells in culture and patients

with diabetes differ in terms of chronicity as cells are exposed to several days of HG against years for patients. Last, patients also present chronic dyslipidemia (lipotoxicity), and we previously showed that palmitate reduced organelle interactions in Min6B1 cells (Cassel et al., 2016). Presently, the combined effect of glucolipotoxicity on MAMs now explored in our team is still unknown and requires further investigations to try to understand the human T2D pathology. Therefore, we propose that MAM integrity could be dynamically and differentially regulated in  $\beta$  cells during the progression of T2D pathology, highlighting that MAM regulation plays an important role in the control of  $\beta$  cell function.



## 5. Conclusion

Glucolipotoxicity refers to the combined deleterious effects of high concentrations of glucose and fatty acids on insulin secretion by the  $\beta$  cell. Numerous studies have investigated the cellular and molecular mechanisms underlying the  $\beta$  cell dysfunction inherent in glucolipotoxicity (Fontés et al., 2010; Hansen et al., 2018; Karunakaran et al., 2012; Poitout et al., 2010). In our team, we have observed that glucotoxicity and lipotoxicity independently cause the same alterations, namely ER stress and mitochondrial dysfunction, which lead to altered insulin secretion in the  $\beta$  cell (Cassel et al., 2016; Madec et al., 2013; Thivolet et al., 2017). Although the alteration of organelles is the same, surprisingly, the effect on contacts between the ER and the mitochondria are different as illustrated in Fig. 2: in response to glucotoxicity, we observe a positive regulation of MAMs but a defect in calcium transfer compared to physiological conditions, whereas in response to lipotoxicity the ER-mitochondrial contacts are decreased. We also observe reticular calcium depletion associated with lipotoxicity that could contribute to it. It would thus appear that the disruption of ER calcium homeostasis is a common event in both glucotoxicity and lipotoxicity, making it a central actor in  $\beta$  cell dysfunction (Fig. 2). Indeed, free fatty acids (FFA) such as palmitate can act either by activating AG receptors such as FFA1R (Fig. 2) or after transport in the cell by AG transporters (such as FATP1: Fatty Acid Transporter Protein 1). After entering the cell, FFA are metabolized and then stored or they activate protein kinase-dependent signaling cascades, such as PKC. Glucose enters the cell via GLUT transporters and undergoes glycolysis and eventually allows the cell to produce energy. Glucose can also potentiate, in the presence of FFA, the accumulation of lipids in the  $\beta$  cell. Indeed, a simultaneous increase in lipid and carbohydrate concentrations promotes the accumulation of lipid-



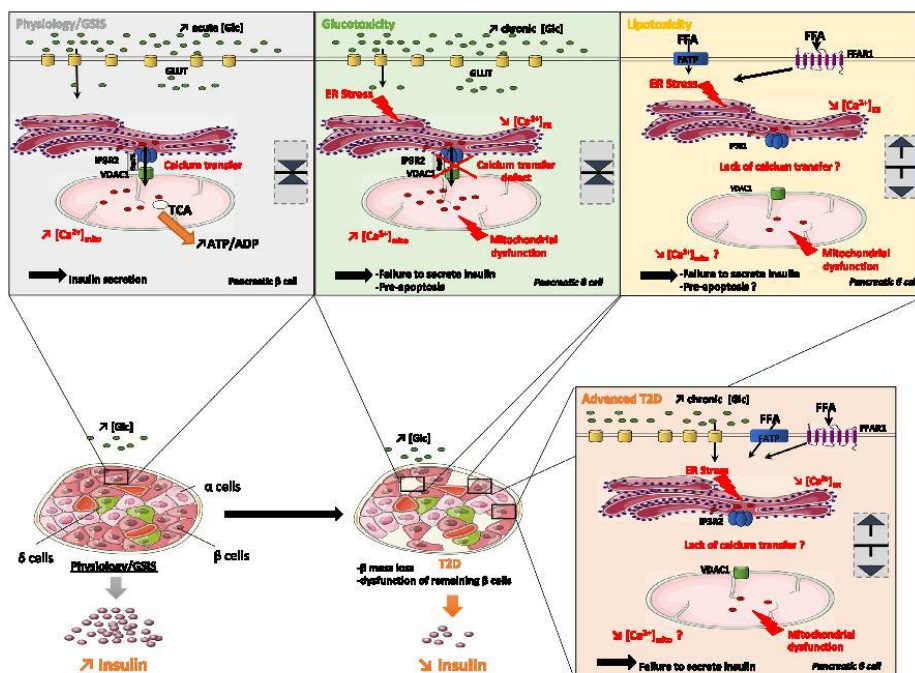


Fig. 2 Schematic representation of the role of MAMs in physiologic conditions or in conditions of glucotoxicity, or lipotoxicity and in T2D development. Abbreviations: ADP (Adenosine DiPhosphate), ATP (Adenosine TriPhosphate),  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium), FAT (Fatty Acid Translocase), FFA (Free Fatty Acid), FFAR1 (Free Fatty Acid Receptor 1), Glc (glucose).

derived molecules such as ceramides, diglycerides, triglycerides, or phospholipids (Poitout et al., 2010). The role of glucolipotoxicity in humans is still debated to this day (Weir, 2020), but the deleterious effects of glucotoxicity are nevertheless demonstrated, at least in individuals with a predisposition to the development of T2D. In our team, we have observed that patients with advanced diabetes have decreased ER-mitochondrial contact in  $\beta$  cells (Fig. 2). The disruption of ER-mitochondria contacts may be part of a temporal dynamic of T2D evolution. Initially causing an increase in ER-mitochondria contact to compensate for the energy overload and eventually the rupture of the contacts by default of compensation. It also cannot be excluded that certain subpopulations of  $\beta$  cells are more sensitive to the action of glucotoxicity (such as “pacemakers”) and that these cells enter in apoptosis more rapidly via the accumulation of calcium in the mitochondria, which could explain the significant loss of the  $\beta$  mass in type 2 diabetes (Fig. 2). Further studies on the role of MAMs in pancreatic  $\beta$  dysfunction are needed to better understand the mechanisms underlying the T2D development and to identify new therapeutic targets.

## Acknowledgments

## Funding

The author would like to acknowledge INSERM (Institut National de Sante et de Recherche Medicale, France), la Societe Francophone de Diabete (SFD, France) and the European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, Germany) for funding our works.

## Credit authorship contribution statement

Anne-Marie Madec: Resources, writing, review & editing. Johan Perrier: Resources, Baptiste Panthu: Resources. Florian Dingreville: Resources, writing.

## Declaration of competing interest

The authors report no declarations of interest.

## References

- 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<sup>2+</sup> uptake 1 (MICU1) and mitochondrial ca<sup>2+</sup> uniporter (MCU) contribute to metabolism-secretion coupling in clonal pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 287, 34445–34454.
- Alberts, B., 2000. *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- Anelli, T., Bergamelli, L., Margittai, E., Rimessi, A., Fagioli, C., Malgaroli, A., Pinton, P., Ripamonti, M., Rizzuto, R., Sitia, R., 2012. Ero1 $\alpha$  regulates Ca(2+) fluxes at the endoplasmic reticulum-mitochondria interface (MAM). *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1077–1087.

- 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.
- Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakg ul, G., G uney, 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.
- Arunagiri, A., Haataja, L., Cunningham, C.N., et al., 2018. Misfolded proinsulin in the endoplasmic reticulum during development of beta cell failure in diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2018 (1418), 5–19.
- 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.
- Barlow, J., Affourtit, C., 2013. Novel insights into pancreatic b-cell glucolipotoxicity from real-time functional analysis of mitochondrial energy metabolism in INS-1E insulinoma cells. *Biochem. J.* 456, 417–426.
- 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.
- 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., Koteliensky, V., Mootha, V.K., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345.
- 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.
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., Jonas, J.-C., 2012. The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 364, 1–27.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Blachly-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.
- 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.* 37, 281–300.
- Bertholet, A.M., Delerue, T., Millet, A.M., et al., 2016. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol. Dis.* 90, 3–19.
- Biamonti, G., Maita, L., Montecucco, A., 2018. The Krebs cycle connection: reciprocal influence between alternative splicing programs and cell metabolism. *Front. Oncol.* 8, 408.
- Bravo, R., Vicencio, J.M., Parra, V., et al., 2011. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J. Cell Sci.* 124, 2143–2152.
- 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.
- C ardenas, C., Miller, R.A., Smith, I., et al., 2010. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria. *Cell* 142, 270–283.
- Cassel, R., Ducreux, S., Alam, M.R., Dingreville, F., Berl e, C., Burda-Jacob, K., Chauvin, M.A., Chikh, K., Pa ta, 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.

- 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.
- Chen, S., Novick, P., Ferro-Novick, S., 2013. ER structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 428–433.
- Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F., 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 589–598.
- Cho, B., Cho, H.M., Jo, Y., Kim, H.D., Song, M., Moon, C., Kim, H., Kim, K., Sesaki, H., Rhyu, I.J., Kim, H., Sun, W., 2017. Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat. Commun.* 8, 15754.
- 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  $\beta$ -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1044–1054.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., et al., 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163–175.
- Cnop, M., Toivonen, S., Igoillo-Esteve, M., Salpea, P., 2017. Endoplasmic reticulum stress and eIF2 $\alpha$  phosphorylation: the Achilles heel of pancreatic  $\beta$  cells. *Mol. Metab.* 6, 1024–1039.
- 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.
- 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.
- de Brito, O.M., Scorrano, L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.
- 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.
- 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.
- Deluca, H.F., Engstrom, G.W., 1961. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 1744–1750.
- Dingreville, F., Panthu, B., Thivolet, C., Ducreux, S., Gouriou, Y., Pesenti, S., Chauvin, M.A., Chikh, K., Errazuriz-Cerda, E., Van Coppenolle, F., Rieusset, J., Madec, A.M., 2019. Differential effect of glucose on ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> exchange participates in insulin secretion and glucotoxicity-mediated dysfunction of  $\beta$ -cells. *Diabetes* 68, 1778–1794.
- Eizirik, D.L., Korbitt, G.S., Hellerström, C., 1992. Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *J. Clin. Invest.* 90, 1263–1268.
- Engin, F., Nguyen, T., Yermalovich, A., Hotamisligil, G.S., 2014. Aberrant islet unfolded protein response in type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 4, 4054.
- Fex, M., Nicholas, L.M., Vishnu, N., et al., 2018. The pathogenetic role of  $\beta$ -cell mitochondria in type 2 diabetes. *J. Endocrinol.* 236, R145–R159.
- 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–E2181.

- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., Pizzo, P., 2017. On the role of Mitofusin 2 in endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E2266–E2267.
- Filadi, R., Pendin, D., Pizzo, P., 2018. Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis.* 9, 330.
- 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. Glucolipototoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 53, 2369–2379.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., Youle, R.J., 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515–525.
- 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.
- Georgiadou, E., Rutter, G.A., 2020. Control by Ca<sup>2+</sup> of mitochondrial structure and function in pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Calcium* 91, 102282–102291.
- 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.
- 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.
- Gutiérrez, T., Simmen, T., 2018. Endoplasmic reticulum chaperones tweak the mitochondrial calcium rheostat to control metabolism and cell death. *Cell Calcium* 70, 64–75.
- Gwiazda, K.S., Yang, T.L.B., Lin, Y., Johnson, J.D., 2009. (2009). Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E690–E701.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., et al., 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393.
- 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  $\beta$ -cell iron import, cytosolic ROS formation and apoptosis. *J. Mol. Endocrinol.* 61, 69–77.
- Hara, T., Mahadevan, J., Kanekura, K., Hara, M., Lu, S., Urano, F., 2014. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to  $\beta$ -cell death. *Endocrinology* 155, 758–768.
- Hayashi, T., Su, T.-P., 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610.
- Henquin, J.C., Ravier, M.A., Nenquin, M., Jonas, J.C., Gilon, P., 2003. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur. J. Clin. Invest.* 33, 742–750.
- Higo, T., Hattori, M., Nakamura, T., Natsume, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K., 2005. Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 120, 85–98.
- 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.
- IDF, 2020. *International Diabetes Federation*.
- 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.
- 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.

- Karunakaran, U., Kim, H.-J., Kim, J.-Y., Lee, I.-K., 2012. Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and  $\beta$ -cell failure in type II diabetes. *Exp. Diabetes Res.* 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.
- 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  $\beta$ -cells. *Diabetes Obes. Metab.* 12 (Suppl 2), 99–107.
- Kono, T., Tong, X., Taleb, S., et al., 2018. Impaired store-operated calcium entry and STIM1 loss lead to reduced insulin secretion and increased endoplasmic reticulum stress in the diabetic  $\beta$ -cell. *Diabetes* 67, 2293–2304.
- Kostic, M., Sekler, I., 2019. Functional properties and mode of regulation of the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, NCLX. *Semin. Cell Dev. Biol.* 94, 59–65.
- Kozjak-Pavlovic, V., 2017. The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res.* 1, 83–93.
- Kumarswamy, R., Chandna, S., 2009. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them? *Mitochondrion* 9, 1–8.
- Las, G., Oliveira, M.F., Shrihai, O.S., 2020. Emerging roles of  $\beta$ -cell mitochondria in type-2-diabetes. *Mol. Aspects Med.* 71, 100843.
- 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.)* 192, 11–17.
- 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.
- Li, C., Li, L., Yang, M., Zeng, L., Sun, L., 2020. PACS-2: a key regulator of mitochondria-associated membranes (MAMs). *Pharmacol. Res.* 160, 105080.
- Lièvreumont, 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  $\text{Ca}^{2+}$ . *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.
- Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., et al., 2006. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab.* 4, 245–254.
- Logan, C.V., Szabadkai, G., Sharpe, J.A., et al., 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.
- Lynes, E.M., Raturi, A., Shenkman, M., et al., 2013. Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *J. Cell Sci.* 126, 3893–3903.
- 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.* 27, 5122–5130.
- Maechler, P., Carobbio, S., Rubi, B., 2006. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 696–709.
- 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.

- 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.
- Masini, M., Anello, M., Bugliani, M., et al., 2014. Prevention by metformin of alterations induced by chronic exposure to high glucose in human islet beta cells is associated with preserved ATP/ADP ratio. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 104, 163–170.
- Masini, M., Martino, L., Marselli, L., Bugliani, M., Boggi, U., Filippini, F., Marchetti, P., De Tata, V., 2017. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 33, 6.
- 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.
- 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.
- 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.
- Men, X., Wang, H., Li, M., Cai, H., Xu, S., Zhang, W., et al., 2009. Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 41, 879–890.
- 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.
- Morio, B., Panthu, B., Bassot, A., Rieusset, J., 2020. Role of mitochondria in liver metabolic health and diseases. *Cell Calcium* 9, 102336–102350.
- Naon, D., Scorrano, L., 2014. At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2184–2194.
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., et al., 2016. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 11249–11254.
- Nita, L.I., Hershinkel, M., Kantor, C., Rutter, G.A., Lewis, E.C., Sekler, I., 2014. Pancreatic  $\beta$ -cell  $\text{Na}^+$  channels control global  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and oxidative metabolism by inducing  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  responses that are propagated into mitochondria. *FASEB J.* 8, 3301–3312.
- Nita, L.I., Hershinkel, M., Sekler, I., 2015. Life after the birth of the mitochondrial  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchanger, NCLX. *Sci. China Life Sci.* 58 (1), 59–65.
- Nouette-Gaulain, K., Robin, F., Semjen, F., Obre, E., Bellance, N., Biais, M., Rossignol, R., 2016. Cytopathies mitochondriales et anesthésie. *Anesth. Reanim.* 2, 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.anrea.2016.08.006>.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., et al., 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523, 171–176.
- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P., et al., 2013. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 128, 1555–1565.
- Palmer, A.E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S.A., Lev-Ram, V., Baker, D., Tsien, R.Y., 2006.  $\text{Ca}^{2+}$  indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem. Biol.* 13, 521–530.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershinkel, M., et al., 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 436–441.

- Park, K.S., Wiedekehr, A., Kirkpatrick, C., Mattenbergherr, Y., Martinou, J.C., Marchetti, P., et al., 2008. Selective actions of mitochondria fission/fusion genes on metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *J. Biol. Chem.* 283, 33347–33356.
- 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.
- Perrone, M., Carocchia, N., Genovese, I., et al., 2020. The role of mitochondria associated membranes in cellular homeostasis and diseases. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 350, 119–196.
- Picard, M., Turnbull, D.M., 2013. Linking the metabolic state and mitochondrial DNA in chronic disease, health, and aging. *Diabetes* 62, 672–678.
- 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.
- Poitout, V., Amyot, J., Semache, M., Zarrouki, B., Hagman, D., Fontés, G., 2010. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 289–298.
- Putti, R., Sica, R., Migliaccio, V., Lionetti, L., 2015. Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front. Physiol.* 6, 109–115.
- 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 Ca<sup>2+</sup> uniporter in the generation of mitochondrial pH gradient and metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *J. Biol. Chem.* 290, 4086–4096.
- 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.
- 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 Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 60, 2533–2545.
- 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.
- Rieusset, J., Fauconnier, J., Paillard, M., et al., 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.
- 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 Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* 280, 1763–1766.
- 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.
- Rorsman, P., Ashcroft, F.M., 2018. Pancreatic  $\beta$ -cell electrical activity and insulin secretion: of mice and Men. *Physiol. Rev.* 98, 117–214.
- 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.
- Rutter, G.A., Tsuboi, T., Ravier, M.A., 2006. Ca<sup>2+</sup> microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* 40, 539–551.
- Rutter, G.A., Pullen, T.J., Hodson, D.J., Martinez-Sanchez, A., 2015. Pancreatic  $\beta$ -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochem. J.* 466, 203–218.
- Sabatini, P.V., Speckman, T., Lynn, F.C., 2019. Friend and foe:  $\beta$ -cell Ca<sup>2+</sup> signaling and the development of diabetes. *Mol. Metab.* 21, 1–12.
- Satrústegui, J., Pardo, B., Del Arco, A., 2007. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* 87, 29–67.
- Schäuble, N., Lang, S., Jung, M., et al., 2012. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. *EMBO J.* 31, 3282–3296.



- 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.
- Schultz, J., Waterstradt, R., Kantowski, T., Rickmann, A., Reinhardt, F., Sharoyko, V., et al., 2016. Precise expression of *Fis1* is important for glucose responsiveness of beta cells. *J. Endocrinol.* 230, 81–91.
- Shioda, N., Ishikawa, K., Tagashira, H., Ishizuka, T., Yawo, H., Fukunaga, K., 2012. Expression of a truncated form of the endoplasmic reticulum chaperone protein,  $\sigma 1$  receptor, promotes mitochondrial energy depletion and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 23318–23331.
- Shoshan-Barmatz, V., De, S., Meir, A., 2017. The mitochondrial voltage-dependent Anion Channel 1,  $\text{Ca}^{2+}$  transport, apoptosis, and their regulation. *Front. Oncol.* 7, 60.
- Siddle, K., 2011. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J. Mol. Endocrinol.* 47, R1–10.
- Simmen, T., Tagaya, M., 2017. Organelle communication at membrane contact sites (MCS): from curiosity to center stage in cell biology and biomedical research. *Adv. Exp. Med. Biol.* 997, 1–12.
- Tagaya, M., Arasaki, K., 2017. Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. *Adv. Exp. Med. Biol.* 997, 33–47.
- Takeuchi, A., Kim, B., Matsuoka, S., 2015. The destiny of  $\text{Ca}^{2+}$  released by mitochondria. *J. Physiol. Sci. JPS* 65, 11–24.
- Tarasov, A.I., Semplici, F., Ravier, M.A., et al., 2012. The mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells. *PLoS One* 7, e39722.
- Tarasov, A.I., Semplici, F., Li, D., Rizzuto, R., Ravier, M.A., Gilon, P., Rutter, G.A., 2013. Frequency-dependent mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation regulates ATP synthesis in pancreatic  $\beta$  cells. *Pflugers Arch.* 465, 543–554.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Vance, J.E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 7248–7256.
- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A.D., et al., 2012. PERK is required at the ER–mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 19, 1880–1891.
- Vig, S., Lambooj, J.M., Zaldumbide, A., Guigas, B., 2021. Endoplasmic reticulum–mitochondria crosstalk and beta-cell destruction in type 1 diabetes. *Front. Immunol.* 12, 1–12.

- Walter, P., Ron, D., 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Wang, J.-Z., Dehesh, K., 2018. ER: the Silk Road of interorganellar communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* 45, 171–177.
- Wang, W.-A., Groenendyk, J., Michalak, M., 2012. Calreticulin signaling in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 842–846.
- 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.
- Weir, G.C., 2020. Glucotlipotocity, beta-cells, and diabetes: the emperor has no clothes. *Diabetes* 69, 273–276.
- 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.
- 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.
- Wright, J., Birk, J., Haataja, L., Liu, M., Ramming, T., Weiss, M.A., Appenzeller-Herzog, C., Arvan, P., 2013. Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1 $\alpha$  (Ero1 $\alpha$ ) improves folding and secretion of mutant proinsulin and limits mutant proinsulin-induced endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 288, 31010–31018.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., Yu, T., 2011. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 439–457.
- Youle, R.J., Narendra, D.P., 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14.
- 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.

## **Etude par RMN de l'influence d'un régime obésogène sur le métabolisme et l'accumulation lipidique dans différents organes chez la souris.**

En première année de thèse au laboratoire CarMeN, j'ai pris part à une étude rassemblant des personnes du CRMN ainsi que du laboratoire d'accueil. J'ai participé à l'exploitation des résultats de RMN, ainsi qu'à l'élaboration et la mise en forme des résultats.

L'objectif de cette étude sur le modèle murin était de comprendre les altérations du métabolisme dans 6 différents tissus (le poumon, le foie, le cœur, les muscles squelettiques, les reins et le cerveau) ainsi que dans le sérum de souris soumises à un régime obésogène. Une des questions principales concernait l'effet de l'obésité sur les modifications de l'homéostasie métabolique intratissulaires.

Dans cet article, nous avons soumis des souris males C57Bl/6J à un régime standard (SD) ou un régime enrichi en lipides et en sucres (HFHSD) durant 14 semaines. La masse, la glycémie, la tolérance au glucose et à l'insuline ainsi que la masse des différents organes collectés ont été comparés en condition SD et HFHSD. Nous avons ainsi confirmé l'état d'obésité des souris après 14 semaines de régime. L'utilisation de la RMN nous a permis de mesurer la concentration de 44 métabolites dans les organes et de 32 métabolites dans le sérum ainsi que leur abondance relative en lipides confirmée par une mesure biochimique des triglycérides. Tous les organes étudiés présentaient des altérations métaboliques. La voie du métabolisme un carbone (1C) apparaît comme une voie altérée dans la majorité des organes étudiés lors de l'obésité, notamment le cycle de l'acide folique mitochondrial. Le foie et les poumons sont les seuls organes étudiés présentant une accumulation de lipides dans la condition HFHSD. Les altérations métaboliques de ces organes indiquent que l'accumulation de lipides peut être liée à l'altération du métabolisme 1C.

En conclusion, ces résultats mettent en avant l'influence d'un régime obésogène sur les altérations métaboliques de différents organes impliquées dans l'accumulation de lipides au sein des poumons et du foie.

# Dietary obesity in mice is associated with lipid deposition and metabolic shifts in the lungs sharing features with the liver

*Gilles Rautureau #<sup>1</sup>, Béatrice Morio #<sup>2,3</sup>, Sylvie Guibert <sup>1</sup>, Camille Lefevre <sup>2,3</sup>, Johan Perrier <sup>2,3</sup>, Anaïs Alves <sup>2,3</sup>, Marie-Agnès Chauvin <sup>2,3</sup>, Claudie Pinteur <sup>2,3</sup>, Marie-Ambre Monet <sup>2,3</sup>, Murielle Godet <sup>2,3</sup>, Anne-Marie Madec <sup>2,3</sup>, Jennifer Rieusset <sup>2,3</sup>, Anne Mey <sup>2,3</sup>, Baptiste Panthu <sup>2,3,4</sup>*

1. Univ Lyon, Centre de Résonance Magnétique Nucléaire à Très Hauts Champs (CRMN FRE 2034 CNRS, UCBL, ENS Lyon), 69100, Villeurbanne, France.
2. Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69921, Oullins Cedex, France.
3. Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine, Hôpital Lyon Sud, 69921, Oullins Cedex, France.
4. INSERM U.1060-CARMEN, Hôpital Lyon Sud Secteur 2, Bâtiment CENS ELI-2D, 165 Chemin du grand Revoyet, 69310, Pierre-Bénite, France. [baptiste.panthu@univ-lyon1.fr](mailto:baptiste.panthu@univ-lyon1.fr).

# Contributed equally.

## Corresponding Author

Pr. Gilles Rautureau

CRMN - Very High Field NMR Center, Centre de RMN à très hauts champs de Lyon

FRE2034 CNRS / UCBL / Ecole Normale Supérieure de Lyon

5 rue de la Doua

165 Chemin du grand Revoyet

F – 69100 VILLEURBANNE

Postale : F – 69100 Villeurbanne CEDEX

Web: <https://www.crmn-lyon.fr/>

E-mail: [bassot@ualberta.ca](mailto:bassot@ualberta.ca)



OPEN

# Dietary obesity in mice is associated with lipid deposition and metabolic shifts in the lungs sharing features with the liver

G. J. P. Rautureau<sup>1,5</sup>, B. Morio<sup>2,3,5</sup>, S. Guibert<sup>1</sup>, C. Lefevre<sup>2,3</sup>, J. Perrier<sup>2,3</sup>, A. Alves<sup>2,3</sup>, M. A. Chauvin<sup>2,3</sup>, C. Pinteur<sup>2,3</sup>, M. A. Monet<sup>2,3</sup>, M. Godet<sup>2,3</sup>, A. M. Madec<sup>2,3</sup>, J. Rieusset<sup>1,2,3</sup>, A. Mey<sup>2,3,6</sup> & Baptiste Panthu<sup>1,2,3,4,6</sup>✉

Obesity is associated with both chronic and acute respiratory illnesses, such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or increased susceptibility to infectious diseases. Anatomical but also systemic and local metabolic alterations are proposed contributors to the pathophysiology of lung diseases in the context of obesity. To bring perspective to this discussion, we used NMR to compare the obesity-associated metabolomic profiles of the lung with those of the liver, heart, skeletal muscles, kidneys, brain and serum from male C57Bl/6J mice fed with a high-fat and high-sucrose (HFHSD) diet vs. standard (SD) chow for 14 weeks. Our results showed that the lung was the second most affected organ after the liver, and that the two organs shared reduced one-carbon (1C) metabolism and increased lipid accumulation. Altered 1C metabolism was found in all organs and in the serum, but serine levels were increased only in the lung of HFHSD compared to SD. Lastly, tricarboxylic acid (TCA)-derived metabolites were specifically and oppositely regulated in the serum and kidneys but not in other organs. Collectively, our data highlighted that HFHSD induced specific metabolic changes in all organs, the lung being the second most affected organ, the main alterations affecting metabolite concentrations of the 1C pathway and, to a minor extend, TCA. The absolute metabolite quantification performed in this study reveals some metabolic specificities affecting both the liver and the lung, that may reveal common metabolic determinants to the ongoing pathological process.

## Abbreviations

1C	One-carbon
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DMG	Dimethylglycine
GTT	Glucose tolerance tests
HFHSD	High-fat and high-sucrose diet
ITT	Insulin tolerance test
NMR	Nuclear magnetic resonance
SD	Standard diet
SEM	Standard error of the mean
TCA	Tricarboxylic acid
TG	Triglycerides

<sup>1</sup>Univ Lyon, Centre de Résonance Magnétique Nucléaire à Très Hauts Champs (CRMN FRE 2034 CNRS, UCBL, ENS Lyon), 69100 Villeurbanne, France. <sup>2</sup>Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69921 Oullins Cedex, France. <sup>3</sup>Hospices Civils de Lyon, Faculté de Médecine, Hôpital Lyon Sud, 69921 Oullins Cedex, France. <sup>4</sup>INSERM U.1060-CARMEN, Hôpital Lyon Sud Secteur 2, Bâtiment CENS ELI-2D, 165 Chemin du grand Revoyet, 69310 Pierre-Bénite, France. <sup>5</sup>These authors contributed equally: G. J. P. Rautureau and B. Morio. <sup>6</sup>These authors jointly supervised this work: A. Mey and Baptiste Panthu. ✉email: baptiste.panthu@univ-lyon1.fr

	Ctrl ( $\pm$ SD)	HFHSD ( $\pm$ SD)	p-value	% variation
Animal weight (g)	27.48 ( $\pm$ 1.90)	45.23 ( $\pm$ 2.0)	****	65%
Glycaemia (mg/dL)	130.0 ( $\pm$ 13.6)	177.5 ( $\pm$ 23.4)	****	36%
GTT (AUC)	15,383 ( $\pm$ 2,768)	29,506 ( $\pm$ 5,020)	****	92%
ITT (AOC)	2,028 ( $\pm$ 365)	1,251 ( $\pm$ 762)	**	- 38%
Liver weight (mg)	1,378 ( $\pm$ 83)	2,166 ( $\pm$ 456)	****	57%
Lung weight (mg)	281 ( $\pm$ 20)	278 ( $\pm$ 20)	ns	1%

**Table 1.** Physiological parameters of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Data are mean of  $n = 12$  mice per group for total weight, glycaemia, GTT and ITT (glucose and insulin resistance test respectively) and  $n = 8$  mice per group for liver and lung weight; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-significant (ns),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

Obesity has reached epidemic proportions worldwide and affects the metabolism of all organs, impacting therefore whole-body homeostasis. As a consequence, obesity increases the risk of important chronic pathologies such as type 2 diabetes and cardiovascular diseases<sup>1</sup>. Whereas the liver, skeletal muscle, adipose tissue and the heart are classically studied in the context of obesity, others required more attention, such as the lung. Indeed, epidemiological studies have long shown that obesity is associated with both chronic and acute respiratory complications such as asthma, infectious diseases or chronic obstructive pulmonary disease (COPD)<sup>2–6</sup>. Therefore, the increased prevalence of obesity and the concomitant lung diseases has raised the need for a precise examination of obesity-induced alterations in lung metabolism<sup>7</sup>. This topic has gained outstanding relevance with the Covid-19 (SARS-CoV-2) pandemic and its severe pulmonary complications that particularly affect obese patients<sup>8</sup>.

The association between obesity and lung illnesses has long been discussed as the mechanical consequence of obesity on lung physiology and the systemic inflammation induced by dysfunctional adipose tissue<sup>9</sup>. Recent studies evidenced general and lung-localized metabolic alterations that may contribute to the pathophysiology of lung diseases in obesity. Notably, alterations of the lipid metabolism and the secretion of cytokines, or changes of the arginine metabolism leading to nitric oxide synthesis, have been proposed<sup>2–4,10–12</sup>. At the cellular level, impaired mitochondrial metabolism has also been observed<sup>13,14</sup>, and stressed mitochondria have been reported in the airway epithelial cells of high-fat and high-fructose fed mice<sup>15</sup>.

To further explore and characterize the array of specific alterations in lung metabolism induced by obesity, we used proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to analyze the metabolic profile induced in mice by an obesogenic diet, and we compared the metabolomes of lung to that of serum and five other tissues (liver, heart, skeletal muscle, kidneys and brain). Our NMR study enabled the quantification of 44 metabolites in organs and 32 metabolites in serum. It evidenced that the lung is one of the most metabolically affected organs, sharing specificities with the liver, and revealed unexpected organ-specific alterations of the one-carbon (1C) and tricarboxylic acid (TCA) pathways.

## Results

**HFHSD-induced obesity in mice.** Metabolomic studies were performed in male C57Bl/6J mice fed either with a standard diet (SD) or a high-fat and high sucrose diet (HFHSD) for 14 weeks, a classical nutritional model of obesity<sup>16</sup>. As expected, HFHSD mice gained 65% more weight than SD animals ( $p < 0.0001$ ,  $n = 12$  per group) with a 57% increase of the weight of the liver ( $p < 0.0001$ ) but not of the lung (Table 1). HFHSD mice showed significant hyperglycemia compared to SD mice ( $p < 0.0001$ , Table 1). As shown on Supplementary Fig. 1, glucose tolerance test (GTT) evidenced glucose intolerance with a 92% higher area under the curve of the glycemic response in HFHSD-fed mice compared to SD mice ( $p < 0.0001$ , Table 1,  $n = 12$  per group). In agreement, insulin tolerance test (ITT) highlighted systemic insulin resistance, with a 38% lower area over the curve of the glycemic response in HFHSD-fed animals compared to controls ( $p < 0.01$ , Table 1,  $n = 12$  per group). Altogether, these results confirm that the 14-weeks HFHSD diet induced significant alterations in body composition and systemic glucose homeostasis in mice, in favor with a progression towards type 2 diabetes<sup>17</sup>.

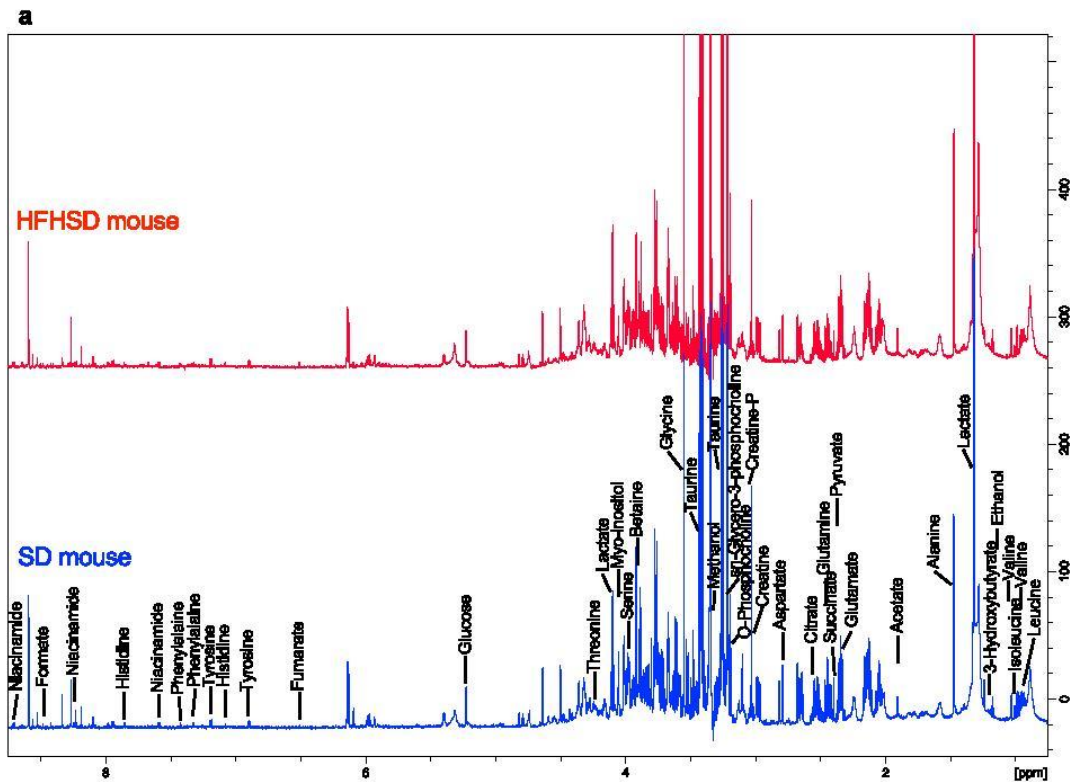
**NMR determination of organ and serum metabolic profiles.** We analyzed the metabolome of the lung by NMR spectroscopy and compared it with the metabolome of serum and five other organs (liver, heart, skeletal muscle, kidneys and brain) in both SD and HFHSD mice ( $n = 8$  per group). This approach allowed the absolute quantification of several metabolites, allowing an inter-organ comparison of HFHSD-induced metabolic alterations. All serum and organ extracts delivered interpretable NMR spectra that displayed sharp peaks typical of small molecules, overlaid with broad signals originating mostly from lipids in organ extracts, or lipids plus proteins in serum. The careful analysis of the <sup>1</sup>H 1D and the two-dimensional <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H and <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C NMR led to the identification and quantification of 44 metabolites in organs and 32 metabolites in serum. The relative lipid content could be also evaluated<sup>18</sup> and results were confirmed by triglyceride (TG) biochemical quantification (see below).

**Obesity-associated metabolic signature of the lung.** Among the 44 metabolites identified in all organs, 32 metabolites have been quantified in lung extracts (Table 2,  $n = 8$  per group). NMR analysis of the lung showed that

	Lung (in nmol/100 mg)			
	Ctrl ( $\pm$ SD)	HFHSD ( $\pm$ SD)	p-value	% variation
2-Hydroxybutyrate	ND	ND		
3-Hydroxybutyrate	3.2 ( $\pm$ 2.5)	3.5 ( $\pm$ 1.8)	ns	8%
4-Aminobutyrate	ND	ND		
Acetate	7.7 ( $\pm$ 1.5)	7.8 ( $\pm$ 1.0)	ns	0%
Acetone	ND	ND		
Alanine	105.7 ( $\pm$ 12.0)	122.7 ( $\pm$ 18.2)	ns	16%
Aspartate	120.7 ( $\pm$ 23.8)	142.0 ( $\pm$ 27.0)	ns	18%
Betaine	47.0 ( $\pm$ 13.2)	16.1 ( $\pm$ 5.9)	****	- 66%
Carnosine	ND	ND		
Choline	25.0 ( $\pm$ 12.0)	24.1 ( $\pm$ 4.1)	ns	- 3%
Citrate	40.0 ( $\pm$ 5.7)	47.2 ( $\pm$ 9.9)	ns	18%
Creatine	46.0 ( $\pm$ 11.7)	45.9 ( $\pm$ 14.2)	ns	0%
Creatine-P	9.1 ( $\pm$ 3.4)	14.0 ( $\pm$ 3.2)	ns	54%
Dimethylglycine	ND	ND		
Ethanol	14.3 ( $\pm$ 3.2)	264.1 ( $\pm$ 509.8)	ns	1750%
Formate	2.5 ( $\pm$ 0.6)	3.3 ( $\pm$ 0.8)	ns	34%
Fumarate	1.5 ( $\pm$ 0.5)	1.5 ( $\pm$ 0.4)	ns	3%
Glucose	230.6 ( $\pm$ 44.0)	266.0 ( $\pm$ 91.4)	ns	15%
Glucose-1-P	ND	ND		
Glucose-6-P	ND	ND		
Glutamate	227.6 ( $\pm$ 19.9)	257.7 ( $\pm$ 49.5)	ns	13%
Glutamine	121.9 ( $\pm$ 16.7)	150.2 ( $\pm$ 28.0)	*	23%
Glutathione	ND	ND		
Glycine	391.5 ( $\pm$ 48.5)	359.8 ( $\pm$ 56.3)	ns	- 8%
Histidine	4.8 ( $\pm$ 1.0)	5.0 ( $\pm$ 1.0)	ns	3%
Isoleucine	6.0 ( $\pm$ 0.7)	6.3 ( $\pm$ 0.6)	ns	5%
Lactate	445.5 ( $\pm$ 65.4)	463.2 ( $\pm$ 115.7)	ns	4%
Leucine	11.6 ( $\pm$ 1.4)	10.6 ( $\pm$ 1.5)	ns	- 9%
Malonate	ND	ND		
Mannose	ND	ND		
myo-Inositol	94.8 ( $\pm$ 10.4)	68.6 ( $\pm$ 8.5)	***	- 28%
Niacinamide	14.1 ( $\pm$ 2.7)	12.2 ( $\pm$ 2.1)	ns	- 14%
O-Phosphocholine	76.7 ( $\pm$ 5.7)	62.9 ( $\pm$ 11.4)	*	- 18%
Pantothenate	ND	ND		
Phenylalanine	5.3 ( $\pm$ 0.6)	4.3 ( $\pm$ 0.7)	*	- 18%
Pyruvate	3.2 ( $\pm$ 1.2)	2.8 ( $\pm$ 1.0)	ns	- 12%
Sarcosine	ND	ND		
Serine	26.2 ( $\pm$ 6.6)	36.3 ( $\pm$ 5.2)	**	39%
sn-Glycero-3-phosphocholine	172.3 ( $\pm$ 24.9)	228.1 ( $\pm$ 34.0)	**	32%
Succinate	7.3 ( $\pm$ 2.2)	7.3 ( $\pm$ 1.8)	ns	1%
Taurine	1127.5 ( $\pm$ 108.3)	1335.4 ( $\pm$ 192.1)	*	18%
Threonine	30.5 ( $\pm$ 13.7)	27.5 ( $\pm$ 6.1)	ns	- 10%
Tyrosine	6.7 ( $\pm$ 1.6)	6.0 ( $\pm$ 0.8)	ns	- 11%
Valine	12.6 ( $\pm$ 2.0)	15.0 ( $\pm$ 2.0)	*	19%

**Table 2.** Metabolite concentrations measured by NMR in the lung of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of lung. Data are mean of  $n = 8$  mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

HFHSD induced significant changes in 9 metabolites compared to SD mice (Fig. 1). Betaine (trimethylglycine) concentration decreased by 66%, from  $47 \pm 13.2$  nmol/100 mg of tissue to  $16.1 \pm 5.9$  nmol/100 mg ( $p < 0.0001$ ) while serine was increased by 38%, from  $26.2 \pm 6.6$  nmol/100 mg to  $36.3 \pm 5.2$  nmol/100 mg ( $p < 0.01$ ). Sn-glycero-3-phosphocholine, glutamine, valine and taurine increased by 32% ( $p < 0.01$ ), 23% ( $p < 0.05$ ), 19% ( $p < 0.05$ ), 18% ( $p < 0.05$ ) respectively, while myo-inositol, phenylalanine and o-phosphocholine were decreased by 28%

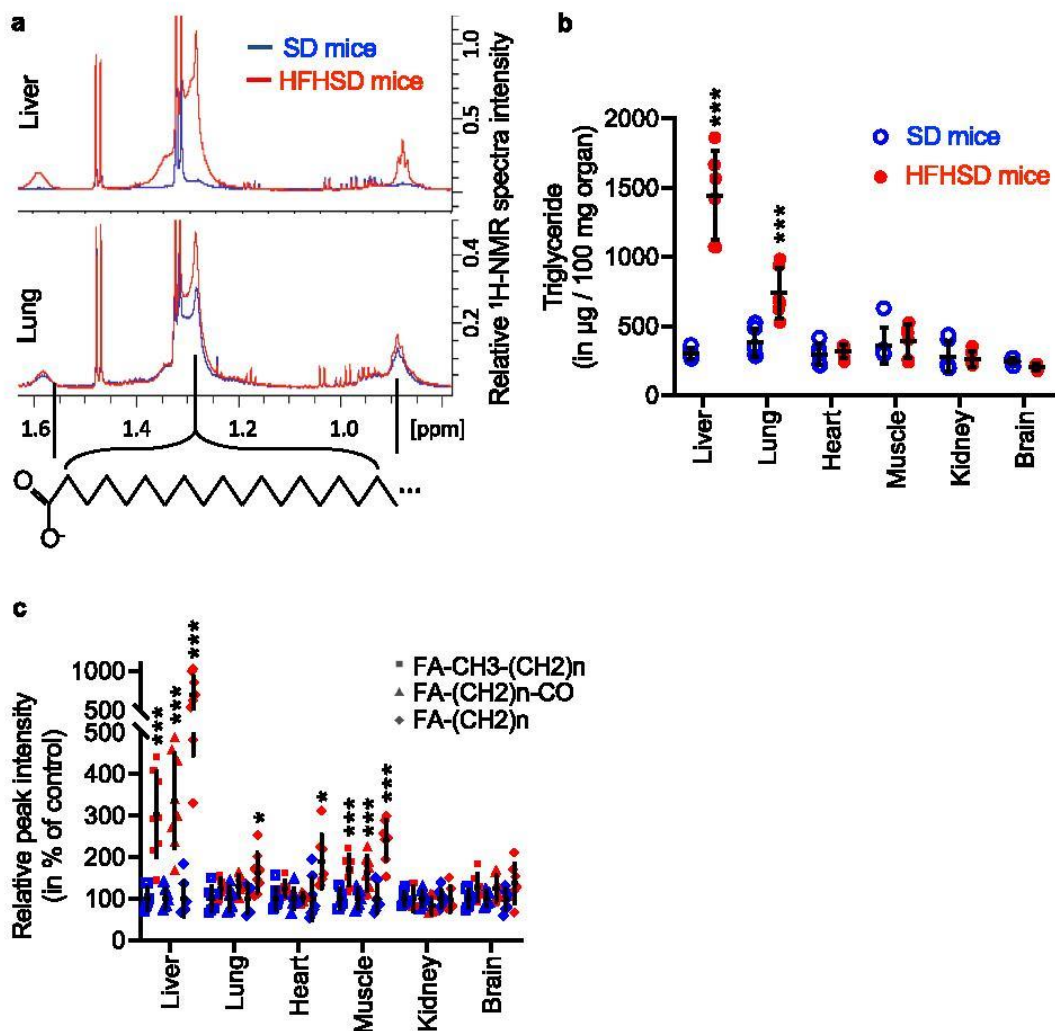


	Ctrl ( $\pm$ SD)	HFHSD ( $\pm$ SD)	p-value	% variation
<b>Serine</b>	26.2 ( $\pm$ 6.6)	36.3 ( $\pm$ 5.2)	**	39%
<b>sn-Glycero-3-phosphocholine</b>	172.3 ( $\pm$ 24.9)	228.1 ( $\pm$ 34.0)	**	32%
<b>Glutamine</b>	121.9 ( $\pm$ 16.7)	150.2 ( $\pm$ 28.0)	*	23%
<b>Valine</b>	12.6 ( $\pm$ 2.0)	15.0 ( $\pm$ 2.0)	*	19%
<b>Taurine</b>	1127.5 ( $\pm$ 108.3)	1335.4 ( $\pm$ 192.1)	*	18%
<b>O-Phosphocholine</b>	76.7 ( $\pm$ 5.7)	62.9 ( $\pm$ 11.4)	*	-18%
<b>Phenylalanine</b>	5.3 ( $\pm$ 0.6)	4.3 ( $\pm$ 0.7)	*	-18%
<b>myo-Inositol</b>	94.8 ( $\pm$ 10.4)	68.6 ( $\pm$ 8.5)	***	-28%
<b>Betaine</b>	47.0 ( $\pm$ 13.2)	16.1 ( $\pm$ 5.9)	****	-66%

**Figure 1.** Metabolite modifications identified by NMR in the lung of HFHSD mice. (a)  $^1\text{H}$ -NMR representative spectra from lung from SD (blue) and HFHSD (red) fed mice. (b) List of metabolites differentially found in the lung of HFHSD mice compared to SD mice. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of lung. Data are mean of  $n=8$  mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and SD fed mice are indicated. All metabolites quantified including non-significant variation are reported in Table 2.

( $p < 0.001$ ), 18% ( $p < 0.05$ ) and 18% ( $p < 0.05$ ) respectively, in HFHSD lung compared to SD lung (Fig. 1b). Interestingly, we noted the presence of broad peaks on lung NMR spectra, that could be assigned to the CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>-CO moieties of heterogeneous lipid species<sup>18</sup>. Their peak area was illustrated and quantified in Fig. 2 (panel a and b, respectively). To confirm these results, we decided to measure biochemically TG levels in the lung of SD and HFHSD mice (Fig. 2c). TG levels were 94% higher in lungs of HFHSD-fed animals compared to SD controls, averaging  $736 \pm 181$   $\mu\text{g}/100$  mg and  $380 \pm 101$   $\mu\text{g}/100$  mg respectively ( $p < 0.001$ ), confirming lipid accumulation in the lung of HFHSD mice.





**Figure 2.** Lipids and specifically triglycerides accumulation in the lung in comparison with the liver or all other organs of SD and HFHSD mice. (a)  $^1\text{H-NMR}$  representative spectra from the lung (at bottom) and the liver (at top) from SD (blue) and HFHSD (red) fed mice. Spectra zoom highlights fatty acid (FA) areas of  $-\text{CH}_2-\text{CO}$  (1.6 ppm),  $(\text{CH}_2)_n$  (1.3 ppm) and  $\text{CH}_2-\text{CH}_3$  moieties (0.9 ppm). (b) Relative abundance of each typical lipid moieties  $-\text{CH}_2-\text{CO}$  (triangle),  $(\text{CH}_2)_n$  (diamond) and  $\text{CH}_2-\text{CH}_3$  (square) of SD (blue empty) or HFHSD (red full) fed mice estimated by integration of the  $^1\text{H-NMR}$  spectra. Data are mean of  $n = 8$  mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-significant (NS),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). (c) Triglyceride contents in liver, lungs, heart, gastrocnemius muscles, kidneys and brain. Data are mean of  $n = 8$  mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). (The quantification is also reported in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of total protein in Supplementary Fig. 2).

**Obesity-associated metabolic signatures in serum and other organs.** NMR analyses of serum showed that glucose concentration increased by 31% in HFHSD mice compared to SD mice, varying from  $3.82 \pm 1.16$  to  $5.01 \pm 0.55$  mM ( $p < 0.02$ , Table 3,  $n = 8$  per group), in agreement with the glycemia measurement using a glucometer (Table 1). NMR analyses also evidenced lower serum concentrations for allantoin, creatine and phenylalanine, and higher concentrations for alanine and 3-hydroxybutyrate in HFHSD-fed mice compared to controls ( $p < 0.05$ , Table 3). Citrate and succinate concentrations, two TCA-derived metabolites, were 28% and 32% higher in the serum of HFHSD-fed mice compared to controls, respectively ( $p < 0.02$ ). Inversely, glycine, dimethylglycine (DMG) and betaine that derive from the 1C cycle metabolism were 34%, 68% and 54% lower in the serum of HFHSD-fed mice compared to controls, respectively ( $p < 0.01$ ). No significant alteration of branched-chain amino acid concentrations was observed in serum (Table 3).

	Serum metabolite (in microM)			
	Ctrl (± SD)	HFHSD (± SD)	p-value	% variation
3-Hydroxybutyrate	47.7 (± 9.9)	82.4 (± 24.9)	**	73%
Acetate	223.9 (± 64.4)	206.3 (± 30.8)	ns	− 8%
Alanine	156.8 (± 32.6)	218.0 (± 50.2)	*	39%
Allantoin	35.7 (± 8.2)	26.2 (± 8.1)	*	− 27%
Asparagine	22.0 (± 4.9)	25.4 (± 7.1)	ns	15%
Betaine	53.6 (± 8.3)	24.6 (± 10.7)	****	− 54%
Citrate	169.3 (± 19.7)	216.2 (± 17.5)	***	28%
Creatine	69.7 (± 7.7)	55.5 (± 8.9)	**	− 20%
Dimethylglycine	4.6 (± 0.6)	1.5 (± 0.3)	****	− 68%
Ethanol	308.4 (± 34.4)	266.7 (± 40.2)	*	− 14%
Formate	722.8 (± 257.6)	559.9 (± 56.1)	ns	− 23%
Fumarate	4.3 (± 1.3)	2.6 (± 0.7)	**	− 40%
Glucose	3816.8 (± 555.4)	5013.1 (± 1165.0)	*	31%
Glutamine	278.6 (± 26.0)	303.7 (± 40.2)	ns	9%
Glycine	147.3 (± 16.5)	97.5 (± 31.2)	**	− 34%
Histidine	38.1 (± 4.7)	36.2 (± 7.3)	ns	− 5%
Isobutyrate	5.6 (± 1.4)	5.8 (± 1.7)	ns	4%
Isoleucine	34.5 (± 8.9)	45.4 (± 13.4)	ns	32%
Lactate	2563.4 (± 504.8)	2336.6 (± 707.9)	ns	− 9%
Leucine	105.4 (± 16.8)	89.0 (± 19.5)	ns	− 16%
Lysine	139.5 (± 19.7)	135.5 (± 36.5)	ns	− 3%
Mannose	19.9 (± 7.5)	30.3 (± 12.1)	ns	52%
Methanol	120.9 (± 32.6)	149.1 (± 18.2)	ns	23%
Methionine	51.9 (± 9.5)	51.7 (± 8.7)	ns	0%
myo-Inositol	38.1 (± 3.6)	19.8 (± 4.1)	****	− 48%
Phenylalanine	33.5 (± 3.4)	27.1 (± 5.6)	*	− 19%
Pyruvate	62.9 (± 18.4)	65.4 (± 17.9)	ns	4%
Serine	86.8 (± 10.3)	84.1 (± 13.0)	ns	− 3%
Succinate	26.5 (± 8.1)	34.9 (± 2.7)	*	32%
Threonine	119.3 (± 17.5)	117.4 (± 14.8)	ns	− 2%
Tyrosine	70.5 (± 11.3)	64.0 (± 13.4)	ns	− 9%
Valine	119.1 (± 12.1)	139.2 (± 27.8)	ns	17%

**Table 3.** Metabolite concentrations measured by NMR in the serum of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) and are in micromolar in serum. Data are mean of n = 8 mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS), p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), p < 0.001 (\*\*\*) and p < 0.0001 (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

The HFHSD had a significant influence and displayed tissue-specific profiles. Among the 44 quantified metabolites, 16, 8, 8 and 7 were significantly altered in the liver, heart, gastrocnemius muscle and kidneys, respectively. Interestingly, the less impacted organ was the brain which displayed only 2 altered metabolites following HFHSD (Tables 4, 5, 6, 7, 8, n = 8 per group).

All the organs studied harbored one or several unique metabolite alterations which could constitute potential biomarker candidates of the organ physiology adaptation to diet. Indeed, pantothenate was 34% lower (p < 0.05) in the brain (Table 8); citrate and acetone were 66% (p < 0.01) and 28% (p < 0.05) respectively lower in kidney (Table 7); Glucose-1-p, pyruvate and carnosine were 49% (p < 0.05), 42% (p < 0.01) and 25% (p < 0.01) respectively lower in gastrocnemius muscle (Table 6); Ethanol and isoleucine increase were 114% (p < 0.01) and 27% (p < 0.05) while niacinamide decrease was 31% (p < 0.001) altogether only in heart (Table 5). Lastly, liver showed the most unique metabolite alterations with a notable concentration increase by 3,499% of 2-hydroxybutyrate from 4.8 ± 1.5 nmol/100 mg of tissue to 172.4 ± 61.4 nmol/100 mg (p < 0.0001). 3-hydroxybutyrate and glutamate were increased by 57% (p < 0.05) and 43% (p < 0.05) respectively while sarcosine, threonine, leucine and tyrosine were decreased by 60% (p < 0.01), 34% (p < 0.01), 28% (p < 0.01) and 26% (p < 0.01) respectively (Table 4).

Some metabolite alterations are shared between two or more organs. For example, the HFHSD induced a significant rise of glucose concentration by 28%, 61% and 51% in the liver, heart and kidneys, respectively (p < 0.05, Tables 4, 5 and 7), but not in gastrocnemius muscle. Glucose was not detected in the brain, probably because of its rapid consumption before methanol metabolism quenching (Table 8). Interestingly, the levels of the TCA cycle-derived metabolites, such as citrate, succinate and fumarate, were not significantly altered in organs of HFHSD-fed animals compared to controls, except in kidneys where the citrate concentration was 61% lower

	Liver (in nmol/100 mg)			
	Ctrl (±SD)	HFHSD (±SD)	p-value	% variation
2-Hydroxybutyrate	4.8 (±1.5)	172.4 (±61.4)	****	3499%
3-Hydroxybutyrate	14.4 (±2.1)	22.7 (±9.2)	*	57%
4-Aminobutyrate	ND	ND		
Acetate	40.8 (±14.1)	36.0 (±10.1)	ns	-12%
Acetone	ND	ND		
Alanine	423.6 (±112.0)	373.8 (±87.7)	ns	-12%
Aspartate	28.8 (±6.5)	25.4 (±5.5)	ns	-12%
Betaine	364.4 (±129.6)	26.4 (±14.3)	****	-93%
Carnosine	ND	ND		
Choline	10.9 (±3.6)	10.6 (±2.5)	ns	-3%
Citrate	50.0 (±8.3)	54.4 (±11.2)	ns	9%
Creatine	24.0 (±4.2)	15.3 (±3.0)	***	-36%
Creatine-P	ND	ND		
Dimethylglycine	16.5 (±4.7)	2.6 (±0.6)	****	-84%
Ethanol	38.5 (±30.1)	26.7 (±26.0)	ns	-31%
Formate	3.2 (±2.0)	3.5 (±1.0)	ns	12%
Fumarate	4.1 (±1.3)	4.9 (±1.2)	ns	19%
Glucose	3221.2 (±579.8)	4131.7 (±758.9)	*	28%
Glucose-1-P	ND	ND		
Glucose-6-P	ND	ND		
Glutamate	129.8 (±34.7)	185.7 (±46.4)	*	43%
Glutamine	363.8 (±105.9)	471.0 (±90.5)	*	29%
Glutathione	788.9 (±166.5)	733.9 (±211.9)	ns	-7%
Glycine	226.6 (±62.9)	141.3 (±25.3)	**	-38%
Histidine	35.7 (±7.6)	30.5 (±6.8)	ns	-14%
Isoleucine	20.3 (±5.8)	16.6 (±3.0)	ns	-18%
Lactate	1249.0 (±232.7)	1099.7 (±219.3)	ns	-12%
Leucine	38.0 (±7.9)	27.4 (±4.1)	**	-28%
Malonate	ND	ND		
Mannose	21.8 (±8.1)	23.2 (±5.6)	ns	6%
myo-Inositol	34.1 (±6.6)	11.1 (±0.9)	**	-67%
Niacinamide	16.1 (±6.0)	17.0 (±3.5)	ns	6%
O-Phosphocholine	98.5 (±18.7)	78.3 (±20.9)	ns	-21%
Pantothenate	ND	ND		
Phenylalanine	11.2 (±2.5)	8.4 (±1.5)	*	-25%
Pyruvate	6.4 (±3.2)	8.1 (±3.0)	ns	27%
Sarcosine	14.4 (±5.2)	5.8 (±2.8)	**	-60%
Serine	ND	ND		
sn-Glycero-3-phosphocholine	73.2 (±20.9)	61.8 (±14.9)	ns	-16%
Succinate	150.5 (±53.7)	135.5 (±30.7)	ns	-10%
Taurine	699.6 (±404.3)	2009.2 (±388.0)	****	187%
Threonine	47.4 (±14.1)	31.2 (±5.7)	**	-34%
Tyrosine	9.6 (±1.8)	7.1 (±1.4)	**	-26%
Valine	34.1 (±8.5)	27.7 (±4.4)	ns	-19%

**Table 4.** Metabolite concentrations measured by NMR in the liver of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of liver. Data are mean of n = 8 mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS), p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), p < 0.001 (\*\*\*) and p < 0.0001 (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

(p < 0.01) (Table 7). Based on our results in lung and serum of HFHSD mice, we focused our analysis on the 1C pathway, with an emphasis on the methionine and folate cycles to highlight the central role of glycine and its N-methylated analogs that are shared by both cycles (Fig. 3). The liver evidenced the strongest decrease in the methionine cycle with 38% lower concentrations in glycine, 60% in sarcosine, 84% in DMG and 93% in betaine in HFHSD-fed mice compared to controls (p < 0.003, Table 4). Similarly, in gastrocnemius muscle, both glycine

	Heart (in nmol/100 mg)			
	Ctrl (±SD)	HFHSD (±SD)	p-value	% variation
2-Hydroxybutyrate	ND	ND		
3-Hydroxybutyrate	6.9 (±1.8)	7.6 (±2.7)	ns	11%
4-Aminobutyrate	ND	ND		
Acetate	6.7 (±1.2)	6.0 (±1.4)	ns	-11%
Acetone	ND	ND		
Alanine	264.3 (±35.8)	363.2 (±65.8)	**	37%
Aspartate	116.1 (±21.9)	116.1 (±22.9)	ns	0%
Betaine	ND	ND		
Carnosine	ND	ND		
Choline	10.6 (±2.3)	8.7 (±1.9)	ns	-17%
Citrate	18.5 (±7.3)	21.2 (±4.5)	ns	15%
Creatine	1166.1 (±185.1)	946.8 (±132.4)	*	-19%
Creatine-P	ND	ND		
Dimethylglycine	ND	ND		
Formate	8.4 (±2.7)	18.0 (±5.9)	**	114%
Fumarate	5.0 (±1.3)	3.9 (±1.2)	ns	-22%
Ethanol	6.7 (±2.0)	5.7 (±1.1)	ns	-14%
Glucose	38.3 (±15.9)	61.8 (±15.6)	*	61%
Glucose-1-P	ND	ND		
Glucose-6-P	ND	ND		
Glutamate	503.1 (±103.4)	519.7 (±57.6)	ns	3%
Glutamine	616.8 (±161.1)	531.7 (±81.1)	ns	-14%
Glutathione	67.7 (±20.9)	48.9 (±13.8)	ns	-28%
Glycine	60.4 (±9.2)	57.9 (±21.7)	ns	-4%
Histidine	19.5 (±2.8)	18.7 (±2.8)	ns	-4%
Isoleucine	7.1 (±1.7)	9.0 (±1.3)	*	27%
Lactate	1847.7 (±455.5)	1717.2 (±347.0)	ns	-7%
Leucine	15.3 (±1.7)	14.2 (±2.3)	ns	-7%
Malonate	23.2 (±5.1)	19.5 (±2.3)	ns	-16%
Mannose	ND	ND		
Niacinamide	29.4 (±9.8)	22.4 (±7.6)	ns	-24%
O-Phosphocholine	28.0 (±4.0)	19.2 (±2.7)	***	-31%
myo-Inositol	25.4 (±7.1)	21.4 (±2.6)	ns	-16%
Pantothenate	4.4 (±0.9)	4.0 (±0.7)	ns	-8%
Phenylalanine	8.5 (±0.9)	6.9 (±1.2)	**	-19%
Pyruvate	5.0 (±1.1)	5.7 (±1.7)	ns	14%
Sarcosine	ND	ND		
Serine	46.0 (±11.4)	38.3 (±8.1)	ns	-17%
sn-Glycero-3-phosphocholine	27.6 (±2.8)	24.4 (±3.7)	ns	-12%
Succinate	183.0 (±52.3)	208.6 (±35.1)	ns	14%
Taurine	4058.7 (±844.1)	3563.8 (±466.6)	ns	-12%
Threonine	43.4 (±11.2)	51.6 (±15.7)	ns	19%
Tyrosine	9.4 (±1.4)	8.5 (±1.2)	ns	-10%
Valine	12.8 (±1.5)	17.2 (±2.5)	**	34%

**Table 5.** Metabolite concentrations measured by NMR in the heart of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of heart. Data are mean of n = 8 mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS), p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), p < 0.001 (\*\*\*) and p < 0.0001 (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

and DMG concentrations were 30% and 50% lower in HFHSD-fed mice compared to controls, respectively (p < 0.002, Table 6). In kidneys, betaine was 50% lower in HFHSD-fed mice compared to controls (p < 0.0003, Table 7), as observed above in the lung. Globally, all these observations evidenced important variations in the IC pathway in several tissues of HFHSD-fed mice.

	Muscle (in nmol/100 mg)			
	Ctrl (± SD)	HFHSD (± SD)	p-value	% variation
2-Hydroxybutyrate	ND	ND		
3-Hydroxybutyrate	7.9 (± 1.9)	9.5 (± 4.3)	ns	19%
4-Aminobutyrate	ND	ND		
Acetate	13.0 (± 2.5)	13.5 (± 3.8)	ns	4%
Acetone	ND	ND		
Alanine	466.3 (± 75.9)	601.2 (± 121.1)	*	29%
Aspartate	28.8 (± 11.7)	20.8 (± 6.5)	ns	− 28%
Betaine	ND	ND		
Carnosine	548.2 (± 52.7)	411.2 (± 93.7)	**	− 25%
Choline	ND	ND		
Citrate	25.8 (± 5.2)	26.3 (± 9.1)	ns	2%
Creatine	3797.6 (± 575.0)	4027.7 (± 614.1)	ns	6%
Creatine-P	331.9 (± 181.6)	309.9 (± 169.1)	ns	− 7%
Dimethylglycine	1.2 (± 0.4)	0.6 (± 0.1)	**	− 50%
Ethanol	88.8 (± 37.2)	121.6 (± 45.4)	ns	37%
Formate	4.4 (± 2.0)	5.9 (± 2.0)	ns	33%
Fumarate	2.8 (± 1.4)	2.8 (± 1.3)	ns	3%
Glucose	279.6 (± 87.6)	209.7 (± 82.5)	ns	− 25%
Glucose-1-P	43.6 (± 24.6)	22.2 (± 6.1)	*	− 49%
Glucose-6-P	339.3 (± 131.4)	225.8 (± 48.5)	ns	− 33%
Glutamate	85.5 (± 22.1)	75.6 (± 17.0)	ns	− 12%
Glutamine	309.0 (± 44.1)	298.1 (± 39.2)	ns	− 4%
Glutathione	121.3 (± 24.4)	97.0 (± 30.3)	ns	− 20%
Glycine	425.8 (± 59.2)	299.3 (± 64.7)	**	− 30%
Histidine	17.1 (± 3.9)	17.0 (± 3.5)	ns	− 1%
Isoleucine	14.7 (± 3.3)	16.9 (± 4.5)	ns	15%
Lactate	5105.2 (± 1923.0)	4418.1 (± 908.0)	ns	− 13%
Leucine	27.2 (± 5.6)	25.2 (± 6.7)	ns	− 7%
Malonate	73.9 (± 11.9)	74.0 (± 13.6)	ns	0%
Mannose	71.5 (± 32.4)	51.2 (± 15.0)	ns	− 28%
myo-Inositol	27.6 (± 6.4)	18.4 (± 6.4)	*	− 33%
Niacinamide	9.9 (± 2.7)	9.6 (± 2.8)	ns	− 4%
O-Phosphocholine	ND	ND		
Pantothenate	ND	ND		
Phenylalanine	15.1 (± 2.6)	13.9 (± 3.0)	ns	− 8%
Pyruvate	5.4 (± 1.3)	3.2 (± 1.6)	**	− 42%
Sarcosine	23.8 (± 5.5)	25.7 (± 3.9)	ns	8%
Serine	61.7 (± 15.9)	78.1 (± 21.3)	ns	27%
sn-Glycero-3-phosphocholine	ND	ND		
Succinate	121.5 (± 27.6)	124.5 (± 23.1)	ns	2%
Taurine	6922.4 (± 1688.5)	7818.7 (± 1281.3)	ns	13%
Threonine	124.0 (± 36.9)	107.8 (± 35.1)	ns	− 13%
Tyrosine	19.4 (± 3.3)	19.6 (± 4.5)	ns	1%
Valine	30.7 (± 7.4)	41.2 (± 8.2)	*	34%

**Table 6.** Metabolite concentrations measured by NMR in the gastrocnemius muscle of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of gastrocnemius muscle. Data are mean of n = 8 mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS), p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), p < 0.001 (\*\*\*) and p < 0.0001 (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

As observed for the lung, we noted the presence of broad peaks on NMR spectra of some tissues (Fig. 2a,b), that could be assigned to the CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>-CO moieties of heterogeneous lipid species. We also quantified the TG levels in all organs. As showed on Fig. 2c, TG levels were 378% higher in the liver of HFHSD mice compared to SD mice, but unaltered in the other organs. The difference between NMR and triglycerides quantification in the skeletal muscles, and to a lesser extent in the heart, may indicate the accumulation of free fatty acids in these organs, which can be detected by NMR only, a phenomenon already observed with high-fat diets<sup>19</sup>.

	Kidney (in nmol/100 mg)			
	Ctrl (±SD)	HFHSD (±SD)	p-value	% variation
2-Hydroxybutyrate	ND	ND		
3-Hydroxybutyrate	16.2 (±4.0)	21.2 (±6.7)	ns	31%
4-Aminobutyrate	ND	ND		
Acetate	14.1 (±3.4)	16.1 (±5.2)	ns	14%
Acetone	4.9 (±1.0)	3.5 (±1.1)	*	- 28%
Alanine	165.0 (±33.5)	241.3 (±54.6)	**	46%
Aspartate	307.6 (±72.2)	346.5 (±101.5)	ns	13%
Betaine	282.8 (±66.9)	141.8 (±21.0)	***	- 50%
Carnosine	ND	ND		
Choline	190.4 (±93.7)	214.2 (±108.8)	ns	12%
Citrate	15.3 (±6.7)	5.3 (±2.1)	**	- 66%
Creatine	152.9 (±38.5)	136.9 (±34.0)	ns	- 10%
Creatine-P	ND	ND		
Dimethylglycine	ND	ND		
Ethanol	35.8 (±12.1)	277.8 (±436.5)	ns	676%
Formate	5.3 (±0.9)	6.4 (±1.3)	ns	21%
Fumarate	7.1 (±4.0)	8.6 (±2.4)	ns	20%
Glucose	473.6 (±130.0)	714.7 (±209.3)	*	51%
Glucose-1-P	ND	ND		
Glucose-6-P	ND	ND		
Glutamate	1329.5 (±323.6)	1368.0 (±267.3)	ns	3%
Glutamine	208.6 (±43.4)	231.2 (±39.0)	ns	11%
Glutathione	ND	ND		
Glycine	843.1 (±235.5)	782.1 (±149.1)	ns	- 7%
Histidine	21.8 (±4.7)	20.0 (±4.3)	ns	- 8%
Isoleucine	22.1 (±3.3)	26.3 (±5.0)	ns	19%
Lactate	1236.3 (±278.8)	1374.2 (±286.1)	ns	11%
Leucine	47.1 (±10.6)	45.8 (±11.0)	ns	- 3%
Malonate	ND	ND		
Mannose	6.5 (±2.5)	4.1 (±2.8)	ns	- 38%
myo-Inositol	1337.3 (±259.1)	1208.7 (±232.1)	ns	- 10%
Niacinamide	25.8 (±11.6)	26.5 (±7.8)	ns	3%
O-Phosphocholine	313.5 (±52.7)	204.2 (±42.6)	**	- 35%
Pantothenate	3.4 (±1.0)	3.7 (±0.8)	ns	7%
Phenylalanine	16.7 (±3.2)	16.0 (±4.7)	ns	- 4%
Pyruvate	11.6 (±7.1)	7.5 (±1.9)	ns	- 35%
Sarcosine	ND	ND		
Serine	69.1 (±9.9)	71.8 (±21.5)	ns	4%
sn-Glycero-3-phosphocholine	1233.4 (±291.3)	1605.3 (±213.4)	*	30%
Succinate	182.0 (±55.5)	216.0 (±55.1)	ns	19%
Taurine	2485.9 (±448.1)	2790.3 (±419.1)	ns	12%
Threonine	69.4 (±14.5)	70.5 (±12.5)	ns	2%
Tyrosine	19.1 (±5.8)	21.1 (±6.0)	ns	10%
Valine	38.7 (±9.1)	47.5 (±12.3)	ns	23%

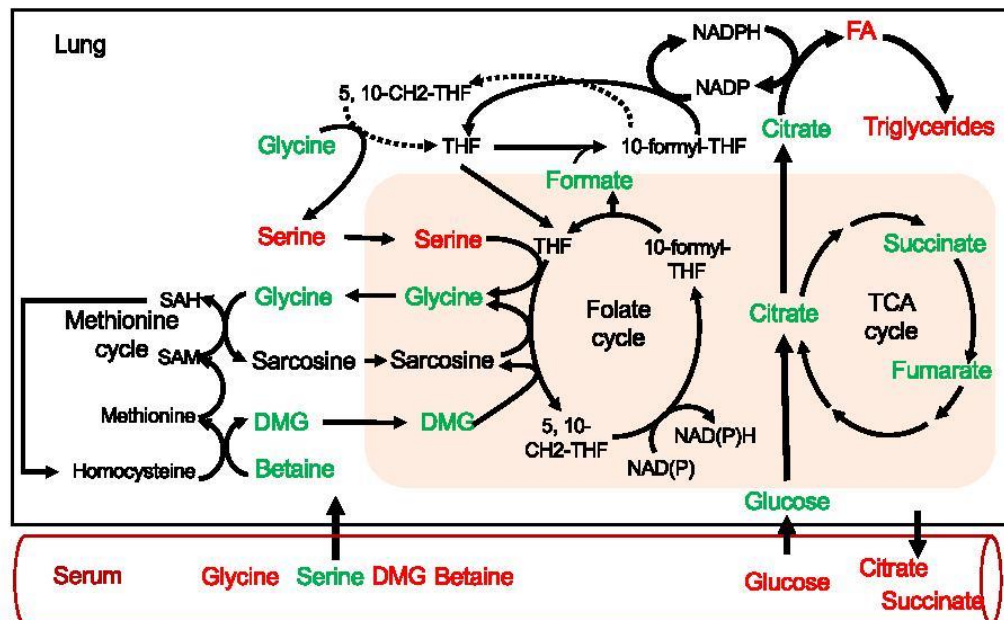
**Table 7.** Metabolite concentrations measured by NMR in the kidney of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of kidney. Data are mean of n = 8 mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS), p < 0.05 (\*), p < 0.01 (\*\*), p < 0.001 (\*\*\*) and p < 0.0001 (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

*Main comparison between metabolomes of lung, serum and other organs.* Obesity-associated metabolome of the lung displayed specific metabolic alterations that are not found in serum and other organs, such as an increase by 36% (p < 0.01) in serine levels (Fig. 1b and Table 2). It should be noted that serine could not be determined in liver samples due to peak overlap with unidentified peaks on the NMR spectra. We therefore cannot exclude that this modification may be shared with the liver.

	Brain (in nmol/100 mg)			
	Ctrl ( $\pm$ SD)	HFHSD ( $\pm$ SD)	p-value	% variation
2-Hydroxybutyrate	ND	ND		
3-Hydroxybutyrate	5.7 ( $\pm$ 1.6)	7.3 ( $\pm$ 3.8)	ns	29%
4-Aminobutyrate	559.5 ( $\pm$ 110.9)	506.2 ( $\pm$ 172.8)	ns	- 10%
Acetate	19.7 ( $\pm$ 3.2)	19.0 ( $\pm$ 4.1)	ns	- 4%
Acetone	ND	ND		
Alanine	104.2 ( $\pm$ 20.9)	124.8 ( $\pm$ 63.7)	ns	20%
Aspartate	281.5 ( $\pm$ 82.2)	260.0 ( $\pm$ 71.6)	ns	- 8%
Betaine	ND	ND		
Carnosine	17.7 ( $\pm$ 10.0)	12.7 ( $\pm$ 8.3)	ns	- 28%
Choline	35.7 ( $\pm$ 7.4)	29.5 ( $\pm$ 5.5)	ns	- 17%
Citrate	25.6 ( $\pm$ 6.7)	35.9 ( $\pm$ 17.3)	ns	40%
Creatine	1195.9 ( $\pm$ 294.8)	974.2 ( $\pm$ 225.5)	ns	- 19%
Creatine-P	ND	ND		
Dimethylglycine	0.6 ( $\pm$ 0.2)	0.9 ( $\pm$ 0.4)	ns	47%
Ethanol	12.5 ( $\pm$ 2.9)	314.3 ( $\pm$ 507.3)	ns	2420%
Formate	5.4 ( $\pm$ 0.9)	6.5 ( $\pm$ 1.4)	ns	19%
Fumarate	2.4 ( $\pm$ 1.0)	2.8 ( $\pm$ 0.7)	ns	17%
Glucose	ND	ND		
Glucose-1-P	ND	ND		
Glucose-6-P	ND	ND		
Glutamate	1610.2 ( $\pm$ 269.5)	1364.5 ( $\pm$ 212.4)	ns	- 15%
Glutamine	782.3 ( $\pm$ 240.6)	609.4 ( $\pm$ 123.3)	ns	- 22%
Glutathione	79.1 ( $\pm$ 28.4)	93.2 ( $\pm$ 96.5)	ns	18%
Glycine	158.1 ( $\pm$ 74.9)	146.5 ( $\pm$ 25.9)	ns	- 7%
Histidine	8.0 ( $\pm$ 1.8)	8.0 ( $\pm$ 5.4)	ns	0%
Isoleucine	4.5 ( $\pm$ 1.3)	6.6 ( $\pm$ 3.0)	ns	47%
Lactate	1618.1 ( $\pm$ 255.2)	1699.1 ( $\pm$ 221.6)	ns	5%
Leucine	10.8 ( $\pm$ 1.5)	11.7 ( $\pm$ 3.6)	ns	9%
Malonate	22.8 ( $\pm$ 7.9)	20.9 ( $\pm$ 4.8)	ns	- 8%
Mannose	ND	ND		
myo-Inositol	868.7 ( $\pm$ 186.7)	746.2 ( $\pm$ 190.6)	ns	- 14%
Niacinamide	8.1 ( $\pm$ 2.3)	7.5 ( $\pm$ 1.2)	ns	- 8%
O-Phosphocholine	101.7 ( $\pm$ 16.4)	89.5 ( $\pm$ 13.6)	ns	- 12%
Pantothenate	4.3 ( $\pm$ 1.4)	2.8 ( $\pm$ 0.9)	*	- 34%
Phenylalanine	7.4 ( $\pm$ 1.4)	6.6 ( $\pm$ 1.4)	ns	- 10%
Pyruvate	10.9 ( $\pm$ 6.1)	13.5 ( $\pm$ 4.8)	ns	24%
Sarcosine	ND	ND		
Serine	112.4 ( $\pm$ 19.7)	119.8 ( $\pm$ 31.0)	ns	7%
sn-Glycero-3-phosphocholine	176.0 ( $\pm$ 41.3)	163.1 ( $\pm$ 34.5)	ns	- 7%
Succinate	103.7 ( $\pm$ 29.6)	95.7 ( $\pm$ 19.9)	ns	- 8%
Taurine	1729.2 ( $\pm$ 374.3)	1642.9 ( $\pm$ 395.2)	ns	- 5%
Threonine	50.6 ( $\pm$ 10.0)	48.5 ( $\pm$ 15.6)	ns	- 4%
Tyrosine	8.8 ( $\pm$ 1.5)	7.6 ( $\pm$ 1.3)	ns	- 13%
Valine	10.0 ( $\pm$ 2.0)	15.3 ( $\pm$ 4.7)	*	53%

**Table 8.** Metabolite concentrations measured by NMR in the brain of SD and HFHSD mice. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and are in nmol/100 mg of brain. Data are mean of  $n = 8$  mice per group; Results of unpaired two-tailed t-test are indicated as non-determined (ND), non-significant (NS),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Percentages of variation between HFHSD and control fed mice are indicated.

Yet, some metabolic signatures of the lung were shared with other organs. For example, a reduction in phenylalanine was found in the lung, serum and liver of HFHSD mice, whereas betaine was significantly decreased in the lung, serum, liver and kidney (Tables 2, 3, 4, 7). In agreement, other metabolites of the 1C pathway, such as glycine and DMG, were reduced in HFHSD mice in serum, liver and skeletal muscle (Tables 3, 4, 6), while



**Figure 3.** The accumulation of lipids is linked to alterations in the 1C cycle but not to the TCA pathway derived metabolites in the lung of HFHSD mice. Schematic diagram of 1C (methionine plus folate cycles) and TCA cycles, their subcellular compartmentations (mitochondrion in pink) and their potential link with de novo lipogenesis<sup>30,31</sup>. HFHSD causes significant modifications in 1C-derived metabolites in the lung and serum, and a significant modification in TCA-derived metabolites only in serum. Modified metabolites are represented in red, unmodified in green and non-detected in black. 1C-derived metabolites were also altered in other organ and specifically in the liver but were not represented here.

sarcosine was specifically decreased in the liver of HFHSD compared to SD (Table 4). Altogether, these data point a strong reduction of 1C metabolism with obesity.

While the liver remained the most altered organ in HFHSD, it shared with the lung several metabolic features such as decreases in betaine, myo-inositol, o-phosphocholine and phenylalanine and increases in glutamine and taurine (Tables 2, 4). In addition, both tissues shared an accumulation of TG that was not found in other organs (Fig. 2). Finally, TCA metabolism showed organ-specific alterations in HFHSD mice. TCA cycle-derived metabolites were not impacted in the majority of organs including the lung but citrate and succinate concentrations were higher in the serum and citrate was reduced in kidneys of HFHSD mice compared to SD.

### Discussion

Obesity is associated with numerous organ dysfunctions, particularly in the lung with increased sensitivity to both chronic and acute illnesses<sup>1–9,20–24</sup>. To get insights into the contribution of cell metabolism alterations to lung fragility, we used NMR to compare the metabolic changes induced by obesity in the lung in comparison to serum and five organs (liver, heart, skeletal muscle, kidneys and brain). Our results demonstrate mainly that the lung displays both specific and shared metabolic changes following HFHSD, compared to serum and/or organs. The obesity-associated metabolic signature of the lung is nearest to the liver rather than other organs, sharing reduction in 1C metabolism and induction of lipid accumulation. Opposite, TCA-derived metabolites are not regulated in the lung and the majority of organs of HFHSD mice, whereas some of them are increased in serum (citrate and succinate) and reduced in kidneys (succinate). Altogether, our data point that obesity (i) mainly affects 1C metabolism in both serum and organs, including the lung, (ii) specifically regulates TCA metabolism in serum and kidney and (iii) specifically increases serine levels in the lung of HFHSD mice.

One important observation of our study is that HFHSD-fed mice presented serum- and organ-specific metabolomics adaptations. Care should be taken as some metabolic adaptations in organs may not only be a consequence of the diet. Indeed, obesity per se, rather than overnutrition, can induce organ-specific metabolic adaptations. This question was raised by Mora-Ortiz et al. who examined *db/db* mice organs<sup>25</sup>, a natural genetic model of obesity and also reported a decrease of 1C related metabolite in many organs (a glycine decrease in kidneys and distal colon; a homoserine decrease in liver and plasma; a serine decrease in brain, kidney and spleen). Unfortunately, they did not include lung in their study.

One striking observation is that HFHSD-feeding dampened 1C metabolism in all tested samples and specifically increased serine in the lung of HFHSD mice, whereas the TCA-derived metabolites were loosely regulated in several tissues, including the liver and the lung. In the liver, the importance of 1C cycle alterations with diet-induced obesity is supported by another multi-omics analyses<sup>26</sup>, whereas alterations in gene expression and



metabolite abundances of TCA cycle were found in the liver of 27-week HFHSD-fed mice (60% [w/w] fat, 9.4% [w/w] sucrose)<sup>27</sup>. Interestingly, both IC and TCA pathways could be interrelated and influence each other. Indeed, it is well accepted that under obesogenic conditions, the TCA-cycle is increased and produces citrate that provides carbon atoms for de novo fatty acid (FA) synthesis in the cytosol<sup>28</sup>. This anabolic pathway requires NADPH, which can be produced from different sources, such as the pentose phosphate pathway<sup>29</sup>. Recent studies suggest that the IC pathway, and in particular serine, contributes in cytosolic NADPH production, as mutations that blocked mitochondrial folate metabolism resulted in fatty acid labeling from deuterated serine<sup>30–32</sup>. Therefore, although TCA-derived metabolites were not significantly modified by HFHSD in the lung, the increase in serine levels could sign an increase in de novo lipogenesis contributing to the accumulation of lipids observed in this organ. In agreement, increased serine levels was previously reported in the liver of diabetic rats which also have increased lipogenesis<sup>33</sup>. At the same time, we did not find clear modulation of the TCA-derived metabolites in the liver of HFHSD mice. Liver is known to highly respond to HFHSD and perform de novo lipogenesis<sup>34</sup>, that is fueled from TCA metabolites<sup>28</sup>. Therefore, our results suggest that metabolic fingerprints by NMR may not be able to detect modifications of de novo lipogenesis or TCA cycles. Those are rather detected in serum of HFHSD mice that reflects an homeostatic mechanism to regulate intracellular metabolite levels by secretion or exchange with biofluids (interstitial fluid, serum, urine)<sup>35</sup>. On the opposite, the concentration of metabolites derived from the IC cycle was decreased in serum and in most organs, except in the heart and brain, indicating that the IC pathway is highly sensitive and adaptable to the physiological environment and represent a relevant research perspective in the understanding of organ-specific metabolic alterations induced by obesity.

Lipid content is increased both in the liver and lung of the HFHSD mice, but not in the other organs considered in this study. Lipid accumulation in the liver is well documented, contrary to the lung. In the liver, lipid accumulation arises from both exogenous lipid storage and de novo lipogenesis using carbons derived from carbohydrates<sup>34</sup>. During a high-fat diet, exogenous fatty acids inhibit de novo lipogenesis and are mainly responsible for steatosis<sup>36,37</sup>. Accumulation of fatty acids in the lung is less understood. Lipid-targeted metabolomics studies by mass spectrometry showed significant quantitative and qualitative differences in neutral lipids, fatty acids, phospholipids and sphingolipids content in lung between HFHSD and very high fat diets<sup>4</sup>, while no lipid accumulation occurred in the lung with SD<sup>38</sup>. As in the liver, the lipid accumulation in the lung correlated with alterations in the levels of many metabolites, with almost 30% of the quantified metabolites affected. Nevertheless, the patterns of metabolic alterations in the lung and liver were distinct. Other lipidomics signature using coupled gas chromatography- mass spectrometry analyses have been reported in the lung following different obesogenic diets, which are dependent of the type of diets<sup>4</sup>, confirming lipotoxicity in the lung with obesity. As the lipotoxicity contributes to dysfunction and pathological states in organs, such as the hepatic lipid accumulation participates to nonalcoholic fatty liver diseases, an involvement of the lung lipid storage is possibly involved in obesity-associated complications such as asthma and COPD, or increased susceptibility to infectious diseases such as seasonal flu or SARS-CoV-2.

In conclusion, our results provide insights on the influence of HFHSD on mice's internal organ metabolism, especially and unexpectedly on the lung metabolism. Our analysis suggests that the TG deposition in the lungs, as in the liver but not in other organs, may be related to adaptations of the IC metabolism. Mitochondrial metabolism may be central to the obesity-induced metabolic remodeling and its cellular outcomes.

## Methods

The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines<sup>39</sup>. Mice were maintained and all experiments were performed in accordance the French guidelines for the care and use of animals<sup>40</sup> and were approved by a regional ethic committee agreed by the French Ministry for Education and Research and set up by the agreed institution PBES (Ecole Normale Supérieure de Lyon) (APAFIS#4103-2016010417246403).

**Animal study.** Male C57BL/6J mice (5-weeks-old, n = 12/group) (Envigo, France) were fed with a standard diet (SD, Rhod16A, GENOBIOS) or a high fat-high sucrose diet (HFHSD, 36% w/w fat, 16.6% w/w sucrose, Envigo, France) ad libitum for 14 weeks. Body weight was monitored weekly. Glucose and insulin tolerance tests (GTT and ITT respectively) were performed the last week of feeding on all mice and were performed with a delay of 4 days (meaning that GTT was performed at the beginning of the 13th week and ITT at the end of the week. For GTT and ITT, mice were fasted for 6 or 16 h respectively. Then, glucose (2 mg/g body weight) or insulin (0.75 mU/g body weight) were injected i.p. and blood glucose levels were monitored at the indicated time points. At the end of the feeding protocol, mice at fed state were anesthetized with isoflurane for retro-orbital blood functions and sacrificed by cervical dislocation for removing organs. Blood samples were kept on wet ice for a maximum of 1 h before being centrifuged at 5000g for 10 min in a 4 °C refrigerated centrifuge for serum removal. Aliquots of serum were stored at – 80 °C. Lungs, heart, gastrocnemius muscles, kidneys, brains were harvested, weighed, divided, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C.

**Biochemical metabolite measurement.** For ITT and GTT, glycemia was monitored every 15 min for 90 and 60 min respectively using an Accu-Chek (Roche, France) glucose meter. Organ triglyceride content was determined on total lysate of tissues according to the manufacturer's instruction (Biolabo 87319).

**Metabolite extraction and sample preparation for NMR analyses.** Metabolites were extracted using 100% methanol and a Precellys Homogeniser according to the manufacturer's instructions. Full kidneys or 100 mg of all other frozen organs were put in 1 mL for muscles or 500 µL for other organs of 100% methanol and rapidly broken using Precellys homogenizer with ceramic beads (6 per tubes) and 6600 RPM twice 10 s with 10 s pause program at room temperature. The program was repeated again for muscles. The total lysate was put

into 5 mL glass tubes and the Precellys tubes rinsed with 500  $\mu$ L of 100% methanol. The glass tubes were hermetically closed and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The extracts were dried under a gentle  $\text{N}_2$  flow until complete evaporation (approximately 10–12 h), then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until NMR sample preparation, right before analysis. 800  $\mu$ L of  $\text{D}_2\text{O}$  phosphate buffer prepared as described in Ref.<sup>41</sup> were used to dissolve the dried lysate residues by vortexing for 30 s. Extracts were then transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and centrifuged at 13,000 rpm for 1 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . 550  $\mu$ L of supernatant were transferred to 5 mm NMR tubes. 100  $\mu$ L of serum were diluted with 100  $\mu$ L of  $\text{D}_2\text{O}$  phosphate buffer and directly transferred to 3 mm NMR tubes. Organ triglyceride content was determined on total lysate according to the manufacturer's instructions (Biolabo 87319).

**NMR data acquisition and processing.** All organ extracts and serum NMR spectra were obtained on a Bruker Avance III spectrometer operating at a  $^1\text{H}$  frequency of 800.14 MHz, equipped with a 5 mm TXI probe. The serum samples were measured on a Bruker 600 MHz NMR spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryo-probe. All spectra were acquired at  $303^{\circ}\text{K}$ . The NMR samples were maintained at  $4^{\circ}\text{C}$  before data acquisition and handled by a Bruker SampleJet high-throughput sample changer. Standard NOESY and CPMG with water presaturation  $^1\text{H}$  1D NMR spectra were acquired on each sample, with 128 scans (512 for serum) and a spectral width of 20 ppm. For both sequences, the relaxation delay was set to 4 s. 2D NMR experiments ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC and J-Resolved) were recorded with standard parameters<sup>41</sup> on a subset of samples to achieve peaks assignment of the metabolites signal. All free induction decays (FIDs) were multiplied by an exponential function leading to a 0.3 Hz line-broadening factor before Fourier transform.  $^1\text{H}$ -NMR spectra were manually phased and referenced to the 5.230 glucose doublet using Topspin 3.6 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany).

**NMR spectra analyses.** The identification of the metabolites was carried out from the  $^1\text{H}$  1D NMR data using the software ChenomX NMR Suite 8.0 (ChenomX Inc., Edmonton, Canada) and confirmed from analysis of 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC and J-Resolved NMR spectra. Metabolite concentrations were determined from the  $^1\text{H}$  1D NOESY experiments using ChenomX software. A pure lactate solution (1 g/L, Fisher) was used as a concentration reference and exploited using the ERETIC2 utility from TopSpin to add a digitally synthesized peak to a spectrum<sup>42</sup>. The relative abundance of NMR observed lipids massifs were determined by global spectral integration: (**CH3**-, 0.86–0.91 ppm; **-CH2**-, 1.25–1.30 ppm; **CH2-CH2-CO**, 1.55–1.62 ppm; **CH2-CO**, 2.22–2.26 ppm)<sup>18</sup>.

**Statistics.** All data were expressed as the mean  $\pm$  SD. Statistical comparisons were performed using Student's t-test.

#### Data availability

The data used in this study are available upon request. NMR spectra were deposited at the Metabolight database (<https://www.ebi.ac.uk/metabolights/MTBLS2521>).

Received: 7 January 2021; Accepted: 18 March 2021

Published online: 22 April 2021

#### References

- O'Neill, S. & O'Driscoll, L. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev.* **16**, 1–12 (2015).
- Baffi, C. W. *et al.* Metabolic syndrome and the lung. *Chest* **149**, 1525–1534 (2016).
- Dixon, A. E. & Suratt, B. T. Chair's summary: Obesity and associated changes in metabolism, implications for lung diseases. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **14**, S314–S315 (2017).
- Showalter, M. R. *et al.* Obesogenic diets alter metabolism in mice. *PLoS ONE* **13**, e0190632 (2018).
- Makker, H. Obesity and respiratory diseases. *Int. J. Gen. Med.* **53**, 335 (2010).
- Parameswaran, K., Todd, D. C. & Soth, M. Altered respiratory physiology in obesity. *Can. Respir. J.* **13**, 203–210 (2006).
- Milner, J. J. *et al.* Obesity increases mortality and modulates the lung metabolome during pandemic H1N1 influenza virus infection in mice. *J. Immunol.* **194**, 4846–4859 (2015).
- Sanchis-Gomar, F., Lavie, C. J., Mehra, M. R., Henry, B. M. & Lippi, G. Obesity and outcomes in COVID-19: When an epidemic and pandemic collide. *Mayo Clin. Proc.* **95**, 1445–1453 (2020).
- Mafort, T. T., Rufino, R., Costa, C. H. & Lopes, A. J. Obesity: Systemic and pulmonary complications, biochemical abnormalities, and impairment of lung function. *Multidiscip. Respir. Med.* **11**, 28 (2016).
- Plataki, M. *et al.* Fatty acid synthase downregulation contributes to acute lung injury in murine diet-induced obesity. *JCI Insight* **4** (2019).
- Singh, V. P. *et al.* Metabolic syndrome is associated with increased oxo-nitrate stress and asthma-like changes in lungs. *PLoS ONE* **10**, e0129850 (2015).
- Bornstein, S. R., Dalan, R., Hopkins, D., Mingrone, G. & Boehm, B. O. Endocrine and metabolic link to coronavirus infection. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 297–298 (2020).
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K. & Reddy, P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 1066–1077 (2017).
- Liu, G. & Summer, R. Cellular metabolism in lung health and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **81**, 403–428 (2019).
- Leishangthem, G. D. *et al.* Ultrastructural changes of airway in murine models of allergy and diet-induced metabolic syndrome. *ISRN Allergy* **2013**, 1–11 (2013).
- Bonnard, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Investig.* **118**, 789–800 (2008).
- Cornier, M.-A. *et al.* The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **29**, 777–822 (2008).
- Aru, V. *et al.* Quantification of lipoprotein profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **94**, 210–219 (2017).
- Pakiet, A. *et al.* The effect of a high-fat diet on the fatty acid composition in the hearts of mice. *Nutrients* **12**, 824 (2020).

20. Costa, F. F. *et al.* Metabolic syndrome and COVID-19: An update on the associated comorbidities and proposed therapies. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **14**, 809–814 (2020).
21. Marhl, M., Grubelnik, V., Magdić, M. & Markovič, R. Diabetes and metabolic syndrome as risk factors for COVID-19. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **14**, 671–677 (2020).
22. Apicella, M. *et al.* COVID-19 in people with diabetes: Understanding the reasons for worse outcomes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **8**, 782–792 (2020).
23. Angelidi, A. M., Belanger, M. J. & Mantzoros, C. S. Commentary: COVID-19 and diabetes mellitus: What we know, how our patients should be treated now, and what should happen next. *Metabolism* **107**, 154245 (2020).
24. The Lancet Diabetes & Endocrinology. COVID-19: Underlying metabolic health in the spotlight. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **8**, 457 (2020).
25. Mora-Ortiz, M., Nuñez Ramos, P., Oregioni, A. & Claus, S. P. NMR metabolomics identifies over 60 biomarkers associated with Type II Diabetes impairment in db/db mice. *Metabolomics* **15**, 89 (2019).
26. Rubio-Aliaga, I. *et al.* Alterations in hepatic one-carbon metabolism and related pathways following a high-fat dietary intervention. *Physiol. Genom.* **43**, 408–416 (2011).
27. Sundekilde, U. K. *et al.* An integrated multi-omics analysis defines key pathway alterations in a diet-induced obesity mouse model. *Metabolites* **10**, 80 (2020).
28. Satapati, S. *et al.* Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J. Lipid Res.* **53**, 1080–1092 (2012).
29. Ying, W. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: Regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 179–206 (2008).
30. Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D. One-carbon metabolism in health and disease. *Cell Metab.* **25**, 27–42 (2017).
31. Ducker, G. S. *et al.* Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway. *Cell Metab.* **23**, 1140–1153 (2016).
32. Lewis, C. A. *et al.* Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Mol. Cell* **55**, 253–263 (2014).
33. Chen, M. *et al.* Changes in hepatic metabolic profile during the evolution of STZ-induced diabetic rats via an 1H NMR-based metabolomic investigation. *Biosci. Rep.* **39**, 1–12 (2019).
34. Sanders, F. W. B. & De Griffin, J. L. *in vivo* lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev.* **91**, 452–468 (2016).
35. Hui, S. *et al.* Quantitative fluxomics of circulating metabolites. *Cell Metab.* **32**, 676–688.e4 (2020).
36. Sabine, J. R., McGrath, H. & Abraham, S. Dietary fat and the inhibition of hepatic lipogenesis in the mouse. *J. Nutr.* **98**, 312–318 (1969).
37. Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F. & Gastaldelli, A. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients* **7**, 9453–9474 (2015).
38. Yasuoka, S., Sakamoto, T., Takata, M., Ohori, I. & Tsubura, B. Triglyceride metabolism in the lung. *Tohoku J. Exp. Med.* **121**, 263–274 (1977).
39. Percie du Sert, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* **18**, e3000410 (2020).
40. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109–110 (1983).
41. Beckonert, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabolomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.* **2**, 2692–2703 (2007).
42. Jung, Y.-S., Hyeon, J.-S. & Hwang, G.-S. Software-assisted serum metabolite quantification using NMR. *Anal. Chim. Acta* **934**, 194–202 (2016).

### Acknowledgements

We thank Cyrielle Caussy for fruitful discussions. Financial support from the IR-RMN-THC Fr3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged. This research was funded by a Price of the Francophone Diabetes Society (SFD) (BP) and a "Projet Emergent" grant from the ENS de Lyon (GR).

### Author contributions

G.R., A.M. and B.P. contributed to the conception and design of the study. All authors contributed to the acquisition or analysis and interpretation of results. B.P., B.M., G.P., J.R. and A.M. wrote the manuscript. All authors contributed to revising the manuscript for important intellectual content and approved the final version of the manuscript. B.P. is the guarantor of the study 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.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88097-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.P.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

## **Etude par RMN d'îlots pancréatiques humains et de lignée murine lors de conditions pathologiques mimant le diabète de type 2**

Cette étude est le cœur de ma thèse. J'ai pris part à celle-ci en mettant au point et réalisant l'ensemble des expériences (à l'exception du réglage du spectromètre RMN et de l'acquisition des images MET). De plus j'ai mis en forme les données, interprété les résultats, rédigé l'introduction et assemblé les figures.

L'objectif principal de cette étude était de relier des altérations des consommations/sécrétions de métabolites au défaut fonctionnel des îlots pancréatiques humains et de la lignée  $\beta$  murine INS-1E lors de gluco- et/ou lipotoxicité. Ensuite, nous avons cherché à comprendre, en accord avec la littérature, quelles voies métaboliques et quelles enzymes étaient liées au défaut fonctionnel des îlots dans ces conditions. Nous avons aussi questionné la différence entre des îlots de donneurs sains et de donneurs diabétique de type 2. Finalement, le dernier objectif de cette étude était de renforcer et compléter les observations faites dans les îlots humains en utilisant la lignée de cellules  $\beta$  murine INS-1E.

Nous avons mis en avant un défaut de contenu et sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques humains en gluco- et glucolipotoxicité. L'étude métabolomique a mis en avant 2 métabolites : le pyruvate et le citrate significativement sursécrétés en gluco- et glucolipotoxicité. Les quantifications d'expression et de régulation de la PDH et OGDH, deux déshydrogénases mitochondriales respectivement impliquées dans l'utilisation du pyruvate et du citrate par la mitochondrie, montrent une tendance à la diminution de l'activité de la PDH et une diminution de la quantité d'OGDH. Ces conditions pourraient expliquer la fuite de carbones observée sous forme de pyruvate et de citrate. Indépendamment, ces carbones n'étant plus utilisés par la mitochondrie, permettrait d'expliquer le défaut de renouvellement d'ATP nécessaire à la synthèse et la sécrétion d'insuline. Il expliquerait, en partie, la perte de fonction de ce modèle en condition de gluco- et glucolipotoxicité. Nos études métabolomique mettent en avant des différences métaboliques entre les îlots pancréatiques humains de donneur sains et de donneurs diabétique de type 2, dont des sursécrétions de pyruvate et citrate dans les îlots de donneurs diabétiques. Le profil de sursécrétion de métabolites ainsi que l'altération de l'expression d'OGDH ont également été retrouvés dans la lignée de cellules  $\beta$  INS-1E. Toutefois, nous avons mis en évidence dans ces cellules, une utilisation du citrate dans la voie de la synthèse de triglycérides menant à une fuite similaire de carbones du cycle du citrate après la gluco- et la glucolipotoxicité.

En conclusion ces résultats mettent en avant un défaut fonctionnel du métabolisme mitochondrial dans les deux modèles au cours de la gluco- et la glucolipotoxicité. Ce défaut fonctionnel mène à une fuite mitochondriale de carbones sous forme de pyruvate et de citrate nécessaires à la synthèse et la sécrétion régulée d'insuline.

# Human pancreatic islets react to glucolipototoxicity by secreting pyruvate and citrate, evidencing mitochondrial metabolism alteration

*Johan Perrier<sup>1</sup>, Anne-Marie Madec<sup>1</sup>, Karim Chick<sup>2</sup>, Marie-Agnès Chauvin<sup>1</sup>, Christian Damblon<sup>3</sup>, Julia Sabatier<sup>4</sup>, Charles Thivolet<sup>1,2</sup>, Jennifer Rieusset<sup>1</sup>, Gilles JP Rautureau<sup>5</sup> and Baptiste Panthu<sup>1</sup>*

1. Univ Lyon, CarMeN laboratory, INSERM, INRA, Université Claude Bernard Lyon1, 69310 PIERRE-BENITE, France
2. Hospices Civils de Lyon, Department of Endocrinology and Diabetes, Hopital Lyon Sud, 69310, Pierre-Bénite, France
3. Université de Liège, Faculté des sciences, Unité de Recherche MolSys, Liège, Belgium
4. Laboratoire de Thérapie Cellulaire du Diabète (LTCD), Institut de Médecine Régénérative et Biothérapies, Hopital St Eloi, 34295 Montpellier, France
5. Centre de Résonance Magnétique Nucléaire à Très Hauts Champs, UMR 5082 CNRS, ENS Lyon, UCBL), Université de Lyon, 69100, Villeurbanne, France.

## Corresponding Author

Dr. Baptiste Panthu

CarMeN laboratory

FRE2034 CNRS / UCBL / Ecole Normale Supérieure de Lyon

Bâtiment CENS ELI-2D

165 Chemin du grand Revoyet

F – 69310 PIERRE BENITE

Postale : F – 69100 Villeurbanne CEDEX

Web: <http://carmen.univ-lyon1.fr/>

E-mail: [baptiste.panthu@univ-lyon1.fr](mailto:baptiste.panthu@univ-lyon1.fr)

**Human pancreatic islets react to glucolipotoxicity by secreting pyruvate and citrate, evidencing mitochondrial metabolism alteration**

**Authors**

Johan Perrier<sup>1</sup>, Anne-Marie Madec<sup>1</sup>, Karim Chick<sup>2</sup>, Marie-Agnès Chauvin<sup>1</sup>, Christian Damblon<sup>3</sup>, Julia Sabatier<sup>5</sup>, Charles Thivolet<sup>1,2</sup>, Jennifer Rieusset<sup>1</sup>, Gilles JP Rautureau<sup>4</sup> and Baptiste Panthu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ Lyon, CarMeN laboratory, INSERM, INRA, Université Claude Bernard Lyon1, 69310 PIERRE-BENITE, France

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

<sup>3</sup> Université de Liège, Faculté des sciences, Unité de Recherche MolSys, Liège, Belgium

<sup>4</sup> Centre de Résonance Magnétique Nucléaire à Très Hauts Champs, UMR 5082 CNRS, ENS Lyon, UCBL), Université de Lyon, 69100, Villeurbanne, France.

<sup>5</sup> Laboratoire de Thérapie Cellulaire du Diabète (LTCD), Institut de Médecine Régénérative et Biothérapies, Hopital St Eloi, 34295 Montpellier, France

ORCID iD:

Madec AM: 0000-0002-5072-8572

Rautureau GJP : 0000-0002-1064-0293

Rieusset J : 0000-0002-1587-2253

Panthu B : 0000-0001-9430-4061

\*Corresponding authors: Baptiste PANTHU

Address: INSERM U.1060-CARMEN, Hôpital Lyon Sud Secteur 2,

Bâtiment CENS ELI-2D

165 Chemin du grand Revoyet

69310 PIERRE BENITE

Phone number: +33 4 26 23 61 63, Fax: +33 4 26 23 59 16

E-mails: baptiste.panthu@univ-lyon1.fr

## Summary

Progressive decline of pancreatic beta cell function is central to the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D). Here we explore the relationship between the beta cell and its nutritional environment questioning how an excess of energetic substrate leads to an alteration of the production of energy and related insulin secretion. Changes in intracellular metabolite homeostasis are key markers of T2D islets but the modifications of the cell metabolite exchanges with their environment remains unknown. We addressed this question using nuclear magnetic resonance-based metabolomics and evaluated the consumption or secretion of 31 extracellular metabolites from healthy and TD2 human donor islets in culture. Islets were also cultured under high glucose and/or high palmitate to induce a gluco-, lipo- and glucolipotoxicity. Biochemical analyses revealed drastic alterations of pyruvate and citrate pathways which appear to be associated to mitochondrial oxoglutarate dehydrogenase (OGDH) downregulation. We then repeated our metabolomic investigation on beta-pancreatic cell line (INS-1E) derived from rat insulinoma. Our results evidence common OGDH downregulation with a clear effect on pyruvate and citrate pathways. However, instead of being secreted out of the cell as for human islets, citrate is targeted toward lipogenesis in the INS-1E cell line. Our results demonstrate the ability of metabolomics approaches performed on culture media to easily discriminate TD2 from healthy and functional islets.

## Introduction

Beta cells from pancreatic islets secrete insulin in response to glucose stimulation. Chronic exposure of beta-cells and human pancreatic islets to supraphysiological glucose concentration (glucotoxicity) impairs their glucose stimulated insulin secretion (GSIS)<sup>1,2</sup>. Moreover, multiple studies have shown a negative impact of high free fatty acid concentration (lipotoxicity) on beta-cell function and mass<sup>3</sup>. Altogether, physiological gluco- or lipo- toxicities lead to type 2 diabetes (T2D), in which beta-cell dysfunction is pointed to be a hallmark<sup>4,5</sup>. The mechanisms of this loss of function remains unknown. However, mitochondria seem to play a key role as the increase of the ATP/ADP ratio has been shown to lead to the exocytosis of insulin granules. The increase of ATP/ADP ratio during glucose stimulation is related to a tight link between glycolysis and mitochondrial metabolism<sup>6</sup>. Glucokinase expression and low level of lactate dehydrogenase allow beta-cell to efficiently convert glucose into pyruvate, which is incorporated into the tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative phosphorylation to increase ATP production<sup>7-10</sup>. Chronic exposure to a high glucose concentration reduces beta-cell ATP production, altering insulin content and secretion of both pancreatic islets and beta cell line<sup>11-13</sup>.

The question of how the axis glycolysis-TCA-insulin secretion is impaired in T2D, or during chronic glucolipotoxicity in *in vitro* conditions, is still largely unresolved<sup>14</sup>. Multi-omics analyses were performed to answer these questions. Intracellular metabolomic analyses performed on beta-cells during glucotoxicity and/or lipotoxicity treatments highlighted mitochondrial metabolic perturbations<sup>15,16</sup>. During chronic exposure to a high glucose concentration, murine beta-cells lines evidenced a rerouting of glucose toward glycerol and an increase of lipid production in rodent<sup>17</sup>. Lastly, transcriptomic and proteomic analyses were obtained from isolated islets from drug-induced diabetic mice model, showing an alteration of mitochondrial metabolism. This impairment was associated to mitochondrial TCA enzymes downregulation while glycolysis-associated enzymes were upregulated<sup>18</sup>. Independently, phosphoproteomic analyses performed on isolated islets from db/db obese mice model showed specific pyruvate dehydrogenase inhibition through phosphorylation and reduction of the two mitochondrial dehydrogenases implied in TCA cycle, namely isocitrate dehydrogenase (IDH) and oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)<sup>19</sup>. Finally, a recent review on metabolic



investigations points that most metabolomic analyses focused on intracellular metabolome but never on extracellular metabolite consumption or secretion in islet environments. Moreover, only few studies were performed on human isolated islets and most of them using rodent cell lines and islets<sup>20</sup>.

In this study, we used proton nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approaches to investigate the metabolic alterations of both human islets and INS-1E cell line. The human islets and murine beta cell line INS-1E were cultured under high glucose exposure, to mimic glucotoxicity, high palmitate exposure, to mimic lipotoxicity and both high glucose and palmitate exposure, to mimic glucolipotoxicity. We evidence functional and metabolic alterations of both models in the context of gluco-, lipo-, and glucolipo- toxicities. Our data confirm the alterations of mitochondria metabolism and show that mitochondrial pyruvate and citrate dehydrogenases are modified checkpoints in glucolipotoxic conditions. Interestingly, such metabolic alterations allow the straightforward discrimination of functional and non-functional islets.

## Results

### **The glucolipotoxicity-induced increased glucose intake promotes a glucose-stimulated insulin secretion loss of function and secretome remodeling in human islets**

To study the metabolic features associated with the secretion of insulin in beta-cells, we studied cultures of human pancreatic islets isolated from eleven donors (from D1 to D11) (Fig. S1A; Table 1), among which two were isolated from known type-2 diabetes (T2D) donors (D10 and D11). Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) measurements were performed to assess beta-cell function after isolation from donors and culture in the presence of 5 mM of glucose control condition medium. Seven batches of islets showed a basal insulin secretion below 1,000 mU/L/50 islets/45 mn (D1-D7) and four others harbored higher secretion levels (D8-D11) (Fig. S1B). As expected, D10 and D11 batches from T2D donors did not react to GSIS testing (Fig. 1A, and S1).

We observed that after 48 h of culture in the presence of 25 mM glucose and 0.1 mM palmitate GSIS failed and insulin content (IC) was decreased by more than 50%, validating a glucolipotoxicity-induced beta cell dysfunction. Glucotoxicity alone, but not lipotoxicity alone, produced GSIS failure and strong IC decrease (Fig. 1A, 1B, and S1;  $p < 0.05$ ). To investigate the islets metabolic profiles in relation to their GSIS properties and their ability to adapt to chronic nutritional stresses, islet batches was dispatched (300 islets per tubes) and subjected to altered culture conditions (6 replicates by condition). After 48 hours of culture, the supernatant was collected for nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) analyses. Sextuplicate of each batch was necessary to achieve robust quantification of the metabolite consumption or production, independently of the natural islet size variation for a given donor as illustrated in Fig. S1A.

All cell culture supernatants delivered high-resolution NMR spectra that displayed sharp peaks typical of small molecules. The careful analysis of the <sup>1</sup>H 1D and the two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR spectra led to the identification and quantification of 31 metabolites among each batch of islet, in control conditions versus gluco-, lipo- and glucolipo-toxicities (Table 2). Multivariate data analyses were firstly performed to determine the metabolite secretome differences between healthy- and T2D-derived islets in control culture conditions. Principal component analysis (PCA) was first conducted to check the homogeneity of the samples. No biological or technical outliers were identified. PCA was not sufficient to discriminate islets relative to their positive or negative GSIS response (Fig. S2A). To optimize the discrimination between islets metabolic profiles and identify functional metabolic signatures, a supervised

analysis of the NMR metabolic profiles was conducted by O-PLS-DA<sup>21</sup>. We obtained a clear discrimination between positive or negative GSIS response, as illustrated in Fig. 1C and S2, as assessed by high values of goodness-of-fit model parameters  $R^2$  and  $Q^2$ . These two components relate respectively to the explained and predicted variance in the model ( $R^2(X)=0.489$ ;  $R^2(Y)=0.94$ ;  $Q^2=0.914$ ). The discrimination robustness was further validated by re-sampling 1000 times the model under the null hypothesis showing a clear decrease of  $R^2$  and  $Q^2$  with the correlation between the original and permuted class information Y matrices (data not shown). The model statistical significance was assessed by a *p-value*  $9.25 \times 10^{-21}$ , calculated by analysis of variance (CV-ANOVA). Out of the 31 quantified metabolites, 4 metabolites (citrate, alanine, glutamate and lactate) presented a significant contribution to the statistical model as shown by Variable Importance in Projection for independent variables (VIP) values superior to 1.5. O-PLS-DA multivariate analyses were also performed under glucolipototoxicity conditions and showed equivalent positives and negative islets discrimination ( $R^2(X)=0.682$ ;  $R^2(Y)=0.923$ ;  $Q^2=0.871$ ) (Fig. S2). Alanine, pyruvate and citrate appeared to have a significant influence on the model discrimination, and glutamate and lactate were slightly under the  $VIP=1.5$  threshold. Altogether, alanine, pyruvate and citrate appeared as biomarkers of the human islets' dysfunction both in control and glucolipototoxicity conditions (Fig. S2).

The impact of gluco-, lipo- and glucolipo-toxicities conditions could only be assessed for D1 to D5 and D8 donors (Table 1). The 3 conditions induced significant alterations of metabolite secretion that could be discriminated from control by O-PLS-DA analyses (Fig. 1D). Interestingly, glucolipo- (Fig. S3A) and gluco-toxicities (Fig. S3B) induced similar perturbations, with pyruvate, citrate, alanine and lactate being the most discriminating metabolites, while lipotoxicity alone impacted the secretion of a different set of metabolites (isoleucine, tryptophan, glutamate) (Fig. S3C).

Table 2 show metabolite absolute quantity in nanomol in medium before islets incubation and after 48 h exposition allowing the determination of metabolite consumption or secretion rate in nmol per 300 islets per 48 h. Glucose was the most consumed metabolite with 271 (+/- 107) nmol for healthy donors and up to 839 (+/- 57) nmol (D10) consumed per 300 islets/48 h. No correlation could be drawn for glucose consumption in normal conditions between healthy and T2D donors- derived islets. The same observation was performed under glucolipototoxicity where glucose consumption could not discriminate positive and negative islets. Islets glucose consumption was increased upon glucolipototoxicity by 1.5 (D4) and up to 5-fold (D3). These results confirm that human islets do not regulate glucose entry under excess conditions, in accordance with other reports in the literature<sup>22</sup>. Although lactate was identified as a biomarker to discriminate positive from negative islets, its secretion ranged from 55 (+/-30) nmol (D5) up to 984 (+/-25) nmol (D10) with sometimes a similar secretion for healthy islets D3 (680 (+/-63) nmol) and TD2 islets D11 (695 (+/-123) nmol). The ratio of lactate secretion between normal and glucolipototoxicity oscillates between 1.3 (D3, D10, D11) and 2.5 (D4) without any clear link with islet functionality. Altogether the variability of lactate secretion precludes its utility as a candidate biomarker of islet dysfunction.

### **Pyruvate and citrate secretion are biomarkers of healthy islets alteration in the glycolysis-TCA-insulin secretion pathways**

A correlogram was performed to compare GSIS, IC and metabolite secretome features only from D1 to D5 (Fig. 1E). As expected, IC and GSIS were strongly correlated indicating that high insulin storage is associated with the capacity of insulin secretion. Alanine, citrate and pyruvate secretions were associated to both IC and GSIS ( $p<0.001$ ). We observed in healthy islets, a very low citrate secretion ( $\leq 10$  nmol) in control condition while pyruvate secretion reached 30 nmol (Table 2). The pyruvate and citrate secretions were significantly increased in TD2 islets (D10 and D11;  $p<0.01$ ) (Fig. 1F, and 1G). In glucolipotoxic conditions, pyruvate

secretion reached more than 100 nmol and citrate secretion more than 20 nmol (Table 2; Fig. 1F, and 1G). Statistical analyses comparing healthy derived islets and T2D derived islets confirmed significant increase of pyruvate ( $p < 0.01$ ) and citrate secretion ( $p < 0.01$ ). We conclude that culture condition, especially under high glucose concentration, can exacerbate a citrate and pyruvate oversecretion well observed for TD2 islets. This observation is readily confirmed on a plot of citrate secretion as a function of pyruvate secretion, that highlights a clear linear shift from islet positive under glucolipotoxicity to islet negative under normal conditions (Fig. 1H). Overall, these data point citrate and pyruvate secretion as quantitative biomarkers of islet alteration and loss of insulin secretion upon glucolipotoxic conditions.

Previous proteomic and phosphoproteomics studies evidenced specific mitochondrial enzymes modifications associated to diabetic mice model<sup>18,19</sup> but natural variation of key metabolic enzymes is well observed between rodent and human islets<sup>23</sup>. Thus, we focused on mitochondrial dehydrogenases (pyruvate dehydrogenase (PDH) and its phosphorylated form (pPDH), mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and oxoglutarate dehydrogenase (OGDH)). Quantitative immunoblots of the three dehydrogenases showed a decrease in OGDH expression around 50% after exposure to glucotoxicity for four islets (D1, D5, D6 and D7) and no decrease for only one islet (D4) producing an overall significant decrease in OGDH ( $p < 0.09$ ). PDH and IDH2 expressions were not modified as well as the pPDH/PDH ratio (Fig. 1I and S5A). Moreover, mitochondrial dehydrogenase expression was not clearly affected in DT2 islets (Fig. S5B).

### **Rodent INS-1E beta-cell confirm and modulate glucolipotoxicity related stoppers in the glycolysis-TCA-insulin pathways**

The study of metabolic stress conditions on islets was replicated on INS-1E cell line, the most widely studied model of beta cell derived from rat insulinoma. Surprisingly, high glucose exposure during 48 hours was the only condition inducing GSIS failure in INS-1E cells, as GSIS was enhanced by glucolipotoxicity by 72% and presented a tendency to be enhanced during lipotoxicity (Fig. 2A). However, INS-1E beta-cell presented a 50% decrease of IC content after glucolipotoxicity and glucotoxicity but not lipotoxicity ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2B) in total accordance with human islet alterations (Fig. 1B). Additionally, we have measured cell growth and oxygen consumption rates (OCR) as a marker of ATP regeneration capacity of cells. Results showed that glucotoxicity alone reduced cell amount of 13% after 72 h of culture ( $p < 0.05$ ) when cell amount was reduced from 32% and 38% by glucolipo- and lipo- toxicities only after 24 h ( $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$  respectively) (Fig. S6A). OCR was also measured between control and glucolipotoxicity in permeabilized cells directly supplied with pyruvate and ADP. It revealed a clear decrease of oxygen consumption by 85% ( $p < 0.01$ ) after glucolipotoxicity treatment (Fig. 2C, S4B and S4C). Altogether these data indicate that glucolipotoxicity influences cell viability and may impact mitochondria ability to use pyruvate.

As for human islets, Table 3 presents the metabolite absolute concentration in medium before INS-1E incubation and after 48 h of incubation which allow the determination of metabolite consumption or secretion rate in nmol per million cells per 48 h. Glutamine, glucose and arginine were the most consumed substrates by INS-1E cells while catabolic products such as glutamate, alanine and lactate were the most secreted. As for human islets analyses, a correlogram was used to identify metabolites correlated to both INS-1E GSIS and IC treated with control, gluco-, lipo- and glucolipotoxicity. However, as loss of GSIS and IC were not correlated upon glucolipotoxicity response (Fig. 2A, and 2B), the identification of metabolites with a significant variation shared between both GSIS and IC was irrelevant unlike for human islets (Fig. 2D). Particular to INS-1E, we identified 9/27 metabolites significantly modified in

the culture supernatant that were related to IC alteration while 12/27 other metabolites correlated to GSIS alteration. Altogether, 21/27 metabolites were modified to INS-1E loss of function.

As for Human islets, pyruvate secretion by INS-1E cells upon glucolipo- and gluco- toxicity showed a 2.5 folds oversecretion after 48 h (2.07  $\mu\text{mol}$ , and 2.37  $\mu\text{mol}$  respectively, vs 0.86  $\mu\text{mol}$  in control conditions) but no changes after lipotoxicity (Fig. 2E; Table 3  $p < 0.001$ ). On the other side, citrate secretion was decreased by almost 25% upon gluco-, lipo- and glucolipo-toxicities (0.16  $\mu\text{mol}$ , 0.14  $\mu\text{mol}$  and 0.12  $\mu\text{mol}$  respectively, vs 0.2  $\mu\text{mol}$  in control conditions) (Fig. 2F; Table 3  $p < 0.001$ ).

Concomitant analyses of INS-1E exometabolome with traditional endometabolome investigation under glucolipo-, gluco- and lipo- toxicities showed citrate accumulation in cells around 0.08 mM  $\pm$  0.009 ( $p < 0.01$ ) (Fig. S6 and data not shown) that cannot explain the reduction of 0.1  $\mu\text{mol}/10^6$  cells /24 h observed during glucolipototoxicity (Table 3; Fig. S6A). Glycerol accumulation raised from 0.03 to 0.102 mM/ $10^6$  cells (Fig. S6 and data not shown) as well as triglycerides (from 10 to 68  $\mu\text{mol}/10^6$  cells) during glucolipototoxicity (Fig. S6B and S6C). Triglycerides secretion was evident with a secretion from 6 to 132  $\mu\text{mol}/10^6$  cells/24 h) during glucolipototoxicity (Fig. 2G). We interpret that citrate metabolism could be rely on lipid synthesis. Indeed, part of citrate produced by mitochondria can be relocated into the cytoplasm and feed *de novo* lipogenesis pathway (Fig. 2H). Additionally, for INS-1E model several enzymes of *de novo* lipogenesis were monitored and quantified: fatty acid synthase (FAS), Acetyl-CoA carboxylase (ACC) and ATP citrate lyase (ACLY)). Glucolipototoxicity increased ACLY and FASN quantities more than 2 folds ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  respectively) but did not affect significantly ACC. Lipotoxicity alone did not affect the relative quantity of any lipogenic enzyme in INS-1E after 48 h. Glucotoxicity alone increased the ACLY, ACC and FASN relative quantity (Fig. 2I).

Then we profiled mitochondrial dehydrogenase expression as for human islets. IDH was not downregulated, we observed a clear diminution of OGDH quantity or glucolipototoxicity (39%,  $p < 0.05$ ) and for glucotoxicity (44%,  $p < 0.05$ ). Lipotoxicity did not affect any dehydrogenase levels but pPDH was clearly decreased with a pPDH /PDH ratio was decreased by 42%, a feature that was not observed in human islets (Fig. 2J).

## Discussion

In this study, we performed a comprehensive characterization of the metabolites secreted and consumed by human pancreatic islets in culture under various conditions, using NMR metabolomics approaches. We evidenced a clear discrimination of islets derived from healthy donors and T2D donors. Islets from TD2 donors consumed more glucose and secreted higher amounts of pyruvate and citrate than islets originating for healthy donors. These results indicated that the glycolysis to TCA axis was significantly dampened in the context of T2D. Similar changes were observed in healthy donors and INS-1E cells exposed to chronic high glucose. Our results demonstrated that glycolysis was upregulated in diabetic islets, as they manifest a clear increase in glucose consumption and pyruvate and lactate secretion. These results are in great accordance with the upregulation of selected glycolytic enzymes that was observed in T2D rat islets<sup>24</sup> and in rat islets and cell lines cultured in the presence of high glucose concentration<sup>18,19,25,26</sup>.

We also demonstrate that glucolipotoxic conditions induced a downregulation of mitochondrial OGDH in islets from healthy donors and INS-1E cells. This downregulation is expected to be associated with a reduction of the TCA rate, and a reduction of ATP synthesis and insulin secretion. Contrary to previous reports done on rodent islets and based on combined

transcriptomic-proteomics analyses<sup>18</sup> or combined proteomics-phosphoproteomic analyses<sup>19</sup>, IDH2 expression was not downregulated in our study and the pPDH/PDH ratio modification observed by both research groups was only evidenced in INS-1E cells but not in human islets. These discrepancies are likely to be related to the well-described human to rat models disparities, that have long been reported in the literature<sup>23</sup> and recently reviewed in the context of metabolomics studies<sup>20</sup>.

Our investigation of INS-1E cells reveals that both mitochondria oxygen consumption and coupling efficiency were impaired. These modifications may be associated with the incapacity of increased intracellular glucose to elevate cytosolic ATP levels and to drive glucose-stimulated insulin release. Contrary to islets that secreted citrate and pyruvate, we observed a clear augmentation of triglyceride secretion by INS-1E cells in the presence of elevated glucose concentration, and the over-expression of the lipogenic enzymes ACLY, ACC and FASN. An augmentation of the triglyceride biosynthesis was also observed in islets isolated from obese mice models of diabetes<sup>27</sup>. The low activity of ACLY, the first enzyme involved in *de novo* lipogenic pathway, in human islets (24 nmol product/min/mg protein) in comparison with rat islets (96 nmol product/min/mg protein)<sup>23</sup> could be an explanation to the functional discrepancies between the human and rodent models. Globally, these data suggest that high glucose alone may be sufficient to drive functional changes in rat INS-1E cells and open the question that rodent islets but not human islets would be able to activate *de novo* lipogenesis pathway<sup>20</sup>.

Altogether, our NMR-based metabolomics results of pancreatic islets and INS-1E cells, support a model where higher concentrations of glucose trigger a functional alteration of beta cells that is associated with the failure of GSIS and IC and a profound adaptation of cell and mitochondria metabolism (Fig. 3). The excess of energy brought by the increase of intracellular glucose is processed either toward the secretion of pyruvate and citrate (in the case of islets) or pyruvate and triglyceride (in the case of INS-1E cells). This model provides an integrated support compatible with our previous work that evidenced the role of mitochondria-ER contact and mitochondrial dehydrogenases in the diabetic disease progression<sup>28</sup> (Fig. S5C).

## Methods

### Ethic statement

Human islets were isolated from pancreas of 9 non-diabetic and 2 diabetic multiorgan donors (Table 1) with the approval of the Ethics Committee of the University of Lyon. Human pancreas were collected from brain-dead organ donors after informed consent was obtained in writing form from family members. Human islets isolation was performed by the European diabetes study center (CEED, Strasbourg, France), Geneva university hospitals (ECIT collaboration, Geneva, Switzerland) and Laboratory of cellular therapy for diabetes (LCTD, Montpellier, France).

### Human islet isolation and culture

Human islets were isolated by enzymatic digestion and density gradient purification from pancreatic samples of multiorgan donors, as detailed elsewhere<sup>29</sup>. Isolated islets were then cultured in DMEM medium at 5.5 mmol/l glucose until experiments were performed. Islets pictures were taken using ZEN Microscope version 2012 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

### **Cell culture**

Human islets were cultured 1 day in DMEM (Dutcher L0064-500) supplemented with 5 mM glucose, 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin. For specific metabolomic culture condition, the medium was replaced with DMEM without phenol red Pan Biotech P04-01548), and supplemented with 10% FBS, 4 mM glutamine 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin, 5 or 25 mM glucose (Sigma-Aldrich G8270-100G) and 0.017 mM BSA (Roche diagnostic 10 775 835 001) or 0.1 mM palmitate: BSA (6:1) (Sigma-Aldrich P0500-10G).

INS-1E beta-cells (RRID:CVCL\_0351) were grown in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 95% air at 37 °C) in RPMI (Dutcher L0501-500) supplemented with 10 mM glucose, 5 % FBS, 4 mM Pyruvate, 4 mM glutamine, 50 μM β-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin. For specific metabolomic culture condition, the medium was replaced by DMEM without phenol red and supplemented with 5% FBS, 4 mM glutamine 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin, 10 or 25 mM glucose and 0.017 mM BSA or 0.1 mM palmitate: BSA (6:1).

### **Insulin assay**

Human Insulin-Specific RIA (radioimmunoassay) was carried out at the Lyon-Sud hospital (CBS, Lyon, France). 50 human islets were preincubated 2 h at 37°C in DMEM 5 mM glucose containing 5% FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin. Next, human islets were incubated 45 min with 5.5 mM glucose in the same medium and challenged 45 min with 25 mM glucose to measure the glucose stimulated insulin secretion (GSIS) capacity of each batch of islets. Supernatants were collected after both 45 min incubation periods. Cellular insulin content was extracted by an overnight incubation in ethanol acid on 50 equivalent islets (IEQ). The samples were analyzed on the Cobas e411 and on the AutoDELFIA. For the Cobas e411 analysis of insulin, the following reagents were used: Insulin CalSet, PreciControl Multimarker, PreciControl Multianalyte, PreciControl in the Centre de Biologie et de Pathologie Sud. A detection interval from 0.200–1,000 μU/ml or 1.39–6,945 pmol/l was defined by the manufacturer [COBAS Kit-insert Insulin, Roche Diagnostics, 2011]. The assays used for the measurements on AutoDELFIA were B080–101 with a detection limit of 3 pmol/l and measurement interval 3–1,000 pmol/l [AutoDELFIA Insulin Kit insert B080-101, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Finland, 2003]. All measures were normalized on islets number.

INS-1E insulin assay was performed by ELISA (ALPCO 80-INSMS-E01) according to the manufacturer's instructions and normalized on cell number. Briefly cells were preincubated 2 h at 37 °C in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer (NaCl 125 mM; KCl 4.74 mM; NaHCO<sub>3</sub> 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM; HEPES 25 mM; pH 7.4) containing 0.1% BSA and 5 mM glucose. For GSIS experiments, cells were incubated for 45 min in the same medium and then challenged 45 min with 30 mM glucose in the same medium. Supernatants were collected after both 45 min incubation periods. Cellular insulin content was determined on overnight acid-ethanol-extracted lysates.

### **Triglyceride assay**

Triglyceride content and secretion were quantified according to the manufacturer's instruction (Biolabo 87319) using glycerol from Sigma-Aldrich as standard and then normalized by the cell number.

### **Western Blot**

Cell extracts from approximately 3,000 Human islets and 10<sup>7</sup> INS1-E cells were migrated on a 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane using a Bio-Rad Trans-Blot Turbo

Transfer System and blotted using anti tubulin (Sigma-Aldrich T5168), anti ACC (Cell Signaling #3676), ACLY (Cell Signaling #4332), Calnexin (Santacruz sc-6465), FASN (Cell Signaling #3180), IDH2 (Elabscience E-AB-11319), OGDH (Cell signaling #26865), PDH (Abclonal P08559), pPDH (Cell signaling #31866). The proteins of interest were revealed by enhanced chemiluminescence detection (Immobilon Forte Western HRP Substrate with a Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS+, Universal Hood II) and the signal was quantified by using the Image Lab software.

### **Oil Red O staining**

INS-1E cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and fixed using 3.7% formaldehyde (in PBS) for 1 h at room temperature. The fixative was removed and replaced with 60% isopropanol. Cells were stained for 10 min at room temperature with Oil Red O ready used solution (Merck, Darmstadt, Germany). Cells were then washed 3 times with PBS to remove excess stain. Photos were taken using ZEN Microscope version 2012 (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

### **Oxygen consumption rate**

INS-1E permeabilised cells were pelleted and resuspended in 100  $\mu$ l KRBH supplemented with 0.5% free fatty acid BSA. Oxygen consumption rate (OCR) was measured at 37°C using a Clark-type electrode (Mitocell MT200 with a 782 Oxygen meter, Strathkelvin Instruments). Digitonin (50  $\mu$ M) was added during 10 min to permeabilise cells. Pyruvate (2 mM) and ADP (2 mM) were used as respiratory substrates and were added during OCR acquisition.

### **Sample preparation for NMR analyses**

Metabolite concentrations were measured in supernatants of INS-1E cell or human islets. Cells were seeded at a density of  $0.3 \times 10^6$ ,  $0.32 \times 10^6$ ,  $0.38 \times 10^6$  or  $0.42 \times 10^6$  cells per well for control, glucotoxicity, lipotoxicity or glucolipotoxicity conditions respectively in order to obtain the same number of cells upon supernatant collection (48 h after medium exchange, see Fig. S6). Cells were cultured in 12-well dishes with 2 ml of culture medium. After 60 h, the medium was replaced by 600  $\mu$ l of conditioned medium, and the culture was prolonged for 24 or 48 hours as indicated. Control media without cells were processed along to determine the initial metabolite concentrations. At the end of the culture, supernatants were collected after centrifugation, snap-frozen and stored at -20°C until NMR analyses. For the NMR samples preparation, 540  $\mu$ l of culture supernatants were supplemented with 60  $\mu$ l of phosphate buffer pH 7.4 (162 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 34 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM TSP, and 2 mM NaN<sub>3</sub> in 100% D<sub>2</sub>O) [18007604 Beckonert 2007] and vortexed. Samples were analyzed in 5 mm NMR tubes containing 550  $\mu$ l of the sample mix. Control culture media were analyzed in parallel during each NMR session.

### **NMR analysis and data processing**

High-resolution NMR analyses were carried out at the very high field NMR center (CRMN, Lyon, France). All NMR experiments were acquired at 30.0°C on a 600 MHz Bruker NMR spectrometer equipped with a 5 mm TCI cryoprobe. A cooled SampleJet autosampler enabled high throughput data acquisition. A standard <sup>1</sup>H-1D NMR pulse sequence nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) with z-gradient and water presaturation (Bruker pulse program *noesygppr1d*) was recorded on each sample, with a total of 128 transient free induction decays (FID) and a spectral width of 20 ppm, and a relaxation delay was set to 4 seconds. The NOESY mixing time was set to 10 milliseconds, and the 90° pulse length was automatically determined for each sample (around 13  $\mu$ s). The total acquisition time of each sample was 12 minutes and 15 seconds.

All free induction decays (FIDs) were multiplied by an exponential function corresponding to a 0.3 Hz line-broadening factor prior to Fourier transform <sup>1</sup>H-NMR spectra which were manually phased and referenced to the glucose doublet at 5.23 ppm using TopSpin 3.6 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany).

### **Metabolite identification and quantification**

Identification of the metabolites was carried out from the 1D NMR spectra using the software Chenomx NMR Suite 8.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada) and confirmed from analysis of 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, and <sup>1</sup>H J-Resolved NMR spectra recorded with standard parameters. The measured chemical shifts were compared to reference shifts of pure compounds using the HMDB database <sup>30</sup>. Relative metabolite concentrations were determined using Chenomx software by manual fitting of the proton resonance lines for the compounds available in the database. The linewidth used in the reference database was adjusted to the width of one component of the alanine doublet. A pure standard lactate solution (1 g/l, Fisher) was used as an external concentration reference and exploited using the ERETIC2 utility from TopSpin (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany) to add a digitally synthesized peak to a spectrum <sup>31</sup>. Concentrations are presented as non-normalized data. They are apparent concentrations, as endogenous and FCS proteins were not removed from the NMR samples.

### **Multivariate analysis on exometabolome**

Outlier's spectrum was identified by PCA on metabolite quantifications. The between-group differences were identified by OPLSDA coefficients on metabolite quantifications, and the implication of specific metabolite was assessed using VIP.

The matrix was then introduced to EZinfo 2.0 software for principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squared discriminant analysis (OPLS-DA) analyses. All variables were Pareto scaled before analysis. In order to gain an overview of the rat plasma metabolic profiling; an unsupervised PCA method was used to give the comprehensive view of the clustering trends for the three groups. A supervised OPLS-DA analysis technique was used to search biomarkers based on the variable importance in the projection (VIP .1) between NC and M. The quality of these models can be explained by R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> values. R<sup>2</sup> indicates the goodness of fit displaying the variance explained in the model and Q<sup>2</sup> indicates predictability displaying the variance in the data predictable by the model. The values of these parameters close to 1.0 indicating a reasonably good prediction for the constructed mathematical mode.

The quantified metabolites matrix was then introduced to Simca 15.0 software. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squared discriminant analysis (OPLS-DA) were performed. All variables were Pareto scaled before analysis. Biomarkers were search using the Variable Importance in the Projection (VIP) on supervised OPLS-DA analysis technique between treatments. R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup> values were used to assessed quality of these models. The goodness of fit displaying the variance explained in the model and the predictability displaying the variance in the data predictable by the model <sup>32</sup> were indicate respectively by R<sup>2</sup> and Q<sup>2</sup>. These values have to be as close as possible to 1.0 to indicate a good prediction for the model.

### **Correlogram and heat map**

Correlation between beta cell function (GSIS and IC) and exometablome were assessed after 48 h treatment. The r correlation coefficients were calculated using Excel. Statistical significance of correlation coefficients was assessed by using Student law. Heatmaps were generated using log<sub>2</sub>(correlation coefficient fold change).



**Statistical Analysis**

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. If values are paired, differences between two groups were tested with paired Student *t* test. If else, value normality is assessed with Jarque-Bera test and differences between groups were tested with Welch test. Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ .

**Data availability**

The newly generated 1H-NMR data have been deposited in the MetaboLights database with the following accession number MTBLS3541.

**Acknowledgements**

Financial support from the IR-RMN-THC Fr3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged. This research was funded by a Price of the Francophone Diabetes Society (SFD) (BP).

**Author contributions**

JP, AM, GR and BP contributed to the conception and design of the study. All authors contributed to the acquisition or analysis and interpretation of results. JP, BP, GR, JR and AM wrote the manuscript. All authors contributed to revising the manuscript for important intellectual content and approved the final version of the manuscript. BP is the guarantor of the study 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.

**Competing interests**

The authors declare no competing interests.

## References

1. Bensellam, M., Laybutt, D. R. & Jonas, J.-C. The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol* **364**, 1–27 (2012).
2. Eizirik, D. L., Korbitt, G. S. & Hellerström, C. Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the beta-cell function. *J Clin Invest* **90**, 1263–1268 (1992).
3. Sharma, R. B. & Alonso, L. C. Lipotoxicity in the pancreatic beta cell: not just survival and function, but proliferation as well? *Curr Diab Rep* **14**, 492 (2014).
4. Weir, G. C. Glucolipotoxicity,  $\beta$ -Cells, and Diabetes: The Emperor Has No Clothes. *Diabetes* **69**, 273–278 (2020).
5. Weir, G. C., Butler, P. C. & Bonner-Weir, S. The  $\beta$ -cell glucose toxicity hypothesis: Attractive but difficult to prove. *Metabolism - Clinical and Experimental* **124**, (2021).
6. Malmgren, S. *et al.* Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion. *J Biol Chem* **284**, 32395–32404 (2009).
7. Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P.-L. & Wollheim, C. B. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* **5**, 330–335 (2003).
8. Prentki, M., Matschinsky, F. M. & Madiraju, S. R. M. Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab* **18**, 162–185 (2013).
9. Schuit, F. C., De Vos, A., Moens, K., Quartier, E. & Heimberg, H. Glucose-induced B-cell recruitment and the expression of hexokinase isoenzymes. *Adv Exp Med Biol* **426**, 259–266 (1997).
10. Sekine, N. *et al.* Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* **269**, 4895–4902 (1994).
11. Poirout, V. & Robertson, R. P. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* **29**, 351–366 (2008).
12. van Raalte, D. H. & Diamant, M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? *Diabetes Res Clin Pract* **93 Suppl 1**, S37-46 (2011).
13. Wang, C., Geng, B., Cui, Q., Guan, Y. & Yang, J. Intracellular and extracellular adenosine triphosphate in regulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells ( $\beta$ ). *J Diabetes* **6**, 113–119 (2014).
14. Antinozzi, P. A., Ishihara, H., Newgard, C. B. & Wollheim, C. B. Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. *J Biol Chem* **277**, 11746–11755 (2002).
15. Wallace, M., Whelan, H. & Brennan, L. Metabolomic analysis of pancreatic beta cells following exposure to high glucose. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 2583–2590 (2013).
16. Yousf, S. *et al.* Metabolic signatures suggest o-phosphocholine to UDP-N-acetylglucosamine ratio as a potential biomarker for high-glucose and/or palmitate exposure in pancreatic  $\beta$ -cells. *Metabolomics* **15**, 55 (2019).
17. Mugabo, Y. *et al.* Metabolic fate of glucose and candidate signaling and excess-fuel detoxification pathways in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* **292**, 7407–7422 (2017).
18. Haythorne, E. *et al.* Diabetes causes marked inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nat Commun* **10**, 2474 (2019).
19. Sacco, F. *et al.* Phosphoproteomics Reveals the GSK3-PDX1 Axis as a Key Pathogenic Signaling Node in Diabetic Islets. *Cell Metab* **29**, 1422-1432.e3 (2019).
20. Spégel, P. & Mulder, H. Metabolomics Analysis of Nutrient Metabolism in  $\beta$ -Cells. *J Mol Biol* **432**, 1429–1445 (2020).

21. Fonville, J. M. *et al.* The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabonomics and metabolic phenotyping. *Journal of Chemometrics* **24**, 636–649 (2010).
22. Malinowski, R. M. *et al.* Pancreatic  $\beta$ -cells respond to fuel pressure with an early metabolic switch. *Sci Rep* **10**, 15413 (2020).
23. MacDonald, M. J. *et al.* Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, atp citrate lyase, and pyruvate carboxylation and high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *J Biol Chem* **286**, 18383–18396 (2011).
24. Hou, J. *et al.* Temporal Transcriptomic and Proteomic Landscapes of Deteriorating Pancreatic Islets in Type 2 Diabetic Rats. *Diabetes* **66**, 2188–2200 (2017).
25. Bensellam, M., Van Lommel, L., Overbergh, L., Schuit, F. C. & Jonas, J. C. Cluster analysis of rat pancreatic islet gene mRNA levels after culture in low-, intermediate- and high-glucose concentrations. *Diabetologia* **52**, 463–476 (2009).
26. Roche, E. *et al.* Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem* **272**, 3091–3098 (1997).
27. Aichler, M. *et al.* N-acyl Taurines and Acylcarnitines Cause an Imbalance in Insulin Synthesis and Secretion Provoking  $\beta$  Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Cell Metab* **25**, 1334-1347.e4 (2017).
28. Dingreville, F. *et al.* Differential Effect of Glucose on ER-Mitochondria  $Ca^{2+}$  Exchange Participates in Insulin Secretion and Glucotoxicity-Mediated Dysfunction of  $\beta$ -Cells. *Diabetes* **68**, 1778–1794 (2019).
29. Shapiro, A. M. J., Pokrywczynska, M. & Ricordi, C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol* **13**, 268–277 (2017).
30. Wishart, D. S. *et al.* HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* **46**, D608–D617 (2018).
31. Jung, Y.-S., Hyeon, J.-S. & Hwang, G.-S. Software-assisted serum metabolite quantification using NMR. *Anal Chim Acta* **934**, 194–202 (2016).
32. Gao, X. *et al.* Plasma metabolomic profiling to reveal antipyretic mechanism of Shuang-huang-lian injection on yeast-induced pyrexia rats. *PLoS One* **9**, e100017 (2014).

**Fig. 1: Functional analysis of human pancreatic islets and metabolite production and secretion analyses under glucolipototoxicity**

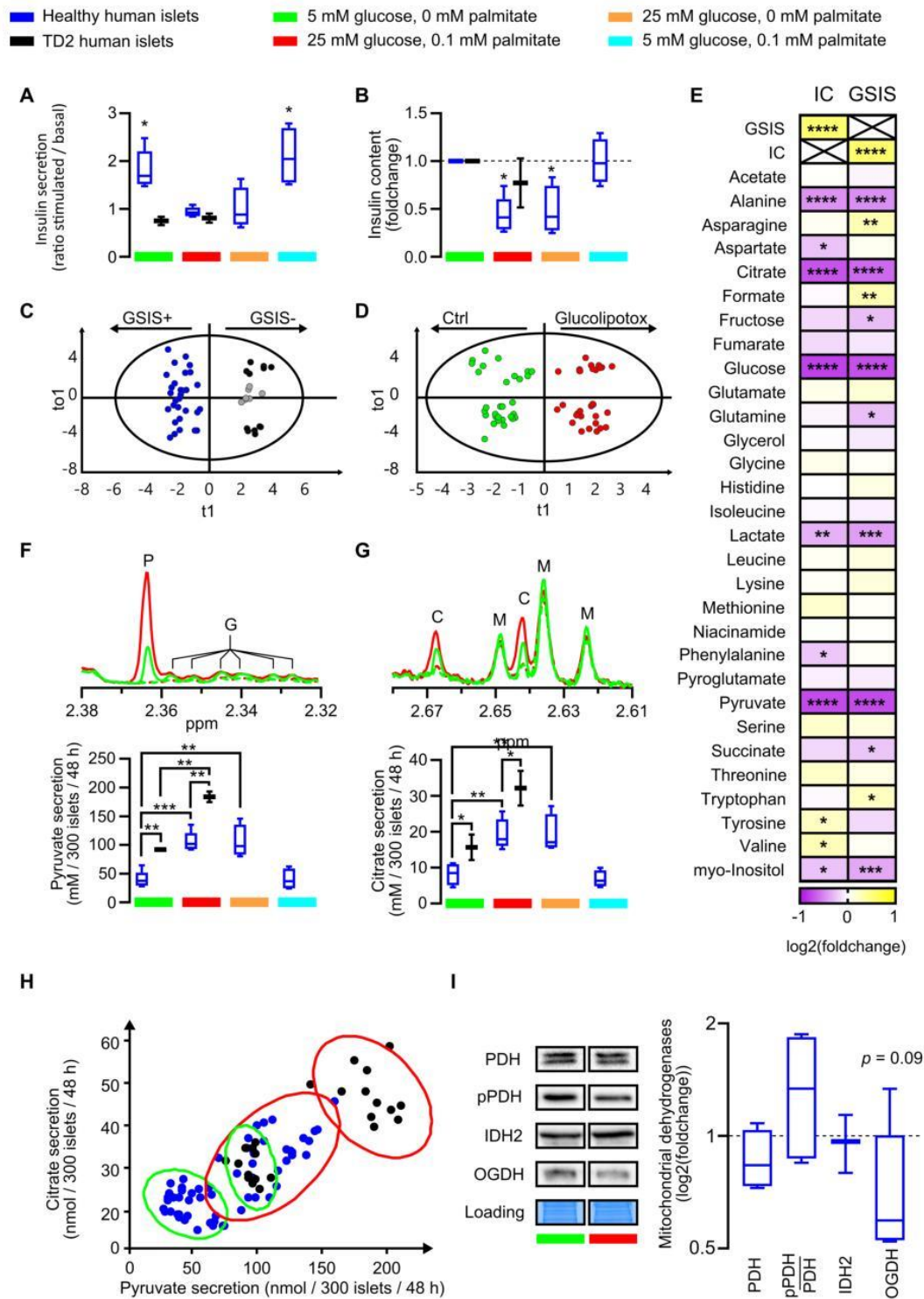
(A, B) Boxplots showing respectively stimulated/basal insulin secretion and corresponding cellular Insulin Content (IC) of human pancreatic islets during GSIS after 48 h treatment with indicated glucose and palmitate concentration. (n= 5 healthy human islets D1-D5, and n=2 TD2 islets D10-D11). Significance in (A) represent the difference between stimulated versus basal insulin secretion and significance in (B) represent difference between control and treated conditions. (C, D) 0-PLS-DA score plot derived from <sup>1</sup>H NMR metabolite quantification discriminating human GSIS positive islets vs non-secreting ones after 48 h in control medium (C) and after 48 h in control vs glucolipototoxicity medium (D). The major metabolites contributing to the cluster separation were evidenced by the derived-models VIP values detailed in Fig. S2 and S3. (E) Log<sub>2</sub> fold change of the correlation coefficient between islet insulin secretion after glucose stimulation (GSIS) or insulin content (IC) and metabolite concentration in medium after 48 h in all treatments (control, gluco-, lipo- or glucolipototoxicity) of D1-D5 islet donors. Significance represents the significativity of the calculated correlation. (F, G) Representative high-resolution NMR spectra (upper panel) and corresponding metabolite quantification (lower panel). P, G, C and M <sup>1</sup>H-NMR peaks correspond respectively to specific peaks of pyruvate, glutamate, citrate and methionine respectively. Green lines represent control culture condition compared to high glucose (25 mM) and high palmitate (0.1 mM) culture conditions in red. Dotted line and full line represent medium at 0 and 48 h culture respectively. (F) Pyruvate and (G) citrate secretions of 300 pancreatic islets after 48h of incubation with indicated culture conditions. (K) Scatter plot of pancreatic islet pyruvate and citrate secretions after 48 h in control culture condition (green ellipse) and in high glucose (25 mM) and palmitate (0.1 mM) culture condition (red ellipse) in healthy islets (blue) and DT2 islets (black). Ellipse represents confidence interval at 95%. (I) Representative western blots and quantitative analyses of key mitochondrial dehydrogenases namely PDH, pPDH, IDH2, OGDH in human pancreatic islets of 5 donors (D1, D4-D7) cultured 48 h under control or glucolipototoxicity. Student t-test was performed to compare enzyme expression between control and glucolipototoxicity conditions. Error bars represent standard deviation, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001

**Fig. 2: Functional analysis of INS-1E beta cell and metabolite production analyses under glucolipototoxicity.**

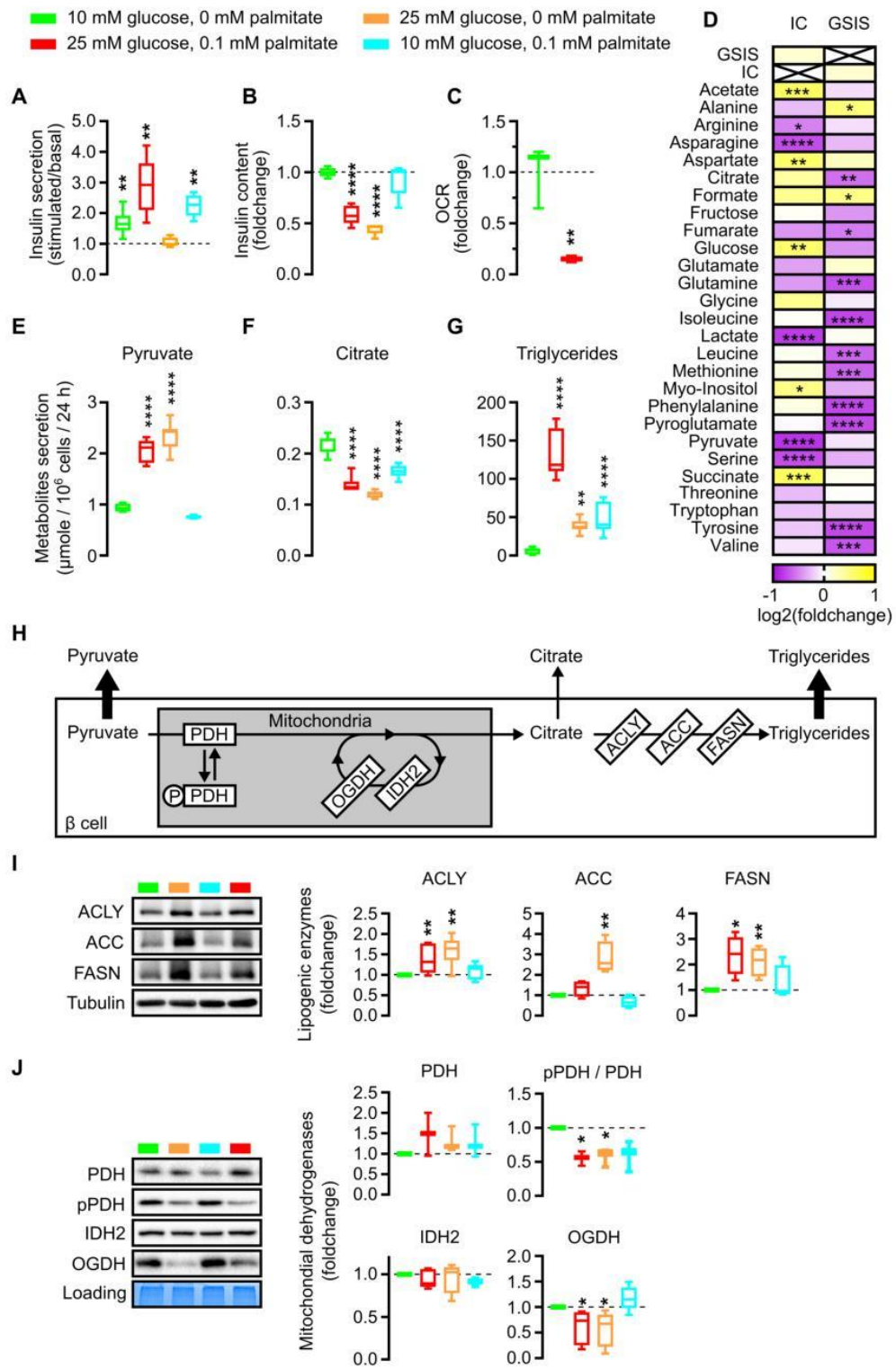
(A, B) Boxplots showing respectively Stimulated/Basal insulin secretion and corresponding cellular insulin content (IC) of INS-1E cells during GSIS after 48 h treatment with indicated glucose and palmitate concentration. Significance in (A) represents the difference between Stimulated versus Basal insulin secretion and significance in (B) represents difference between control and treated conditions. (C) Boxplots showing oxygen consumption rate (OCR) of INS-1E permeabilized cells after pyruvate and ADP addition following 48 h treatment in corresponding glucose and palmitate concentration. (D) Log<sub>2</sub> fold change of the correlation coefficient between islet insulin secretion after glucose stimulation (GSIS) or insulin content (IC) and metabolite concentration in medium after 48 h in all treatments (control, gluco-, lipo- or glucolipototoxicity) of INS-1E cells. Significance represents the significativity of the calculated correlation. (E, F, G) Pyruvate (E), citrate (F) and triglycerides (G) secretion normalized by cell number after 48 h incubation with indicated culture conditions. (H) Pyruvate fate in oxidative phosphorylation metabolism and de novo lipogenesis. (I, J) Representative western blot and quantitative analyses of ACLY, ACC, FASN (I) and PDH, pPDH, IDH2,

OGDH (J) in INS-1E cells. Error bars represent standard deviation. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**Fig. 3: Model presenting how glucolipotoxicity could trigger a mitochondrial bypass that leads to metabolite excretion rather than energy production.**



**Fig. 1**



**Fig. 2**

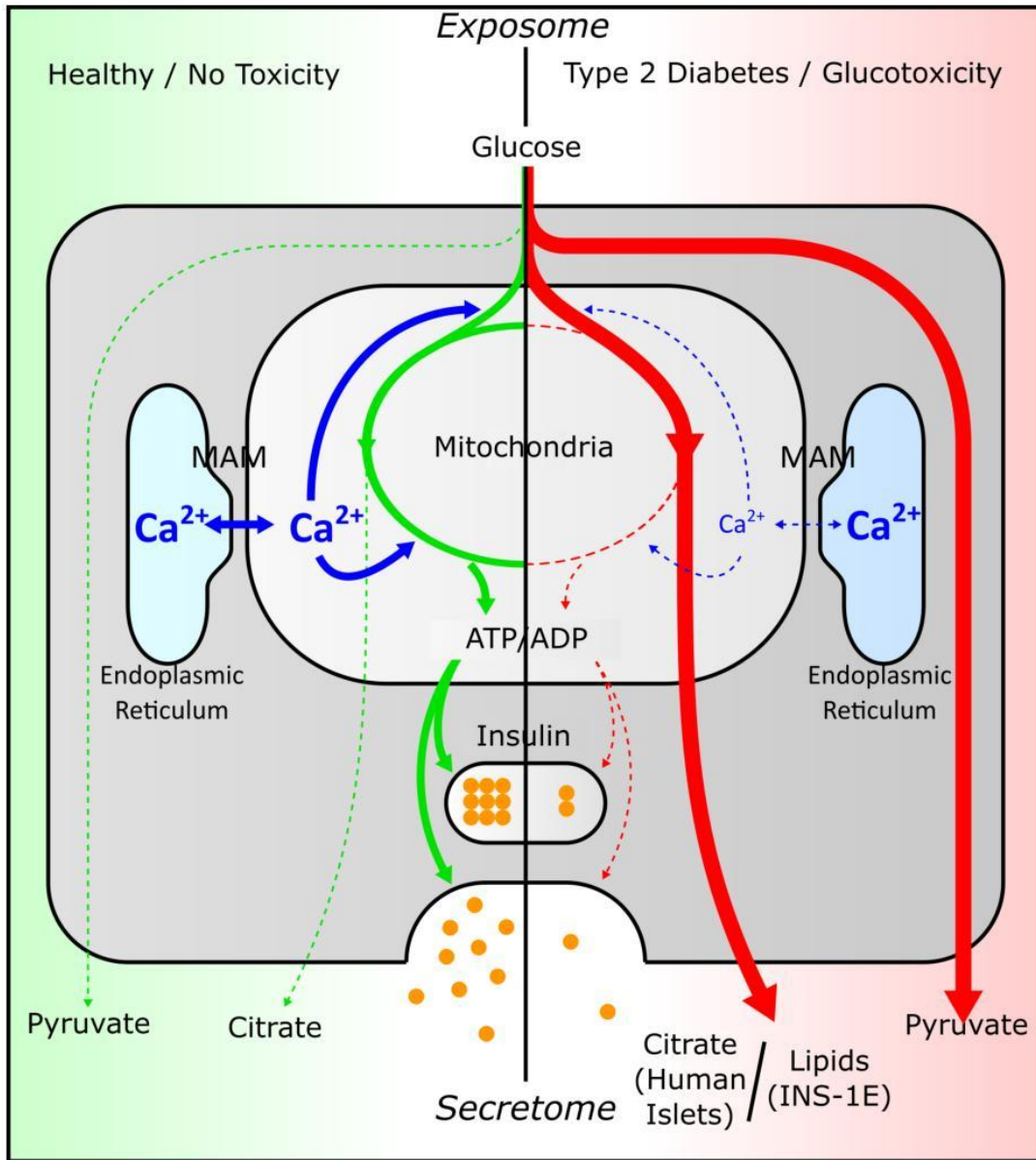


Fig. 3



**Table 1: properties of each batch of human islets regarding donor physiopathology and death.**

Donor	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	Mean	SEM
Unique identifier	HP 1907	HP 1905	HP 1908	HO 2001	HP 1910	HL-28	HL-29	HL-20	FM 88	HM 84	HM 92		
Origin/source of islets	CEED	CEED	CEED	CEED	CEED	ECTT	ECTT	ECTT	LCTD	LCTD	LCTD		
Islet isolation centre	Strasbourg	Strasbourg	Strasbourg	Strasbourg	Strasbourg	Geneva	Geneva	Geneva	Montpellier	Montpellier	Montpellier		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.9	19.1	20.5	26.7	27.8	21.9	25.6	27.2	26	30.5	30.1	25.6	3.7
age (years)	58	60	86	64	61	55	59	46	26	62	68	58.6	14.6
Sex (M/F)	M	M	F	F	M	F	M	M	M	M	M	27% F / 73% M	
plasma glucose test	<11,1mmol/l	<11,1mmol/l	ND	ND	<11,1mmol/l	<11,1mmol/l	<11,1mmol/l	<11,1mmol/l	ND	<11,1mmol/l	ND		
cause of death	Stroke	Stroke	subdural hematoma	Stroke	Stroke	no death (auto-transplantation)	Stroke	Stroke	Suicide	Trauma	Trauma		
Warm ischemia time	54min	2min30	35min	<2h	<2h	<2h	<2h	62 min	<2h	<2h	0h		
Donor history of diabete? Yes/No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	T2D	T2D		
Diabetes duration (years)										ND	ND		
Glucose-lowering therapy at time of death										Metformin	Metformin		

**Table 2: Metabolite amount measured by <sup>1</sup>H-NMR in human islets supernatants after 48 h of culture in the conditions described in Fig. 1.** Metabolite quantity in nanomole in the medium placed in the same culture conditions but without cells are indicated in the presented results. Data have not been normalized. 300 islets were used per well and Human islet donor are indicated and related to Table 1. Statistics are from t-tests; p value  $\leq 0.05$  is considered significant.

D1 : healthy donor		25		25		5		25.0		25.0		5.0		25.0		5.0	
Glucose (mM)		5	0	Mean (±SD)	p value	25	0	Mean (±SD)	p value	5	0.1	Mean (±SD)	p value	25.0	0.1	25.0	0.0
Palmitate (mM)		0	0.1	Mean (±SD)	p value	0	0	Mean (±SD)	p value	0.1	0.1	Mean (±SD)	p value	0.0	0.1	0.0	0.1
Acetate	31.1 (±1.5)	35.2 (±1.1)	***	32.4 (±1.2)		34.6 (±3.2)	*	28.0		27.1	25.3	24.1		25.3	24.1	25.3	24.1
Alanine	99.0 (±7.6)	107.6 (±2.9)	*	114.4 (±8.2)		105.5 (±8.2)	**	57.7		57.4	55.6	54.6		57.4	55.6	54.6	54.6
Asparagine	8.0 (±0.9)	7.4 (±1.2)		8.6 (±3.0)		7.2 (±3.0)		5.6		0.6	9.4	7.1		0.6	9.4	7.1	7.1
Aspartate	7.2 (±0.8)	8.7 (±1.5)		7.1 (±1.2)		9.1 (±3.1)		6.1		5.6	6.8	10.3		5.6	6.8	10.3	10.3
Citrate	18.9 (±0.7)	32.2 (±3.6)	***	30.9 (±2.5)		19.9 (±3.9)	****	14.4		14.3	15.1	14.3		14.3	15.1	14.3	14.3
Formate	27.8 (±3.1)	27.7 (±1.5)		26.4 (±2.6)		28.6 (±1.9)		25.1		23.8	22.4	24.5		23.8	22.4	24.5	24.5
Fructose	267.2 (±10.6)	269.0 (±8.3)		250.4 (±11.9)		240.9 (±10.8)	*	277.2		250.0	257.8	249.7		250.0	257.8	249.7	249.7
Fumarate	1.3 (±1.1)	1.6 (±1.1)		1.9 (±1.1)		1.3 (±1.0)		nd		1.8	2.0	nd		1.8	2.0	nd	nd
Glucose	2,760.1 (±92.2)	1,2478.6 (±201.3)	****	1,1271.6 (±425.6)		2,756.4 (±89.1)	****	2,905.0		13,016.6	11,922.8	2,975.9		13,016.6	11,922.8	2,975.9	2,975.9
Glutamate	78.6 (±4.2)	70.6 (±2.4)	**	70.7 (±4.7)		71.8 (±9.8)	*	45.0		45.1	47.6	38.0		45.1	47.6	38.0	38.0
Glutamine	1,333.2 (±48.8)	1,449.4 (±36.6)	**	1,319.1 (±73.9)		1,379.0 (±40.4)		1,473.5		1,522.9	1,345.2	1,453.9		1,522.9	1,345.2	1,453.9	1,453.9
Glycerol	147.9 (±281.5)	37.4 (±4.8)		37.0 (±3.9)		29.0 (±5.8)		46.4		44.8	45.4	43.1		44.8	45.4	43.1	43.1
Glycine	190.1 (±9.8)	171.3 (±11.4)	*	175.2 (±12.8)		193.5 (±4.5)	*	181.3		184.4	181.3	181.3		184.4	181.3	181.3	181.3
Histidine	97.1 (±7.9)	105.0 (±2.0)		92.2 (±8.0)		92.0 (±6.7)		102.4		91.4	88.3	92.4		91.4	88.3	92.4	92.4
Isoleucine	361.1 (±16.3)	367.4 (±7.1)		337.4 (±26.6)		371.1 (±8.8)		359.8		397.1	340.7	359.0		397.1	340.7	359.0	359.0
Lactate	992.9 (±39.7)	1113.9 (±42.3)	***	1100.9 (±68.4)		1037.8 (±107.1)	*	861.6		874.4	860.4	860.6		874.4	860.4	860.6	860.6
Leucine	385.0 (±19.6)	389.9 (±8.2)		368.0 (±25.0)		389.1 (±6.5)		390.0		389.6	374.0	385.3		389.6	374.0	385.3	385.3
Lysine	342.4 (±8.6)	343.6 (±6.6)		325.4 (±13.7)		341.2 (±9.4)	*	339.7		342.4	325.0	334.6		342.4	325.0	334.6	334.6
Methionine	72.7 (±4.7)	74.5 (±4.1)		70.1 (±2.5)		75.1 (±3.9)		70.6		74.2	68.9	60.7		74.2	68.9	60.7	60.7
Myo-Inositol	96.9 (±4.3)	77.7 (±6.3)	***	78.4 (±4.5)		101.9 (±3.5)	****	101.5		76.2	83.9	97.2		76.2	83.9	97.2	97.2
Niacinamide	13.6 (±1.0)	15.4 (±2.8)		14.9 (±3.7)		13.1 (±3.5)		16.9		17.0	17.3	13.1		17.0	17.3	13.1	13.1
Phenylalanine	192.5 (±9.7)	239.3 (±14.3)	***	227.0 (±15.2)		219.7 (±16.1)	**	178.9		181.1	174.0	178.8		181.1	174.0	178.8	178.8
Pyroglutamate	259.2 (±11.1)	292.1 (±16.0)	**	245.3 (±14.7)		289.8 (±15.9)	**	275.9		294.5	252.5	294.4		294.5	252.5	294.4	294.4
Pyruvate	40.5 (±4.7)	93.2 (±4.9)	****	93.3 (±9.3)		48.3 (±15.2)	****	1.7		1.2	1.9	0.6		1.2	1.9	0.6	0.6
Serine	163.9 (±2.7)	156.7 (±6.5)	*	142.3 (±13.6)		165.6 (±3.8)	*	168.0		173.2	165.4	166.2		173.2	165.4	166.2	166.2
Succinate	39.0 (±2.2)	40.9 (±1.1)		36.6 (±2.0)		38.6 (±1.0)		42.4		40.1	36.0	37.3		40.1	36.0	37.3	37.3
Threonine	361.4 (±16.0)	343.1 (±23.0)		346.0 (±30.1)		345.8 (±14.0)		388.2		372.5	348.2	348.2		372.5	348.2	348.2	348.2
Tryptophan	10.6 (±1.8)	17.8 (±2.9)	***	10.2 (±1.4)		14.5 (±2.4)	**	12.1		15.4	10.9	17.9		15.4	10.9	17.9	17.9
Tyrosine	159.9 (±21.8)	144.7 (±25.5)		157.9 (±19.8)		129.7 (±24.8)	*	184.2		187.6	185.0	181.9		187.6	185.0	181.9	181.9
Valine	316.9 (±7.8)	300.6 (±7.2)	**	290.4 (±17.4)		316.5 (±11.1)	*	320.5		295.8	301.8	313.2		295.8	301.8	313.2	313.2

D2 : healthy donor		25		5		25.0		5.0		25.0		5.0						
Glucose (mM)	5	Mean (±SD)	p value	25	0	Mean (±SD)	p value	5	0.1	Mean (±SD)	p value	Medium	25.0	0.0	25.0	0.0	5.0	0.1
Palmitate (mM)	0	Mean (±SD)	p value	0.1														
Acetate	34.2 (±2.9)	42.1 (±3.2)	**	39.8 (±2.0)		34.3 (±2.7)	**	34.3 (±2.7)		26.0		23.4	26.0		22.8		24.7	
Alanine	67.7 (±3.7)	95.8 (±5.3)	****	90.5 (±6.5)		75.1 (±6.0)	****	75.1 (±6.0)		33.8		25.9	33.8		27.8		31.6	
Asparagine	13.7 (±3.6)	11.0 (±2.2)		11.4 (±2.4)		13.5 (±2.4)		13.5 (±2.4)		7.7		12.1	7.7		10.2		13.4	
Aspartate	8.5 (±1.3)	9.7 (±2.1)		8.6 (±1.7)		7.5 (±1.0)		7.5 (±1.0)		7.0		7.3	7.0		5.9		6.7	
Citrate	22.8 (±2.4)	35.8 (±5.7)	**	38.2 (±6.9)		18.5 (±2.9)	**	18.5 (±2.9)		10.1		11.6	10.1		11.0		11.4	
Formate	26.6 (±2.2)	25.2 (±1.4)		28.0 (±3.4)		26.5 (±4.8)		26.5 (±4.8)		18.2		16.7	18.2		21.6		21.2	
Fructose	144.6 (±7.8)	142.1 (±10.4)		143.0 (±10.1)		141.8 (±6.7)		141.8 (±6.7)		127.8		118.6	127.8		146.6		129.8	
Fumarate	1.4 (±0.7)	1.7 (±0.4)		0.6 (±0.8)		0.3 (±0.6)		0.3 (±0.6)		1.2		nd	1.2		0.8		nd	
Glucose	2,863.8 (±99.9)	14,696.9 (±414.4)	****	1,3878.7 (±660.1)		2,997.1 (±109.0)	****	2,997.1 (±109.0)		15,098.8		3,131.3	15,098.8		3,175.0		3,175.0	
Glutamate	82.4 (±9.9)	70.0 (±6.9)	*	75.7 (±9.4)		72.9 (±6.0)		72.9 (±6.0)		27.8		26.3	27.8		29.5		30.6	
Glutamine	729.3 (±20.5)	775.5 (±10.4)	**	717.8 (±25.7)		752.0 (±21.4)		752.0 (±21.4)		806.4		802.2	806.4		807.0		809.5	
Glycerol	19.3 (±2.6)	54.7 (±5.7)	****	57.2 (±7.1)		19.9 (±3.8)	****	19.9 (±3.8)		36.2		24.8	36.2		33.6		21.0	
Glycine	200.5 (±10.8)	220.9 (±16.0)	*	203.1 (±15.2)		213.2 (±10.8)		213.2 (±10.8)		187.3		187.4	187.3		182.6		187.2	
Histidine	110.6 (±4.6)	112.4 (±7.0)		106.5 (±6.8)		106.2 (±8.4)		106.2 (±8.4)		90.2		91.2	90.2		97.3		104.5	
Isoleucine	371.7 (±23.1)	398.3 (±15.6)	*	348.6 (±22.8)		373.4 (±10.4)		373.4 (±10.4)		365.3		395.9	365.3		349.3		359.0	
Lactate	865.8 (±91.0)	1058.4 (±106.7)	**	1135.2 (±132.5)		822.6 (±75.9)	**	822.6 (±75.9)		478.9		482.9	478.9		482.4		484.0	
Leucine	397.1 (±23.9)	425.9 (±18.1)	*	405.2 (±29.9)		419.4 (±21.7)		419.4 (±21.7)		368.5		389.3	368.5		407.6		402.0	
Lysine	394.8 (±15.1)	398.4 (±15.3)		373.0 (±23.7)		387.2 (±18.3)		387.2 (±18.3)		349.6		380.4	349.6		351.8		356.8	
Methionine	86.3 (±5.1)	88.9 (±3.3)		84.4 (±5.8)		89.5 (±7.2)		89.5 (±7.2)		78.1		81.2	78.1		82.1		81.8	
Myo-Inositol	62.6 (±7.9)	87.5 (±9.5)	***	82.2 (±6.2)		63.0 (±5.4)	***	63.0 (±5.4)		74.2		73.1	74.2		72.2		72.4	
Niacinamide	17.9 (±2.6)	17.0 (±0.8)		17.0 (±1.0)		17.7 (±0.9)		17.7 (±0.9)		17.0		19.0	17.0		20.5		15.2	
Phenylalanine	197.4 (±8.4)	243.6 (±10.1)	****	213.6 (±12.6)		208.2 (±10.3)	*	208.2 (±10.3)		197.4		198.0	197.4		209.0		205.8	
Pyroglutamate	114.3 (±6.2)	142.0 (±3.2)	****	115.3 (±8.4)		132.6 (±6.9)	****	132.6 (±6.9)		142.0		121.6	142.0		120.0		135.1	
Pyruvate	30.7 (±2.1)	135.8 (±15.8)	****	146.5 (±23.0)		26.9 (±4.7)	****	26.9 (±4.7)		0.8		0.7	0.8		0.8		1.0	
Serine	179.9 (±7.5)	190.6 (±8.9)	*	172.5 (±8.2)		193.7 (±6.6)	**	193.7 (±6.6)		183.0		184.3	183.0		177.8		191.5	
Succinate	22.1 (±1.7)	26.2 (±1.5)	**	22.6 (±1.3)		24.4 (±2.0)		24.4 (±2.0)		22.3		21.1	22.3		21.4		24.5	
Threonine	402.1 (±40.5)	422.4 (±24.0)	****	382.4 (±22.2)		397.1 (±20.3)	****	397.1 (±20.3)		409.4		391.8	409.4		370.7		391.4	
Tryptophan	15.7 (±1.2)	24.0 (±1.9)	****	14.7 (±1.0)		23.4 (±2.0)	****	23.4 (±2.0)		25.2		13.4	25.2		12.0		22.0	
Tyrosine	165.2 (±26.8)	144.4 (±21.6)		138.0 (±22.4)		174.2 (±32.0)		174.2 (±32.0)		205.4		207.1	205.4		202.7		208.1	
Valine	340.1 (±25.2)	334.2 (±19.2)		311.2 (±21.5)		348.2 (±17.8)		348.2 (±17.8)		284.2		350.3	284.2		306.0		328.1	

D3 : healthy donor		25		25		5		25.0		25.0		5.0	
		Mean (±SD)	p value	Mean (±SD)	p value	Mean (±SD)	p value	Mean (±SD)	p value	Mean (±SD)	p value	Mean (±SD)	p value
Glucose (mM)	5	0.1		0		0.1		0.1		0.1		0.1	
Palmitate (mM)	0												
Acetate	42.3 (±3.3)	43.7 (±4.7)		44.2 (±2.5)		43.4 (±2.2)		43.2		13.2		15.4	
Alanine	87.3 (±2.7)	94.8 (±6.0)	*	96.5 (±2.0)	***	92.1 (±2.1)	**	32.1		32.3		32.6	
Asparagine	9.1 (±1.7)	8.0 (±2.6)		8.0 (±1.6)		7.8 (±2.0)		2.1		3.5		2.3	
Aspartate	4.8 (±1.4)	4.1 (±1.0)		3.1 (±1.1)	****	3.5 (±0.5)		5.8		2.9		4.1	
Citrate	17.1 (±1.1)	22.0 (±3.2)	*	25.4 (±1.4)	****	16.3 (±2.0)		6.3		6.9		6.4	
Formate	13.3 (±0.9)	10.4 (±0.8)	***	16.0 (±0.7)	***	17.0 (±1.1)	****	5.1		4.3		7.5	
Fructose	141.0 (±2.3)	148.8 (±6.0)	*	143.1 (±4.4)	***	138.7 (±3.5)		140.6		135.5		140.1	
Fumarate	1.2 (±0.2)	1.2 (±0.3)		1.3 (±0.3)	****	1.2 (±0.2)		nd		nd		0.7	
Glucose	2,095.5 (±59.8)	11,827.7 (±405.7)	****	10,662.7 (±313.8)	****	2,048.0 (±77.6)		2,302.9		12,852.1		11,744.3	
Glutamate	62.9 (±4.3)	58.4 (±6.5)		58.5 (±3.6)	***	63.5 (±3.8)		23.1		25.3		28.9	
Glutamine	1,314.0 (±48.9)	1,445.6 (±12.3)	***	1,403.7 (±35.7)	**	1,419.2 (±33.1)	**	1,541.3		1,544.2		1,555.1	
Glycerol	20.2 (±2.5)	30.9 (±5.1)	**	28.5 (±3.1)	**	17.4 (±9.9)		16.1		18.8		18.2	
Glycine	178.0 (±6.6)	199.1 (±17.9)	*	179.0 (±10.7)		186.1 (±10.6)		154.7		158.1		158.0	
Histidine	100.1 (±2.5)	98.5 (±4.0)		96.4 (±3.8)		97.0 (±2.1)	*	106.0		92.9		101.9	
Isoleucine	377.3 (±11.6)	391.9 (±14.7)		368.4 (±13.0)		383.4 (±14.6)		359.1		402.5		389.9	
Lactate	1,109.9 (±63.0)	13,60.9 (±153.2)	**	1,252.8 (±62.2)	**	1,044.3 (±30.2)		430.1		450.6		443.3	
Leucine	381.5 (±13.4)	407.7 (±13.3)	**	387.5 (±16.8)	**	366.9 (±16.8)		387.3		393.3		368.2	
Lysine	341.5 (±6.4)	348.1 (±14.5)		341.0 (±12.8)		347.2 (±9.3)		340.1		334.1		339.7	
Methionine	94.5 (±3.0)	96.3 (±2.7)		93.8 (±6.3)	***	93.5 (±1.7)		88.5		93.3		96.8	
Myo-inositol	71.2 (±1.3)	76.3 (±3.0)	**	76.6 (±1.6)	***	72.3 (±3.9)		54.5		69.1		68.3	
Niacinamide	15.4 (±0.9)	16.2 (±1.0)		15.1 (±1.5)		15.6 (±0.7)		14.7		17.1		16.2	
Phenylalanine	155.6 (±2.1)	163.8 (±1.4)	****	155.9 (±4.5)	***	160.9 (±2.8)	**	172.0		161.7		151.3	
Pyroglutamate	184.8 (±7.4)	260.2 (±16.9)	****	205.6 (±9.0)	**	250.3 (±12.5)	****	202.8		259.3		264.1	
Pyruvate	65.5 (±6.7)	96.3 (±15.0)	**	81.6 (±6.9)	**	63.7 (±6.2)		1.0		2.7		1.3	
Serine	177.7 (±5.4)	176.0 (±9.1)		183.2 (±5.8)		179.7 (±7.9)		172.9		178.0		195.5	
Succinate	24.7 (±1.4)	20.9 (±2.6)	*	21.4 (±1.3)	**	20.8 (±2.1)	**	21.4		21.4		23.5	
Threonine	401.0 (±3.2)	412.5 (±15.9)	****	405.5 (±19.4)	***	403.4 (±14.0)	****	366.8		391.7		437.9	
Tryptophan	8.9 (±0.7)	14.5 (±1.2)	****	9.4 (±0.9)	***	14.4 (±0.9)	****	9.2		16.3		15.8	
Tyrosine	242.3 (±7.6)	233.0 (±12.2)		223.7 (±11.7)	*	224.4 (±9.2)	**	231.1		218.7		225.5	
Valine	394.4 (±10.8)	397.9 (±17.7)		382.9 (±17.4)		395.4 (±9.7)		332.9		391.3		403.8	

D4 : healthy donor		25	5	25	5	25
Glucose (mM)	5	0.1	0	0.1	0	0.1
Palmitate (mM)	0	0.1	0	0.1	0	0.1
	Mean (±SD)	Mean (±SD)	Mean (±SD)	Mean (±SD)	p value	Medium
Acetate	38.6 (±3.3)	39.3 (±1.6)	35.3	35.3		28.4
Alanine	87.3 (±5.5)	102.0 (±5.8)	65.1	65.1	**	58.4
Asparagine	6.6 (±0.7)	6.7 (±1.3)	3.2	3.2		1.4
Aspartate	6.7 (±0.7)	8.1 (±2.3)	5.4	5.4		6.2
Citrate	24.6 (±1.7)	37.6 (±3.7)	16.1	16.1	***	16.3
Formate	23.7 (±2.2)	22.0 (±1.5)	22.9	22.9		19.3
Fructose	344.0 (±20.4)	317.0 (±13.2)	375.6	375.6	*	340.3
Fumarate	1.4 (±0.3)	1.4 (±0.3)	1.9	1.9		1.2
Glucose	3,153.2 (±217.8)	14,804.6 (±139.0)	3,595.0	3,595.0	****	15,488.6
Glutamate	78.0 (±7.9)	65.7 (±7.3)	53.9	53.9	*	42.0
Glutamine	1,793.3 (±105.3)	1,741.0 (±85.7)	2,092.4	2,092.4		1,780.4
Glycerol	35.2 (±5.6)	31.4 (±9.3)	40.9	40.9		43.5
Glycine	222.4 (±16.5)	220.6 (±10.3)	232.0	232.0		196.0
Histidine	108.9 (±10.2)	97.8 (±6.9)	112.3	112.3		110.7
Isoleucine	411.0 (±33.4)	382.3 (±11.6)	479.4	479.4		404.3
Lactate	1057.0 (±48.3)	1166.7 (±71.1)	959.6	959.6	*	916.7
Leucine	405.7 (±36.2)	382.6 (±1.9)	482.4	482.4		381.8
Lysine	310.5 (±18.7)	317.3 (±16.4)	435.1	435.1		302.0
Methionine	96.1 (±5.2)	89.3 (±2.3)	105.8	105.8	*	85.6
Myo-Inositol	94.2 (±1.9)	99.3 (±2.3)	116.3	116.3	**	80.1
Niacinamide	17.2 (±1.7)	15.8 (±0.5)	17.9	17.9		16.7
Phenylalanine	193.3 (±10.4)	187.5 (±7.2)	184.6	184.6		179.6
Pyroglutamate	252.3 (±17.9)	280.9 (±30.0)	271.2	271.2		266.6
Pyruvate	39.3 (±4.2)	98.2 (±14.5)	1.8	1.8	****	1.8
Serine	198.9 (±10.6)	180.3 (±8.3)	219.5	219.5	**	195.9
Succinate	40.4 (±3.3)	37.8 (±2.1)	48.1	48.1		40.8
Threonine	431.1 (±33.0)	362.0 (±9.3)	475.7	475.7	**	365.9
Tryptophan	6.3 (±1.1)	8.2 (±1.2)	6.0	6.0	*	8.6
Tyrosine	243.1 (±12.3)	224.4 (±9.4)	275.3	275.3	*	209.6
Valine	380.9 (±43.3)	375.7 (±36.6)	478.2	478.2		429.4

D5 : healthy donor		25		25		5		25.0		25.0		5.0		25.0		5.0	
		0.1		0		0.1		p value		Mean (±SD)		p value		0.0		0.1	
		Mean (±SD)		p value		Mean (±SD)		p value		5		0.1		Medium		25.0	
		0.1		0		0.1		0.0		0.0		0.1		0.0		0.1	
Glucose (mM)	5	25.4 (±1.4)	28.3 (±1.0)	**	26.8 (±1.0)	24.7 (±1.3)	25.9	21.2	22.7	23.7	22.7	23.7	22.7	23.7	22.7	23.7	23.7
Palmitate (mM)	0	90.5 (±4.3)	112.2 (±4.5)	****	115.4 (±5.7)	90.0 (±4.3)	75.5	69.0	76.2	70.9	76.2	70.9	76.2	70.9	76.2	70.9	70.9
		6.6 (±1.6)	5.6 (±1.7)	****	6.3 (±1.0)	6.4 (±1.3)	3.9	4.0	3.5	3.3	3.5	3.3	3.5	3.3	3.5	3.3	3.3
		5.7 (±1.1)	6.0 (±2.7)	****	5.3 (±1.4)	7.6 (±1.7)	4.7	4.0	5.8	5.5	4.0	5.5	5.8	5.5	4.0	5.5	5.5
		24.1 (±1.1)	35.4 (±2.5)	****	33.6 (±2.9)	23.0 (±1.7)	18.5	18.5	18.1	18.4	18.5	18.1	18.5	18.1	18.5	18.4	18.4
		5.1 (±0.7)	5.6 (±0.5)	****	5.2 (±0.7)	5.0 (±0.4)	6.9	5.4	7.2	7.1	5.4	7.2	7.1	7.1	5.4	7.2	7.1
		311.6 (±7.7)	318.2 (±7.8)	****	310.1 (±6.9)	315.7 (±1.8)	312.1	328.7	307.6	322.4	312.1	328.7	307.6	322.4	312.1	328.7	322.4
		1.5 (±0.1)	1.5 (±0.2)	****	1.5 (±0.3)	1.4 (±0.2)	1.6	1.5	1.3	1.8	1.5	1.3	1.5	1.3	1.5	1.3	1.8
		2,745.4 (±88.4)	12,559.6 (±202.9)	****	12,632.5 (±177.7)	2,730.8 (±40.1)	3,027.3	13,339.3	13,479.7	2,845.4	3,027.3	13,339.3	13,479.7	2,845.4	3,027.3	13,339.3	2,845.4
		72.3 (±7.0)	68.5 (±4.0)	****	67.9 (±3.5)	67.7 (±2.6)	55.1	57.1	57.7	56.7	55.1	57.1	57.7	56.7	55.1	57.1	56.7
		1,643.5 (±32.9)	1,618.9 (±20.3)	****	1,638.9 (±71.2)	1,687.9 (±62.7)	1,853.7	1,721.7	1,749.1	1,792.1	1,853.7	1,721.7	1,749.1	1,792.1	1,853.7	1,721.7	1,792.1
		50.0 (±3.6)	50.0 (±5.0)	****	57.5 (±3.4)	47.1 (±5.1)	53.2	42.1	52.7	52.4	53.2	42.1	52.7	52.4	53.2	42.1	52.7
		186.8 (±9.8)	174.4 (±3.6)	*	181.1 (±8.4)	190.6 (±5.7)	201.3	192.1	187.2	194.7	201.3	192.1	187.2	194.7	201.3	192.1	194.7
		91.7 (±3.0)	91.3 (±2.5)	****	89.0 (±3.0)	90.6 (±3.2)	96.4	94.7	91.9	94.5	96.4	94.7	91.9	94.5	96.4	94.7	94.5
		345.0 (±15.0)	396.8 (±0.0)	****	396.8 (±0.0)	396.8 (±0.0)	396.8	396.8	352.7	396.8	396.8	396.8	352.7	396.8	396.8	352.7	396.8
		986.6 (±30.4)	1,061.4 (±44.3)	****	1,085.8 (±36.6)	989.6 (±69.3)	931.4	935.9	934.9	940.0	931.4	935.9	934.9	940.0	931.4	935.9	940.0
		361.8 (±15.9)	324.3 (±9.7)	**	338.8 (±18.3)	338.7 (±29.5)	373.5	350.2	351.3	360.1	373.5	350.2	351.3	360.1	373.5	350.2	360.1
		322.1 (±13.4)	305.5 (±4.4)	*	321.0 (±7.5)	325.2 (±8.8)	332.0	314.3	326.3	344.9	332.0	314.3	326.3	344.9	332.0	314.3	344.9
		79.1 (±1.4)	76.3 (±2.3)	*	77.4 (±2.4)	76.8 (±2.0)	83.4	78.7	80.8	78.7	83.4	78.7	80.8	78.7	83.4	78.7	80.8
		120.8 (±8.2)	142.7 (±5.2)	****	140.8 (±5.4)	123.7 (±8.6)	122.5	123.0	124.7	124.5	122.5	123.0	124.7	124.5	122.5	123.0	124.5
		15.3 (±1.0)	15.0 (±0.5)	****	15.0 (±0.6)	13.9 (±0.9)	16.8	13.5	16.1	14.3	16.8	13.5	16.1	14.3	16.8	13.5	16.1
		143.6 (±3.7)	149.0 (±5.1)	****	145.5 (±3.8)	147.9 (±4.5)	148.4	150.4	147.7	155.0	148.4	150.4	147.7	155.0	148.4	150.4	155.0
		165.9 (±13.5)	194.5 (±8.3)	**	169.5 (±11.4)	185.7 (±6.5)	167.7	192.1	171.9	213.7	167.7	192.1	171.9	213.7	167.7	192.1	213.7
		55.9 (±6.7)	131.8 (±9.3)	****	130.4 (±10.2)	50.9 (±3.6)	27.7	25.9	26.0	26.9	27.7	25.9	26.0	26.9	27.7	25.9	26.9
		177.7 (±4.9)	162.5 (±7.1)	**	166.2 (±5.3)	177.4 (±10.0)	201.3	172.5	178.8	185.7	201.3	172.5	178.8	185.7	201.3	172.5	185.7
		47.7 (±2.7)	47.0 (±2.5)	*	43.7 (±1.8)	47.3 (±2.3)	51.5	46.3	45.3	45.4	51.5	46.3	45.3	45.4	51.5	46.3	45.4
		356.5 (±19.2)	326.2 (±21.3)	*	324.5 (±12.8)	354.3 (±17.5)	390.3	344.1	341.4	361.3	390.3	344.1	341.4	361.3	390.3	344.1	361.3
		3.9 (±0.6)	6.4 (±0.7)	****	3.6 (±1.2)	6.6 (±1.0)	nd	6.8	3.9	7.7	nd	6.8	3.9	7.7	nd	6.8	7.7
		198.7 (±4.9)	200.1 (±5.8)	****	192.9 (±3.8)	199.4 (±6.4)	206.2	207.1	203.4	205.1	206.2	207.1	203.4	205.1	206.2	207.1	205.1
		364.6 (±14.1)	312.1 (±8.2)	****	323.4 (±13.9)	349.6 (±11.0)	398.5	336.3	364.5	364.3	398.5	336.3	364.5	364.3	398.5	336.3	364.3

D8: healthy unsecreting donor		25		5		25.0		5.0		25.0		5.0	
Glucose (mM)	5	Mean (±SD)	p value	25	0	Mean (±SD)	p value	25	0	Mean (±SD)	p value	25.0	0.0
Palmitate (mM)	0	Mean (±SD)	p value	0.1	0.1	Mean (±SD)	p value	0.1	0.1	Mean (±SD)	p value	0.1	0.1
Acetate	33.1 (±1.6)	38.8 (±3.0)	**	36.4 (±2.6)		33.5 (±2.2)	*	28.3		30.5		26.3	
Alanine	94.5 (±6.6)	117.7 (±5.0)	****	112.7 (±7.4)		95.0 (±3.5)	****	56.5		55.3		56.5	
Asparagine	11.1 (±1.4)	8.3 (±0.7)	**	9.2 (±2.4)		11.3 (±0.8)	*	4.9		4.9		2.3	
Aspartate	5.2 (±0.2)	8.7 (±2.0)	**	6.3 (±1.1)		8.8 (±2.4)	*	5.8		5.8		5.2	
Citrate	28.6 (±2.7)	46.1 (±4.8)	****	48.4 (±1.8)		24.2 (±1.3)	****	13.4		13.4		13.8	
Formate	28.5 (±3.3)	28.1 (±1.3)		28.7 (±2.4)		32.0 (±2.3)	*	20.0		20.0		20.8	
Fructose	257.7 (±19.4)	274.6 (±14.3)		262.8 (±12.0)		273.6 (±7.2)		277.8		277.8		247.0	
Fumarate	0.8 (±0.7)	2.0 (±0.3)	**	1.3 (±1.2)		1.3 (±0.9)		nd		nd		nd	
Glucose	2,817.7 (±84.1)	1,2828.9 (±274.4)	****	1,2916.6 (±373.4)		2,929.7 (±75.3)	*	3,097.9		3,097.9		13,566.6	
Glutamate	80.0 (±3.2)	66.5 (±2.7)	****	71.6 (±5.4)		73.3 (±6.2)	**	45.6		45.6		41.3	
Glutamine	678.4 (±8.6)	764.0 (±17.6)	****	736.1 (±22.6)		726.7 (±17.5)	****	838.4		838.4		832.3	
Glycerol	29.4 (±4.5)	50.3 (±4.9)	****	60.7 (±18.8)		32.2 (±4.8)	**	35.0		35.0		32.9	
Glycine	189.0 (±6.7)	174.5 (±14.6)	*	187.9 (±9.5)		189.9 (±3.6)	*	187.4		187.4		160.3	
Histidine	94.0 (±4.4)	96.4 (±7.7)		89.5 (±7.4)		98.6 (±3.3)	*	103.0		103.0		98.3	
Isoleucine	327.0 (±11.9)	350.0 (±12.2)	**	334.7 (±14.3)		331.8 (±9.4)		352.4		352.4		343.3	
Lactate	948.1 (±57.5)	1,047.2 (±40.3)	**	1,055.1 (±34.6)		985.1 (±24.2)	**	838.4		838.4		836.0	
Leucine	362.7 (±15.6)	372.0 (±20.2)		357.4 (±15.7)		363.8 (±10.7)		382.7		382.7		367.0	
Lysine	354.2 (±9.5)	352.8 (±11.7)		345.0 (±12.4)		365.3 (±9.6)	*	337.2		337.2		319.7	
Methionine	72.9 (±2.6)	70.3 (±2.3)		68.9 (±1.3)		74.1 (±1.4)	**	68.0		68.0		68.5	
Myo-Inositol	84.8 (±5.0)	103.9 (±9.1)	***	99.3 (±5.2)		80.1 (±2.0)	***	85.4		85.4		99.2	
Niacinamide	13.6 (±1.9)	13.5 (±2.4)		15.4 (±3.2)		15.7 (±2.2)		11.5		11.5		13.9	
Phenylalanine	181.3 (±9.6)	230.7 (±11.0)	****	213.8 (±13.7)		187.9 (±7.7)	***	191.8		191.8		186.6	
Pyroglutamate	124.9 (±6.1)	155.0 (±7.0)	****	133.1 (±9.5)		145.2 (±7.2)	****	135.0		135.0		127.3	
Pyruvate	38.9 (±5.5)	145.3 (±14.4)	****	142.9 (±9.2)		39.2 (±4.6)	****	1.0		1.0		1.2	
Serine	153.0 (±2.7)	156.1 (±8.9)	*	163.6 (±1.3)		164.4 (±3.6)	****	170.8		170.8		145.8	
Succinate	38.3 (±1.6)	40.7 (±1.7)	*	38.0 (±1.8)		38.9 (±1.8)	****	39.8		39.8		37.1	
Threonine	347.3 (±14.4)	376.6 (±21.5)	*	355.3 (±12.1)		361.9 (±21.7)	**	316.4		316.4		333.2	
Tryptophan	11.1 (±1.5)	14.4 (±1.9)	**	11.7 (±1.7)		13.7 (±1.6)	**	10.6		10.6		10.3	
Tyrosine	159.6 (±12.1)	168.8 (±23.1)	*	173.0 (±17.3)		181.1 (±19.1)	*	148.4		148.4		178.0	
Valine	307.7 (±7.5)	286.9 (±16.4)	*	286.8 (±15.8)		311.4 (±4.8)	*	321.8		321.8		261.5	



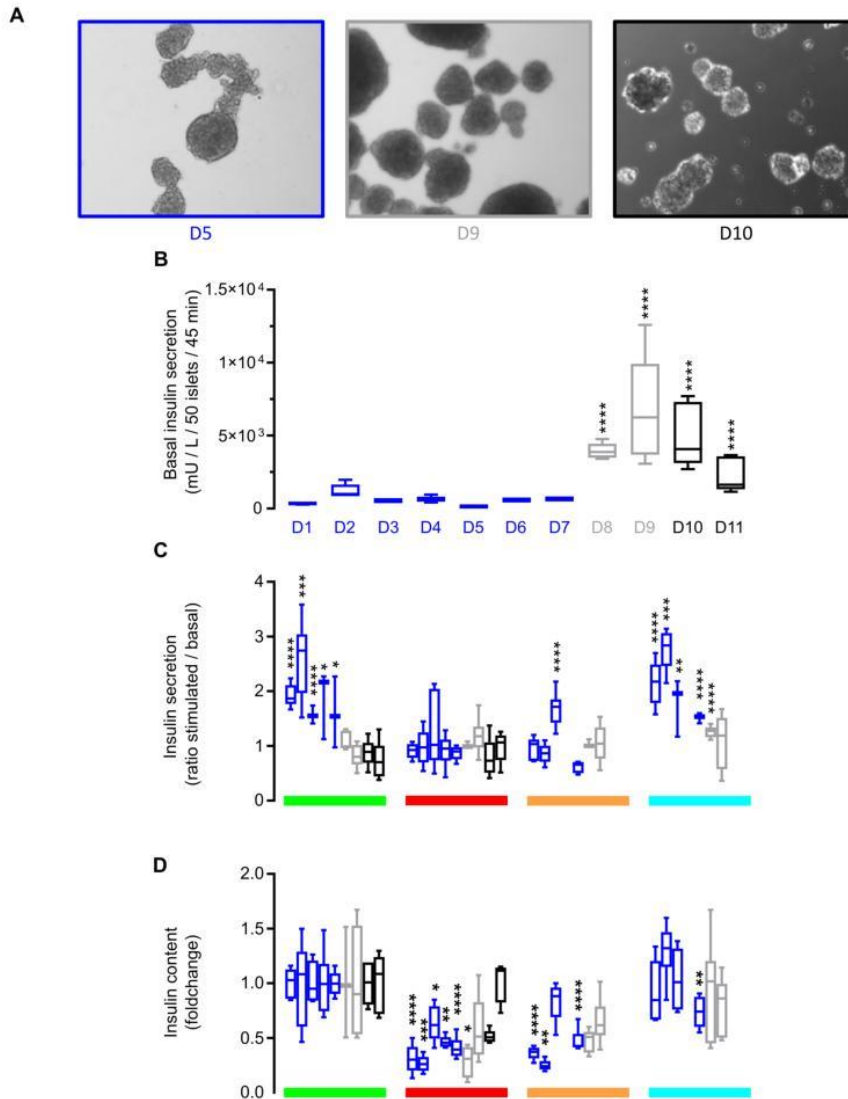
Glucose (mM) Palmitate (mM)	D10 : T2D donnor				D11 : T2D donnor			
	25		5		25		5	
	Mean (±SD)	p value	Medium	0	Mean (±SD)	p value	Medium	0
Acetate	28.7 (±2.1)	***	18.5	19.4	46.5 (±1.6)		28.6	29.9
Alanine	132.0 (±2.6)	**	61.4	62.4	110.4 (±7.2)		59.0	57.3
Asparagine	6.3 (±1.6)		nd	2.2	15.7 (±1.1)	*	2.7	nd
Aspartate	5.5 (±1.0)		3.7	2.6	6.7 (±1.1)		8.1	5.1
Citrate	27.2 (±1.2)	****	15.1	15.5	33.6 (±1.9)	****	14.4	15.2
Formate	19.9 (±0.8)		9.2	6.1	31.1 (±2.5)		19.4	19.7
Fructose	303.5 (±10.1)		310.0	305.4	344.7 (±10.9)		320.6	356.0
Fumarate	1.4 (±0.2)		1.2	1.3	1.5 (±0.2)		1.0	1.3
Glucose	1,622.3 (±57.0)	****	2,461.7	14,260.5	2,813.7 (±126.4)	****	3,201.3	15,150.2
Glutamate	113.3 (±4.7)	*	43.5	42.8	99.7 (±16.5)		45.4	52.4
Glutamine	540.0 (±28.0)	***	736.3	735.9	1,679.3 (±49.9)		1,826.8	1,781.6
Glycerol	15.5 (±2.6)	***	28.6	18.0	31.0 (±2.8)		36.1	39.6
Glycine	192.7 (±5.6)	***	186.1	184.3	236.6 (±8.8)		210.9	225.6
Histidine	92.5 (±0.9)	**	95.4	92.1	97.9 (±4.1)		93.1	100.7
Isoleucine	396.8 (±0.0)	#DIV/0!	396.8	396.8	377.1 (±6.8)		364.0	399.7
Lactate	1,851.7 (±25.2)	****	868.2	908.3	1,516.5 (±123.0)	**	821.3	898.7
Leucine	291.7 (±17.8)		366.9	336.1	371.4 (±11.0)	*	352.8	381.8
Lysine	328.6 (±12.6)	*	316.2	303.6	321.5 (±8.9)		314.6	304.3
Methionine	73.0 (±1.4)		78.9	74.5	86.7 (±2.6)		79.4	92.4
Myo-Inositol	106.1 (±4.2)	****	120.5	120.4	89.0 (±4.1)		83.7	87.8
Niacinamide	14.1 (±0.6)		14.1	13.6	15.6 (±0.5)		15.6	16.3
Phenylalanine	148.0 (±2.2)		150.6	154.5	183.4 (±5.1)	*	175.4	189.1
Pyroglutamate	105.3 (±5.4)	*	106.5	120.4	192.1 (±10.0)	**	184.1	247.9
Pyruvate	99.0 (±6.3)	****	5.8	6.3	91.1 (±9.1)	****	nd	0.6
Serine	148.6 (±5.3)	**	171.4	154.4	181.1 (±8.0)	*	181.9	177.2
Succinate	41.5 (±1.9)		38.7	44.8	39.4 (±2.5)		37.7	41.1
Threonine	345.6 (±16.9)	*	356.6	335.7	401.2 (±6.4)		377.6	355.1
Tryptophan	6.1 (±0.4)	*	6.3	6.1	4.8 (±1.0)		4.4	8.1
Tyrosine	191.1 (±4.3)		183.1	198.8	223.5 (±8.6)		227.3	219.2
Valine	304.2 (±4.6)		331.9	289.7	351.6 (±23.9)		292.6	387.2

**Table 3: Metabolite amount measured by <sup>1</sup>H-NMR in INS-1E cell supernatants after 24 h of culture in the conditions described in Fig. 2.** Metabolite concentrations in the medium placed in the same culture conditions but without cells have been deduced in the presented results. Negative results indicate consumed metabolite and positive results indicate secreted metabolites. Statistics are from *t*-tests; *p* value ≤ 0.05 is considered significant.

Glucose (mM)	INS-1E													
	10		25		25.0		10.0		10		25		10	
	Moy LG	p value	Moy HGP	p value	Moy HG	p value	Moy LGP	p value	0	0.1	0	0.1	0	0.1
Palmitate (mM)														
Acetate	180.1 (±12.4)		189.0 (±11.0)		172.4 (±7.1)		174.4 (±6.6)		29.2		41.6		38.8	
Alanine	750.7 (±28.0)	****	1,130.8 (±59.2)	****	746.3 (±44.8)		726.1 (±63.8)		78.4		98.9		96.8	
Arginine	166.1 (±32.1)		142.5 (±15.9)		206.0 (±30.9)	*	197.7 (±48.2)		1,300.2		1,349.8		1,335.1	
Asparagine	378.3 (±14.4)	***	416.4 (±8.6)	***	417.9 (±18.3)	***	413.0 (±19.6)	**	426.8		450.3		426.8	
Aspartate	126.0 (±8.9)	**	143.8 (±7.8)	**	104.8 (±9.5)	**	142.8 (±4.0)	**	173.2		201.4		178.9	
Citrate	219.7 (±16.6)	****	152.1 (±7.3)	****	168.7 (±11.4)	****	129.1 (±12.1)	****	18.3		23.7		17.7	
Formate	50.5 (±3.6)	****	70.8 (±3.1)	****	44.4 (±4.6)	*	75.7 (±4.3)	****	25.7		33.1		29.8	
Fructose	301.9 (±15.7)	**	326.3 (±9.5)	**	342.0 (±20.6)	**	342.3 (±21.6)	**	298.8		366.0		323.9	
Fumarate	3.5 (±1.0)		4.2 (±0.3)		4.2 (±0.3)		2.9 (±0.3)		1.8		2.4		1.6	
Glucose	9,659.9 (±731.1)	****	22,984.3 (±457.5)	****	24,107.4 (±518.2)	****	10,886.7 (±340.9)	**	13,142		30,435.9		28,842.7	
Glutamate	1,462.3 (±175.8)	***	1,901.6 (±47.3)	***	1,503.1 (±76.6)		1,416.8 (±132.7)		256.7		251.0		249.3	
Glutamine	2,114.9 (±122.6)	****	1,589.9 (±111.6)	****	2,290.2 (±61.9)	**	2,163.7 (±60.3)		4,350.4		4,472.2		4,040.6	
Glycine	83.2 (±6.7)	*	93.9 (±6.9)	*	85.7 (±14.4)		106.3 (±4.2)	****	132.2		166.0		151.6	
Isoleucine	361.3 (±26.8)		379.3 (±8.7)		407.0 (±16.4)	**	406.8 (±9.9)	**	401.3		506.3		450.3	
Lactate	1,048.3 (±65.9)	****	1,411.2 (±43.8)	****	1,237.4 (±54.9)	****	1,178.7 (±67.8)	**	910.3		1,042.1		977.2	
Leucine	312.9 (±19.2)		313.3 (±7.8)		354.0 (±5.1)	**	353.1 (±15.1)	**	412.6		471.0		438.0	
Methionine	56.2 (±5.6)		53.8 (±2.0)		64.3 (±2.3)	**	67.5 (±3.4)	**	100.3		114.4		107.4	
Phenylalanine	58.1 (±2.0)		48.2 (±2.6)		61.8 (±1.6)	**	61.9 (±2.3)	**	95.7		113.4		102.6	
Pyroglutamate	290.0 (±9.9)		304.8 (±22.3)		280.2 (±24.2)		368.8 (±35.4)	***	430		581.2		432.9	
Pyruvate	881.6 (±62.2)	****	2,230.5 (±226.6)	****	2,191.3 (±258.4)	****	622.7 (±22.8)	****	19.4		20.7		22.0	
Serine	153.6 (±10.0)	****	97.6 (±8.4)	****	165.8 (±11.1)		156.6 (±7.2)		381		331.4		327.3	
Succinate	57.6 (±3.5)		59.8 (±2.1)		58.4 (±2.8)		62.3 (±4.9)		49.4		61.9		61.9	
Threonine	127.2 (±15.3)		136.9 (±18.3)		149.1 (±13.3)	*	153.0 (±25.9)	*	224.4		195.8		171.3	
Tryptophan	13.6 (±2.5)	*	10.8 (±0.7)	*	10.8 (±1.8)	*	13.0 (±1.6)	*	20.4		20.2		20.0	
Tyrosine	108.5 (±5.5)	***	95.5 (±2.9)	***	115.9 (±4.7)	*	113.8 (±4.3)	*	158.8		163.8		157.4	
Valine	131.3 (±8.7)	**	118.5 (±3.0)	**	143.5 (±6.4)	*	142.5 (±3.2)	*	227.8		246.6		233.3	
myo-Inositol	334.8 (±26.7)		352.6 (±5.0)		356.4 (±11.0)		358.3 (±20.8)		322.3		388.8		372.4	

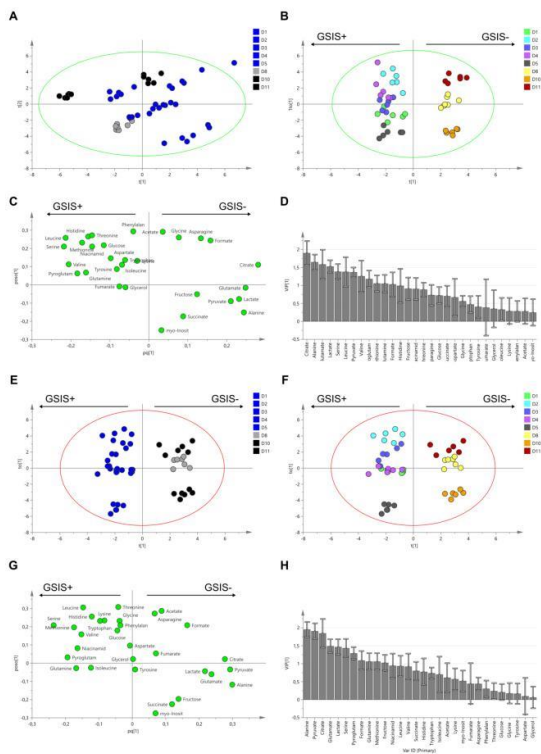
## Supplementary Figures

■ D1 - D7 Healthy human islets     ■ 5 mM glucose, 0 mM palmitate     ■ 25 mM glucose, 0 mM palmitate  
■ D8, D9 Dysfunctional human islets     ■ 25 mM glucose, 0.1 mM palmitate     ■ 5 mM glucose, 0.1 mM palmitate  
■ D10, D11 TD2 human islets



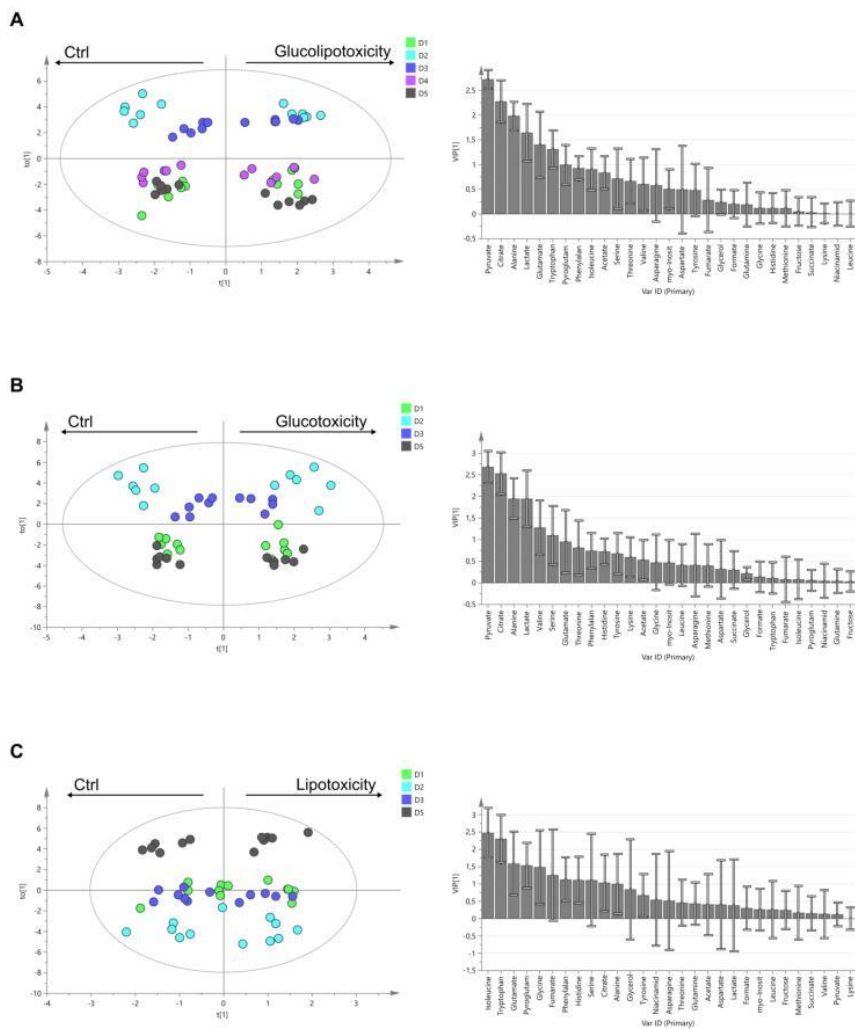
**Fig. S1, related to Fig. 1A and 1B: Individual islet batch behavior regarding insulin secretion response after glucolipototoxicity**

(A) Phase image of representative isolated human islets from donor D5, D9 and D10 in culture.  
 (B) Boxplots showing quantification of insulin secretion during first phase of GSIS after 48 h of culture in control medium (D1 to D9 are non-diabetic donors, D10 and D11 are type 2 diabetic donors). \*\*\*\* $p < 0.0001$  to compare dysfunctional and TD2 islets with mean of healthy islets.  
 (C, D) Boxplots showing individual Stimulated/Basal insulin secretion (C) and corresponding cellular insulin content (IC) (D) of human pancreatic islets during GSIS after 48 h of culture with indicated glucose and palmitate concentration ( $n = 6$  insulin quantification per batch of islets). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



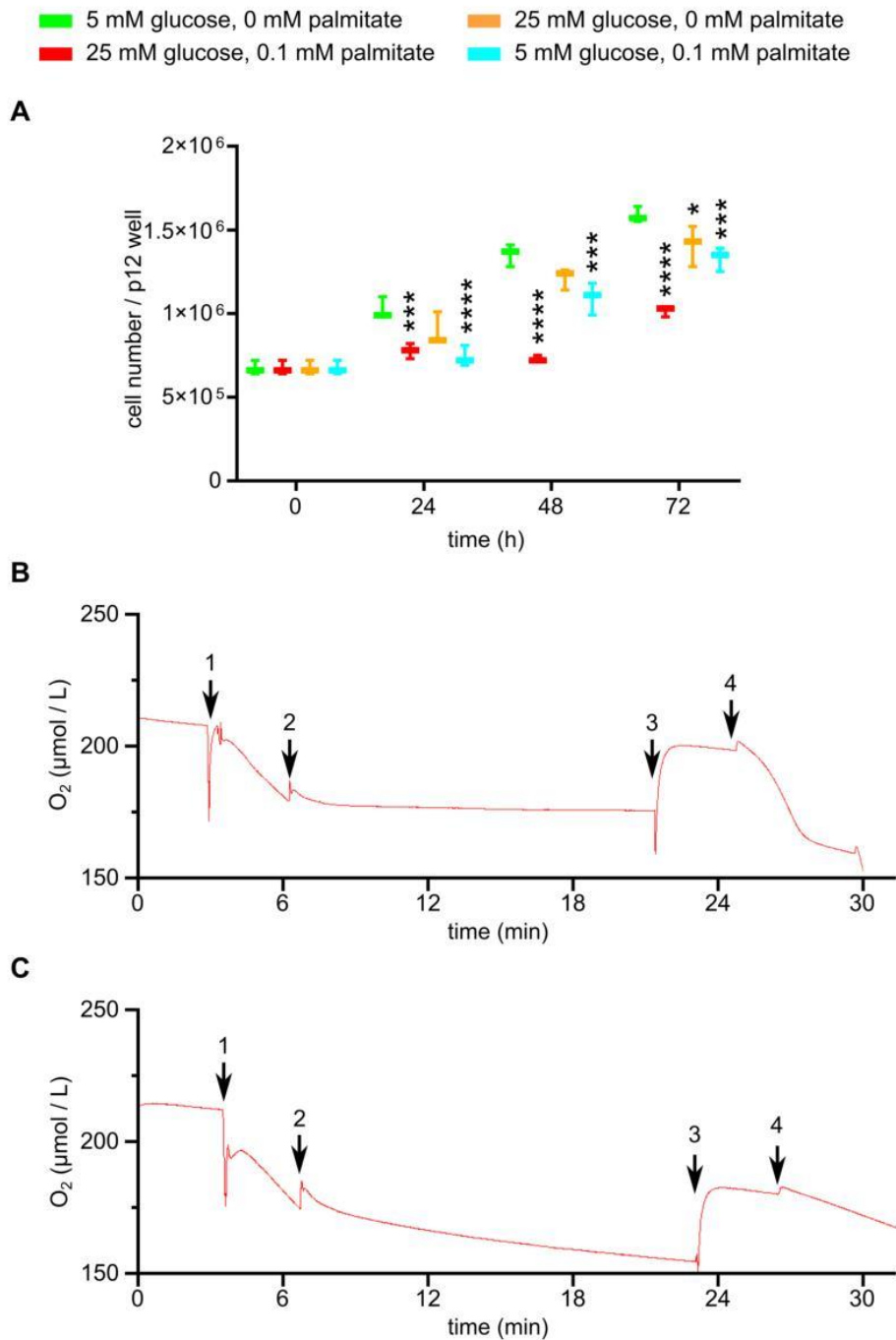
**Fig. S2, related to Fig. 1C: Multivariate analyses to compare metabolic signature of islets under control and glucolipotoxicity conditions**

(A) Principal component analysis (PCA) scores plot of data from 1 H NMR metabolomics analysis of healthy functional islets (blue), unfunctional islets (grey) and DT2 donor islets (black) after 48 h in control condition ( $N = 49$ ,  $R^2 = 0.8$ , and  $Q^2 = 0.531$  on 5 principal components). GSIS positive and negative islets cannot be discriminated. (B) Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) scores plot of data from 1 H NMR metabolomics analysis of islets after 48 h in control condition shows the separation achieved according to GSIS status ( $p\text{-value} = 9.25 \times 10^{-21}$ ). Colours correspond to different donors as show on the panel. The 3-class model is based on 1 predictive component and 2 orthogonal components ( $R^2(X) = 0.489$ ,  $R^2(Y) = 0.94$ , and  $Q^2 = 0.914$ ) (C) OPLS-DA loading plot associated to the score plot presented in B. Each point represents the group association of each variable (metabolite). (D) Plot of variables importance for the projection (VIP) that summarizes the importance of each variables on the PLS-DA model. The VIP ranking priority was according to the VIP values. Metabolites with  $VIP > 1$  are empirically considered has having a significant impact on the model discrimination power. (E-F) Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) scores plot of data from 1 H NMR metabolomics analysis of islets after 48 h in glucolipotoxicity condition shows the separation achieved according to GSIS status ( $p\text{-value} = 9.25 \times 10^{-21}$ ). (E) Healthy functional islets are represented in blue, unfunctional islets in grey and DT2 donor islets in black. (F) Colours correspond to different donors as show on the panel. The 3-class model is based on 1 predictive component and 2 orthogonal components ( $N = 49$ ,  $R^2(X) = 0.681$ ,  $R^2(Y) = 0.923$ , and  $Q^2 = 0.871$ ). (G) OPLS-DA loading plot associated to the score plot presented in E-F. Each point represents the group association of each variable (metabolite). (H) Plot of variables importance for the projection (VIP) that summarizes the importance of each variables on the PLS-DA model. The VIP ranking priority was according to the VIP values. Metabolites with  $VIP > 1$  are empirically considered has having a significant impact on the model discrimination power. All ellipses show in the models represent the Hotelling T2 with 95% confidence. Each data point represents one islet supernatant sample, and the distance between points in the plot indicates the similarity between samples.



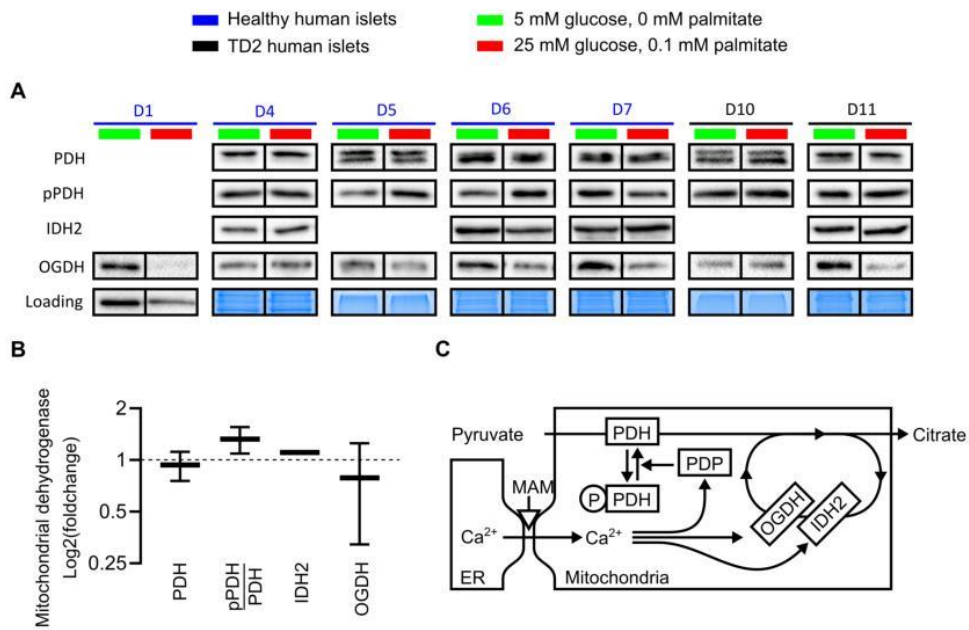
**Fig. S3: Multivariate analyses to compare metabolic signature of healthy functional islets under control versus glucolipototoxicity (A), glucotoxicity (B), lipotoxicity (C)**

(A-C) Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) scores plot of data from  $^1\text{H}$  NMR metabolomics analysis of islets after 48 h in control versus glucolipototoxicity (A), glucotoxicity (B) or lipotoxicity (C) condition. They all show the separation achieved according to treatment ((A)  $p$ -value =  $9.25 \times 10^{-21}$ , ((B)  $p$ -value =  $9.25 \times 10^{-21}$ , ((C)  $p$ -value =  $9.25 \times 10^{-21}$ ). Colours correspond to different donors as show on the panel. The 3-class model is based on 1 predictive component and 2 orthogonal components ((A)  $N = 60$ ,  $R^2(X) = 0.512$ ,  $R^2(Y) = 0.898$ , and  $Q^2 = 0.869$ , (B)  $N = 47$ ,  $R^2(X) = 0.632$ ,  $R^2(Y) = 0.877$ , and  $Q^2 = 0.846$ , (C)  $N = 48$ ,  $R^2(X) = 0.599$ ,  $R^2(Y) = 0.767$ , and  $Q^2 = 0.53$ .) and corresponding variables importance for the projection (VIP) that summarizes the importance of each variables on the PLS-DA model. The VIP ranking priority was according to the VIP values. Metabolites with  $\text{VIP} > 1$  are empirically considered has having a significant impact on the model discrimination power. All ellipses showed in the models represent the Hotelling  $T^2$  with 95% confidence. Each data point represents one islet supernatant sample, and the distance between points in the plot indicates the similarity between samples.



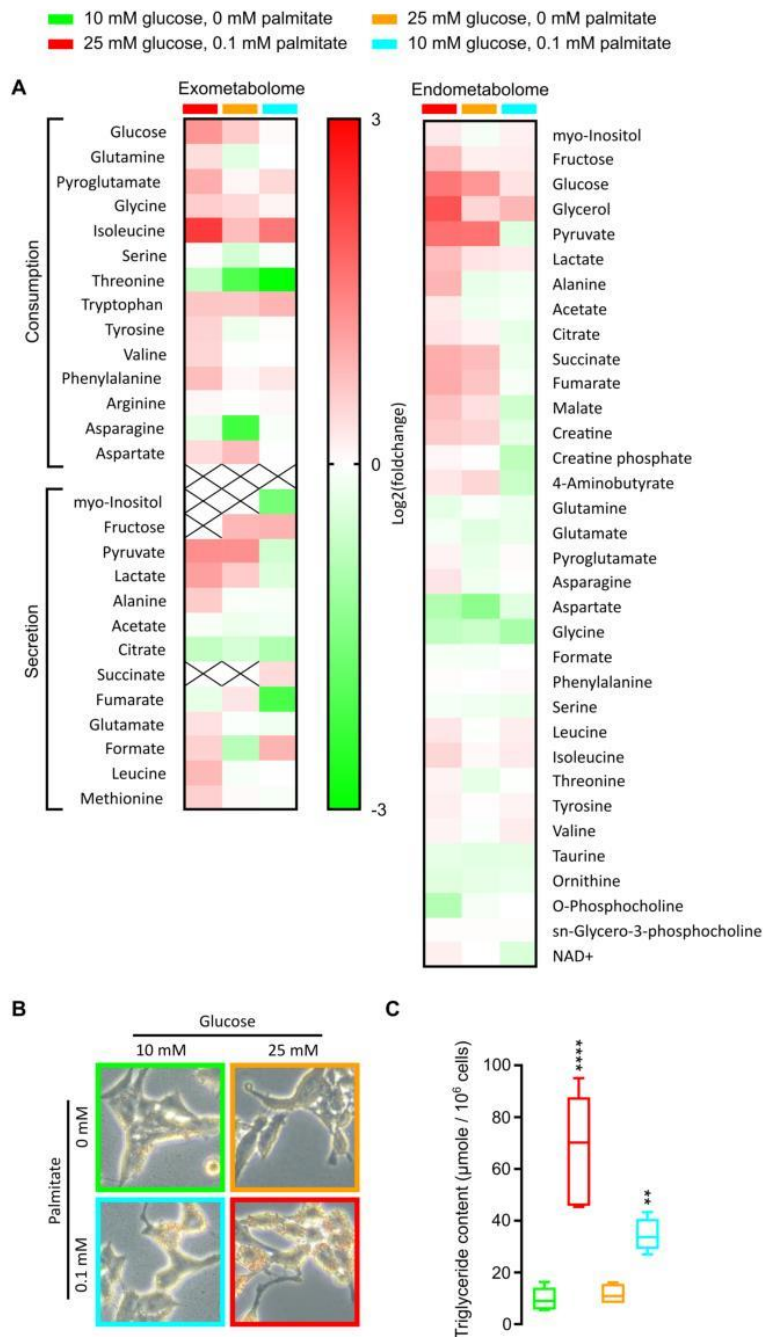
**Fig. S4: INS-1E cell viability and permeabilized INS-1E cell oxygen consumption**

(A) Cumulative cell survival as a function of time in control, gluco- lipo- and glucolipototoxicity condition concentrations obtained by trypan blue cell counting assay. (B, C) Representative traces of mitochondrial respiration in permeabilized INS-1E cells after 48 h in control (A) and glucolipotoxic (B) mediums. Compounds were added as indicated: 1: cells, 2: digitonin, 3: pyruvate, 4: ADP.



**Fig. S5, related to Fig. 1I: Mitochondrial dehydrogenase expression and mitochondrial-endoplasmic reticulum contact quantification.**

(A) Representative Western blot related to Fig. 1I. (B) Quantitative analyses of PDH, pPDH, IDH2, OGDH in human pancreatic islets of TD2 islets (D10-D11) cultured 48 h under control or glucolipotoxicity. (C) A proposed model to link mitochondria- endoplasmic reticulum interaction (MAM), mitochondrial dehydrogenase and mitochondrial metabolite secretome related to this work and our previous results<sup>24</sup>.



**Fig. S6, related to Fig. 2: INS-1E exometabolome and endometabolome profiling and comparison between gluco-, lipo- and glucolipotoxicity.**

(A) Log<sub>2</sub> Fold change of extracellular (left) and intracellular (right) metabolite concentrations of INS-1E cells after 48 h in corresponding glucose and palmitate conditions compared to control one. (B) Representative bright field images of INS-1E cells after 48 h in corresponding toxicity. Lipid droplets were stained with oil red O solution. (C) Boxplots showing intracellular triglyceride concentration normalized by cell number after 48 h incubation with indicated culture conditions. Error bars represent standard deviation. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .





# Discussion

Malgré le problème de santé publique posé par le DT2, les compréhensions sur le développement de cette maladie sont encore lacunaires. Il est donc important d'analyser et comprendre les mécanismes de perte de fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique dans un contexte proche de la physiopathologie du DT2 afin de définir de nouveaux biomarqueurs et potentielles cibles thérapeutiques.

Les fonctions principales de la cellule  $\beta$  pancréatique sont la synthèse et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. La synthèse est un processus continu alors que sa sécrétion nécessite un stimulus : le glucose. C'est pour cela qu'il est important de bien différencier une augmentation aiguë et chronique de glucose. En effet, une augmentation aiguë de glucose sera perçue comme un stimulus, induisant la sécrétion d'insuline de la cellule  $\beta$ . Alors qu'une augmentation chronique sera perçue au départ comme étant un stimulus, mais le prolongement de celui-ci mènera à l'adaptation de la cellule  $\beta$  pancréatique causant sa perte de fonction. Le temps de la chronicité est encore discuté aujourd'hui et les conditions choisies lors de cette thèse sont expliquées ci-après. Cette perte de fonction sera caractérisée non seulement par un défaut de synthèse de l'insuline mais aussi par un défaut de réponse au stimulus permettant la sécrétion d'insuline.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons choisi de caractériser les conséquences d'une gluco- et/ou lipotoxicité chronique mimant le DT2 sur les consommations et sécrétions métaboliques d'îlots pancréatiques humains et d'une lignée d'insulinome de rat INS-1E afin de définir des voies métaboliques altérées par la toxicité. De plus la caractérisation de ces voies métaboliques pourra permettre de comprendre leurs implications dans la perte de fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique.

Pour se faire nous avons posé les problématiques suivantes :

- Quelles sont les conditions requises pour induire une altération chronique de la sécrétion d'insuline par la glucolipotoxicité ?
- Existe-t-il une corrélation entre les modifications du métabolisme et la perte de fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques en condition de gluco- et/ou lipotoxicité ?
- Si oui, quelles voies métaboliques sont impactées et les quelles sont corrélées au défaut de la fonction cellulaire ?

- Existe-t-il un lien entre les altérations du métabolisme observé lors de cette étude et les altérations des MAMs dans les conditions de gluco- et/ou lipotoxicité ?
- Le modèle de glucolipotoxicité est-il cohérent avec ce que l'on observe dans les îlots pancréatiques de donneurs diabétiques ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la glucolipotoxicité induit un défaut de synthèse et de sécrétion de l'insuline. L'impact de cette toxicité sur les cellules  $\beta$  pancréatiques est bien défini mais ses caractéristiques, comme la concentration de glucose et de lipides, le type de lipides et la durée de cette toxicité, ne sont pas clairement établies. Afin de mener à bien nos expérimentations, nous nous sommes basés sur des travaux déjà réalisés par notre équipe. Le temps de traitement ainsi que la concentration de glucose afin d'obtenir un défaut de synthèse et sécrétion d'insuline due à la glucotoxicité ont été définis à 48h et 25mM de glucose dans la continuité des travaux de Dingreville *et al.* (Dingreville et al., 2019). La lipotoxicité quant à elle a été définie de manière expérimentale, en utilisant le palmitate à l'instar de l'étude de Thivolet *et al.* (Thivolet et al., 2017). La concentration de palmitate nécessaire pour obtenir une lipotoxicité a été définie en réalisant des courbes de croissance cellulaire de cellules INS-1E avec différentes concentrations de palmitate. La concentration de 0,1mM de palmitate a été choisie car celle-ci avait un impact mineur sur la croissance des cellules, nous permettant de réaliser nos expériences de métabolisme. C'est cette concentration qui a été choisie pour les îlots pancréatiques humains car elle est aussi dans l'échelle de ce que l'on peut observer dans la littérature (Thivolet et al.).

La quantification d'insuline intracellulaire des îlots pancréatiques humains montre des résultats similaires en gluco- et en glucolipotoxicité décrivant un défaut de GSIS et de quantité intracellulaire d'insuline lors de ces traitements. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, en effet la glucotoxicité diminue la sécrétion d'insuline des îlots humains (Andersson and Hellerström, 1972; Dingreville et al., 2019) ainsi que la quantité intracellulaire d'insuline (Göhring et al., 2014). De plus, les granules d'insuline matures sont diminués de 50% dans les cellules  $\beta$  de donneurs diabétiques (Marchetti et al., 2004). Une des explications possible est la plus faible vitesse de conversion de proinsuline en insuline lors d'hyperglycémie (Rhodes and Alarcón, 1994) due notamment au stress du RE décrit lors de la gluco- et/ou lipotoxicité (Boslem et al., 2013; van Raalte and Diamant, 2011). La lipotoxicité seule n'a pas

d'impact, ni sur la quantité intracellulaire d'insuline, ni sur le GSIS des îlots pancréatiques humains. Ce résultat n'est pas surprenant car comme le signale Weir *et al.* dans une revue critique sur le réel impact de la lipotoxicité, lorsque la quantité d'acides gras exposée aux îlots n'est pas supraphysiologique, on observe que peu de changements sur la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques (Weir, 2020). Ces expériences, en accord avec la littérature et nos exigences expérimentales permettent de valider nos traitements.

La réalisation d'études métabolomiques sur les surnageants de culture lors de ces différents traitements m'a permis de quantifier 30 métabolites dans ces échantillons après 48h de culture et de réaliser un corrélogramme permettant d'observer les métabolites corrélés ou anticorrélés avec la fonction des îlots humains dans toutes les différentes conditions. Le tableau de corrélation obtenu nous a tout d'abord confirmé la corrélation entre le contenu en insuline des îlots et leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, cette représentation nous a permis d'isoler différents métabolites significativement anticorrélés avec la synthèse et/ou le stockage de l'insuline en plus de sa sécrétion en réponse au glucose des îlots pancréatiques humains : l'alanine, le citrate, le glucose, le pyruvate et le lactate. Le glucose étant un métabolite ajouté en gluco- et glucolipotoxicité, il est normal que celui-ci ressorte anticorrélé avec la fonction des îlots pancréatiques altérée dans ces conditions. En revanche nous nous sommes plus intéressés au pyruvate, lactate, alanine et citrate. Ces métabolites mettent en avant deux voies métaboliques : la glycolyse et le cycle du citrate, décrites dans la littérature comme étant nécessaires à la sécrétion régulée d'insuline (Henquin, 2000). Lorsque nous regardons les quantifications absolues de ces métabolites, nous remarquons que ceux-ci sont sécrétés significativement plus en condition de gluco- et glucolipotoxicité. La sursécrétion de pyruvate, alanine et lactate met en avant un défaut d'entrée des carbones provenant de la glycolyse dans la mitochondrie lors de ces conditions alors que la sursécrétion de citrate met en avant une dérégulation du cycle du citrate.

En vue de comprendre ce qui peut mener à la sécrétion de ces métabolites, nous avons choisi de questionner des enzymes clés des voies métaboliques évoquées pouvant mener à l'accumulation et la sécrétion de ces métabolites. En effet, une des explications à ce phénomène est une possible modification de régulation ou d'expression enzymatique. La réalisation de western blots (WB) sur la PDH totale et sa forme phosphorylée en condition

contrôle et glucolipotoxicité ont permis de mettre en avant une tendance à la diminution de la quantité globale de cette enzyme ainsi qu'une augmentation du ratio pPDH/PDH. La forme phosphorylée de cette enzyme étant sa forme inactive, la diminution de la quantité de cette enzyme et l'augmentation de sa forme inactive traduisent toutes deux une diminution de son activité dans les conditions de glucolipotoxicité. Nous avons aussi questionné l'OGDH et l'IDH2 dans les îlots humains, deux enzymes mitochondriales impliquées dans la dégradation du citrate. La quantité d'IDH2 dans les îlots pancréatiques humains est inchangée contrairement à celle de l'OGDH, diminuée dans trois des quatre donneurs testés. Ces trois enzymes étant activées directement ou indirectement par le  $Ca^{2+}$ , les perturbations calciques mitochondriales déjà observées par notre équipe peuvent accentuer la diminution de leur activité lors d'une gluco- ou une glucolipotoxicité (Dingreville et al., 2019). Une étude de transcriptomique récente réalisée dans des conditions similaires aux nôtres ont mis en avant une forte augmentation de la transcription de l'ARNm de PDK4, une enzyme phosphorylant la PDH, en condition de glucolipotoxicité sur les îlots d'un des deux donneurs étudiés dans ces conditions, nous permettant d'appuyer l'hypothèse d'une diminution de l'activité de PDH par sa phosphorylation. Cette même étude ne montre pas de différences significative sur l'expression des ARNm des IDHs et de l'OGDH dans ces conditions (Jimenez-Sánchez et al., 2020). La diminution de l'activité de ces enzymes peut induire un blocage, induisant l'accumulation de leurs substrats. Le pyruvate étant le substrat de la PDH et la glycolyse débridée des cellules  $\beta$  pancréatiques induisent son accumulation dans ces cellules lors de la glucolipotoxicité. Le pyruvate est alors soit directement sécrété par la cellule ou est converti par des voies branchées en lactate et alanine qui à leur tour s'accumulent et finissent par être sécrétés. Des études de RMN utilisant l'hyperpolarisation montrent que le pyruvate, l'alanine et le lactate s'accumulent dans le cytoplasme des cellules INS-1E dans les premières heures de glucotoxicité appuyant cette hypothèse (Malinowski et al., 2020). La diminution de l'activité d'OGDH et des IDHs mitochondriales peut être une explication de l'accumulation et la sécrétion de citrate observées en condition de glucolipotoxicité. L'absence de son accumulation dans le cytoplasme des INS-1E dans cette même condition est discutée plus loin.

Nous avons réalisé la même démarche expérimentale sur les cellules de la lignée murine INS-1E. La quantification d'insuline intracellulaire est très similaire à celle observée dans les îlots pancréatiques humains. En effet la gluco- et la glucolipotoxicité induisent une diminution

significative de l'insuline intracellulaire. Le GSIS en revanche est différent. La sécrétion d'insuline est diminuée en condition de glucotoxicité seule mais est augmentée en lipotoxicité et ce phénotype est exacerbé en glucolipotoxicité. Shapiro et son équipe avaient déjà observé ce phénomène lors de la glucolipotoxicité sur le modèle INS-1E, concluant sur l'effet de l'activation du récepteur GPR40 par le palmitate augmentant la quantité de  $Ca^{2+}$  intracytosolique exacerbant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Shapiro et al., 2005).

Des études métabolomiques similaires ont été réalisées sur ce modèle en quantifiant 28 métabolites par échantillons après 48h de culture dans les différentes conditions. Le corrélogramme réalisé met en avant l'absence de corrélation entre la quantité d'insuline intracellulaire et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans le modèle INS-1E. De plus, le pyruvate, l'alanine et le lactate sont toujours anticorrélés avec la quantité intracellulaire d'insuline mais plus le citrate. Afin de mieux comprendre les différences entre le modèle humain et le modèle murin, nous avons observé les consommations et sécrétion de ces différents métabolites par les INS-1E dans les différentes conditions. Le pyruvate, l'alanine et le lactate sont tout comme dans le modèle humain sursécrétés. Mais à l'inverse, le citrate est lui dans toutes les conditions moins sécrété que dans la condition contrôle. Cette observation est parfaitement cohérente avec l'accumulation de ces trois métabolites en bout de glycolyse observée par Malinowski et son équipe dans les premières heures de glucotoxicité (Malinowski et al., 2020).

Afin de comprendre si cette différence venait d'une quantité inchangée d'OGDH et IDH2, nous avons quantifié ces deux protéines et avons observé une diminution significative de l'OGDH dans les deux conditions de gluco- et glucolipotoxicité ne nous permettant pas d'expliquer la diminution de la sécrétion de citrate dans ce modèle. De plus, l'étude de la respiration mitochondriale après 48h de culture en condition de glucolipotoxicité montre une diminution de la consommation d'oxygène, signifiant une probable perturbation du cycle du citrate. Cette observation est cohérente avec la littérature (Dingreville et al., 2019) et les perturbations calciques dans ces conditions peuvent permettre d'expliquer d'une part par la diminution de l'activité d'enzymes mitochondriales telles que les IDHs mitochondriales (Aogaichi et al., 1980) et l'OGDH (Qi et al., 2011) ainsi que d'autre part par une diminution de l'activité de la chaîne

respiratoire (Glancy et al., 2013; Territo et al., 2000). Convaincu d'une diminution de la quantité et de l'activité de l'OGDH, nous avons voulu tester l'hypothèse d'une fuite mitochondriale de citrate similaire au îlots humains tout en gardant à l'esprit que celui-ci peut être utilisé par une autre voie métabolique.

Pour en savoir plus, nous avons choisi d'étudier l'homéostasie des métabolites intracellulaires, appelée endométabolome, des INS-1E dans ces mêmes conditions par  $^1\text{H}$ -RMN, quantifiant 35 métabolites. L'endométabolome nous permet de mettre en évidence l'accumulation de pyruvate, alanine et lactate en cohérence avec l'étude de glucotoxicité de Malinowski *et al.* (Malinowski et al., 2020) en montrant aussi une absence d'accumulation du citrate quelque soit la condition étudiée. Indépendamment, le glycérol semble être augmenté dans ces conditions mais pourtant celui-ci n'est pas observé sous forme libre dans les surnageants. Cette observation nous a permis d'émettre l'hypothèse que dans les INS-1E, à défaut d'être accumulé et sécrété à l'instar des îlots humains, le citrate est détourné vers la voie de la lipogénèse *de novo*, utilisant ensuite le glycérol pour former des triglycérides.

Nous avons testé cette hypothèse en quantifiant les gouttelettes lipidiques, les triglycérides intracellulaires ainsi que les triglycérides sécrétés du modèle INS-1E dans les différentes conditions de gluco- et/ou lipotoxicité. Tous ces paramètres apparaissaient comme significativement augmentés par rapport à la condition contrôle. Afin de confirmer que cette augmentation venait d'une utilisation du citrate dans la lipogénèse *de novo* et non d'acides gras libres pour former des triglycérides, nous avons quantifié les enzymes de la voie de la synthèse de lipides : ACLY, ACC et FAS. ACLY et FAS voient leurs expressions augmentées en conditions de gluco- et glucolipotoxicité, contrairement à ACC qui est augmentée seulement en condition de glucotoxicité. Ces trois enzymes étaient déjà rapidement questionnées par Haythorne *et al.* observant des résultats similaires aux nôtres sur des souris diabétiques (Haythorne et al., 2019). La lipotoxicité ne semble avoir aucun impact sur l'expression de ces enzymes. Nous pouvons donc en conclure que les triglycérides produits en condition de lipotoxicité proviennent majoritairement de l'absorption de palmitate par les cellules INS-1E. En condition de glucotoxicité, le citrate est bien utilisé par la voie de lipogénèse *de novo* dans les cellules INS-1E permettant la formation de triglycérides comme déjà observée par Nyblom (Nyblom, 2007). Cette situation est de plus d'autant plus probable dans le modèle murin par



rapport au modèle humain car comme observé par MacDonald et son équipe, l'activité et l'expression de l'ACLY sont 3 à 4 fois plus élevées dans le modèle murin par rapport au modèle humain (MacDonald et al., 2011). Dans la condition de glucolipotoxicité, la présence de palmitate empêche la surexpression d'ACC comme déjà décrit dans cette lignée (Brun et al., 1997) empêchant la forte synthèse d'acides gras *de novo*. Mais le citrate ne s'accumulant pas dans les INS-1E en glucolipotoxicité nous pouvons en conclure que celui-ci est utilisé par une autre voie métabolique. Cette situation me permet d'émettre l'hypothèse que la diminution de l'utilisation des citrates dans la lipogénèse *de novo* forcerait les carbones des citrates sécrétés par la mitochondrie dans le cytoplasme à retourner dans la mitochondrie par une des navettes mitochondriales présentées précédemment (Jitrapakdee et al., 2010) contournant potentiellement le blocage de l'OGDH. Le contournement de l'OGDH permettant finalement aux carbones du citrate de renouveler les cofacteurs mitochondriaux, alimentant ainsi la phosphorylation oxydative et permettant la sécrétion d'insuline des cellules INS-1E en réponse au glucose.

Finalement, les deux modèles présentés ici montrent une fuite de carbones sous différentes formes, les rendant inutilisables par la mitochondrie en vue de régénérer les cofacteurs mitochondriaux lors de la toxicité au glucose. Cette situation ne permet plus le renouvellement de l'ATP par la phosphorylation oxydative nécessaire à la synthèse et la sécrétion régulée d'insuline en réponse au glucose. La première fuite est observée en bout de glycolyse, sous forme de pyruvate, alanine et lactate, directement sécrétés par les îlots pancréatiques humains et les cellules INS-1E. La deuxième fuite de carbone est au niveau mitochondrial sous forme de citrate sécrété dans le cytoplasme de la cellule. Les cellules  $\beta$  nécessitant de nombreux cycles et navettes, d'autres carbones peuvent aussi être perdus sous cette forme avant d'être soit sécrétés, comme c'est le cas pour le citrate des îlots humains, soit métabolisés par d'autres voies métaboliques comme la lipogénèse *de novo* pour les cellules INS-1E. La lipotoxicité ne semble pas avoir d'effet sur la fonction de synthèse et la sécrétion d'insuline de nos deux modèles mais celle-ci est tout de même fortement délétaire pour la viabilité des cellules INS-1E.

Un autre aspect de ma thèse traitait des îlots humains diabétiques de type 2. En effet nous voulions comprendre si la glucolipotoxicité pendant 48h sur des îlots humains de donneurs

sains permettait de reproduire un métabolisme d'îlots diabétiques. De plus nous voulions savoir si le métabolisme des îlots humains de donneurs diabétiques de type 2 était altérable par la glucolipotoxicité. Les GSIS et le contenu en insuline des îlots pancréatiques humains issus de diabétiques sont très similaires à ceux des îlots issus de donneurs sains en condition de glucolipotoxicité, présentant une absence de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et peu d'insuline intracellulaire, sans changement lors de la glucolipotoxicité. Des analyses statistiques multivariées mettent en avant une différenciation du métabolisme des îlots diabétiques par rapport aux îlots sains en condition contrôle. L'alanine, le pyruvate, le citrate ainsi que le lactate font partis des métabolites permettant cette discrimination. Ces métabolites sont tous sursécrétés en condition de glucolipotoxicité nous permettant de conclure que les îlots diabétiques humains souffrent des mêmes dérégulations de déshydrogénases mitochondriales que les îlots humains issus de donneurs sains en condition de glucolipotoxicité. Malgré cela, l'étude par WB de l'expression de la PDH, l'OGDH et l'IDH2 ne permettent pas de conclure sur d'éventuelles modifications d'expression ou de régulation de ces enzymes en condition de glucolipotoxicité. Ces observations sont encore à confirmer car elles ont été réalisées sur des îlots provenant de seulement deux donneurs diabétiques de type 2.

De plus, l'étude d'îlots pancréatiques humains issus de donneurs sains nous a permis de découvrir de potentiels bio marqueurs de dysfonctions de ce modèle. En effet, nous avons étudié aussi 2 préparations d'îlots issus de donneurs sains non fonctionnels (ne répondant pas au GSIS). Ces 2 îlots représentent 22% des îlots issus de donneurs sains. Ce chiffre est dans la norme de ce qui a été décrit par Kayton *et al.* où ils estiment qu'environ 25% des îlots pancréatiques humains isolés ne sécrètent pas d'insuline en réponse au glucose (Kayton et al., 2015). Pour l'instant, il est admis que les îlots dysfonctionnels ne peuvent être discriminés par les centres d'isolation des îlots (Kayton et al., 2015). Malgré tout, la prédiction de la perte de fonction de ces îlots semble être possible par notre étude. Tout d'abord, lors du GSIS en condition contrôle, on observe que les îlots non fonctionnels ainsi que les îlots issus de donneurs diabétiques sécrètent significativement plus d'insuline avant stimulation au glucose que les îlots fonctionnels utilisés lors de notre étude. De plus, les profils métabolomiques en condition contrôle de ces îlots permettent aussi de les discriminer des îlots fonctionnels par l'utilisation de statistiques multivariées supervisées. De manière intéressante, les sécrétions

de citrate et pyruvate de ces îlots non fonctionnels sont comparables à celles des îlots fonctionnels en condition contrôle. En condition de glucolipotoxicité en revanche, les sécrétions de ces métabolites sont similaires à celles des îlots diabétiques dans cette même condition. Le nombre de préparations d'îlots testées ne permet malheureusement pas de conclure sur la significativité de ces observations mais la répétition de ces expériences pourrait permettre de définir de nouveaux biomarqueurs fonctionnels et métaboliques permettant un gain de temps et d'îlots lors des tests avant greffe.

En conclusion, des études combinant l'utilisation de modulateurs des MAMs et la métabolomique permettraient de confirmer le fait que ces contacts interorganites sont un point crucial de la régulation du métabolisme des cellules  $\beta$ , impliqués dans leurs fonctions de synthèse et sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, des études utilisant un modèle sans cellule, en combinant des isolats mitochondriaux et cytoplasmiques de cellules INS-1E ayant subies une gluco- et/ou lipotoxicité permettraient de définir si seule une mitochondrie fonctionnelle est nécessaire au renouvellement normal d'ATP ou si des facteurs cytoplasmiques sont aussi impliqués dans la perte de fonction des cellules  $\beta$ . Pour finir, selon moi, la démocratisation de la métabolomique et l'amélioration des outils d'analyse aboutiraient à un bon technologique majeur, accélérant de nombreux champs de recherches et répondant aux interrogations de nombreux autres.



# Références

- Abbassi-Ghadi, N., Kumar, S., Huang, J., Goldin, R., Takats, Z., Hanna, G.B., 2013. Metabolomic profiling of oesophago-gastric cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 49, 3625–3637. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.07.004>
- Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., Wakil, S.J., 2005. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12011–12016. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505714102>
- 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>
- Abulizi, A., Cardone, R.L., Stark, R., Lewandowski, S.L., Zhao, X., Hillion, J., Ma, L., Sehgal, R., Alves, T.C., Thomas, C., Kung, C., Wang, B., Siebel, S., Andrews, Z.B., Mason, G.F., Rinehart, J., Merrins, M.J., Kibbey, R.G., 2020. Multi-Tissue Acceleration of the Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Cycle Improves Whole-Body Metabolic Health. *Cell Metab* 32, 751-766.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.006>
- Acosta-Montaño, P., Rodríguez-Velázquez, E., Ibarra-López, E., Frayde-Gómez, H., Mas-Oliva, J., Delgado-Coello, B., Rivero, I.A., Alatorre-Meda, M., Aguilera, J., Guevara-Olaya, L., García-González, V., 2019. Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Proteostasis and its Impact on Insulin Secretion. *Cells* 8, E884. <https://doi.org/10.3390/cells8080884>
- Adeyinka, A., Kondamudi, N.P., 2021. Hyperosmolar Hyperglycemic Nonketotic Coma, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Ahmed, A.M., 2002. History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* 23, 373–378.
- Akoka, S., Barantin, L., Trierweiler, M., 1999. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Anal Chem* 71, 2554–2557. <https://doi.org/10.1021/ac981422i>
- Alberts, B.M., Cartier, N., Butor, C., Kahn, A., 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*, 3ème éd. française, [trad. de la 3ème américaine parue en 1994]. ed. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- Alcazar, O., Tiedge, M., Lenzen, S., 2000. Importance of lactate dehydrogenase for the regulation of glycolytic flux and insulin secretion in insulin-producing cells. *Biochem J* 352 Pt 2, 373–380.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541–6551.
- Alosekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepolis, K., D’Auria, J., Ewald, J., C Ewald, J., Fraser, P.D., Giavalisco, P., Hall, R.D., Heinemann, M., Link, H., Luo, J., Neumann, S., Nielsen, J., Perez de Souza, L., Saito, K., Sauer, U., Schroeder, F.C., Schuster, S., Siuzdak, G., Skirycz, A., Sumner, L.W., Snyder, M.P., Tang, H., Tohge, T., Wang, Y., Wen, W., Wu, S., Xu, G., Zamboni, N., Fernie, A.R., 2021. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods* 18, 747–756. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>

- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N., 2014. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism* 63, 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.04.003>
- Ammälä, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O., Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 1993. Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 472, 665–688. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019966>
- Andersson, A., Hellerström, C., 1972. Metabolic characteristics of isolated pancreatic islets in tissue culture. *Diabetes* 21, 546–554. <https://doi.org/10.2337/diab.21.2.s546>
- 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>
- Antinozzi, P.A., Ishihara, H., Newgard, C.B., Wollheim, C.B., 2002. Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues. *J Biol Chem* 277, 11746–11755. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108462200>
- Antinozzi, P.A., Segall, L., Prentki, M., McGarry, J.D., Newgard, C.B., 1998. Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion. A re-evaluation of the long-chain acyl-CoA hypothesis. *J Biol Chem* 273, 16146–16154. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16146>
- Aogaichi, T., Evans, J., Gabriel, J., Plaut, G.W., 1980. The effects of calcium and lanthanide ions on the activity of bovine heart nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 204, 350–356. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90043-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90043-0)
- Aponte, A.M., Phillips, D., Hopper, R.K., Johnson, D.T., Harris, R.A., Blinova, K., Boja, E.S., French, S., Balaban, R.S., 2009. Use of (32)P to study dynamics of the mitochondrial phosphoproteome. *J Proteome Res* 8, 2679–2695. <https://doi.org/10.1021/pr800913j>
- Aragón, F., Karaca, M., Novials, A., Maldonado, R., Maechler, P., Rubí, B., 2015. Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochim Biophys Acta* 1850, 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.005>
- Archive of “Transactions of the American Ophthalmological Society”. [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/308/> (accessed 10.5.21).
- Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nishi, N., Schally, A.V., 1975. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science* 189, 1007–1009. <https://doi.org/10.1126/science.56779>
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., Wollheim, C.B., 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167–178. <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1370150>
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., Ashcroft, S.J., 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312, 446–448. <https://doi.org/10.1038/312446a0>
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2012. Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160–1171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010>

- Azevedo-Martins, A.K., Lortz, S., Lenzen, S., Curi, R., Eizirik, D.L., Tiedge, M., 2003. Improvement of the mitochondrial antioxidant defense status prevents cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation in insulin-producing cells. *Diabetes* 52, 93–101. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.93>
- Baker, E.N., Blundell, T.L., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Hodgkin, D.M., Hubbard, R.E., Isaacs, N.W., Reynolds, C.D., 1988. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 319, 369–456. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0058>
- Balaban, R.S., 2009. The role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1334–1341. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.05.011>
- Balaban, R.S., 2006. Maintenance of the metabolic homeostasis of the heart: developing a systems analysis approach. *Ann N Y Acad Sci* 1080, 140–153. <https://doi.org/10.1196/annals.1380.013>
- Balaban, R.S., 2002. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 34, 1259–1271. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2082>
- Balcerczyk, A., Damblon, C., Elena-Herrmann, B., Panthu, B., Rautureau, G.J.P., 2020. Metabolomic Approaches to Study Chemical Exposure-Related Metabolism Alterations in Mammalian Cell Cultures. *Int J Mol Sci* 21, E6843. <https://doi.org/10.3390/ijms21186843>
- Bales, J.R., Higham, D.P., Howe, I., Nicholson, J.K., Sadler, P.J., 1984. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin Chem* 30, 426–432.
- Banting, F.G., Best, C.H., 1963. 4. The Internal Secretion of the Pancreas, in: *Selected Papers of Charles H. Best*. University of Toronto Press, pp. 42–60. <https://doi.org/10.3138/9781442656918-008>
- Bastidas, J.A., Couse, N.F., Yeo, C.J., Schmiege, R.E., Andersen, D.K., Gingerich, R.L., Zinner, M.J., 1990. The effect of pancreatic polypeptide infusion on glucose tolerance and insulin response in longitudinally studied pancreatitis-induced diabetes. *Surgery* 107, 661–668.
- Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M.D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2, 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- Bedinger, D.H., Adams, S.H., 2015. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Mol Cell Endocrinol* 415, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.013>
- Bedoya, F.J., Meglasson, M.D., Wilson, J.M., Matschinsky, F.M., 1985. Radiometric oil well assay for glucokinase in microscopic structures. *Anal Biochem* 144, 504–513. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90147-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90147-2)
- Bedoya, F.J., Wilson, J.M., Ghosh, A.K., Finegold, D., Matschinsky, F.M., 1986. The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. *Diabetes* 35, 61–67. <https://doi.org/10.2337/diab.35.1.61>
- Beeharry, N., Chambers, J.A., Green, I.C., 2004. Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis* 9, 599–607. <https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000038039.82506.0c>

- Bennett, D.L., Bailyes, E.M., Nielsen, E., Guest, P.C., Rutherford, N.G., Arden, S.D., Hutton, J.C., 1992. Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *J Biol Chem* 267, 15229–15236.
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., Jonas, J.-C., 2012. The molecular mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Mol Cell Endocrinol* 364, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.08.003>
- Bentley, G.A., Brange, J., Derewenda, Z., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Markussen, J., Wilkinson, A.J., Wollmer, A., Xiao, B., 1992. Role of B13 Glu in insulin assembly. The hexamer structure of recombinant mutant (B13 Glu-->Gln) insulin. *J Mol Biol* 228, 1163–1176. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90323-c](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90323-c)
- Berger, C., Zdziebło, D., 2020. Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflugers Arch* 472, 1249–1272. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02383-4>
- Bernardi, P., Rasola, A., Forte, M., Lippe, G., 2015. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev* 95, 1111–1155. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>
- Bernhard, W., Haguénau, 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* 37, 281–300.
- Berts, A., Ball, A., Dryselius, G., Gylfe, E., Hellman, B., 1996. Glucose stimulation of somatostatin-producing islet cells involves oscillatory Ca<sup>2+</sup> signaling. *Endocrinology* 137, 693–697. <https://doi.org/10.1210/endo.137.2.8593819>
- Bing, F.C., 1971. The history of the word “metabolism.” *J Hist Med Allied Sci* 26, 158–180. <https://doi.org/10.1093/jhmas/xxvi.2.158>
- Bingol, K., 2018. Recent Advances in Targeted and Untargeted Metabolomics by NMR and MS/NMR Methods. *High Throughput* 7, E9. <https://doi.org/10.3390/ht7020009>
- Bingol, K., Brüsweiler, R., 2015. Two elephants in the room: new hybrid nuclear magnetic resonance and mass spectrometry approaches for metabolomics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18, 471–477. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000206>
- Björntorp, P., Sjöström, L., 1978. Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism* 27, 1853–1865. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(78\)80004-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(78)80004-3)
- Bliss, M., 2019. *The Discovery of Insulin: The Twenty-fifth Anniversary Edition, The Discovery of Insulin*. University of Toronto Press. <https://doi.org/10.3138/9781442621480>
- Bogan, J.S., 2012. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. *Annu Rev Biochem* 81, 507–532. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060109-094246>
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Müller, 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>
- Boslem, E., Weir, J.M., MacIntosh, G., Sue, N., Cantley, J., Meikle, P.J., Biden, T.J., 2013. Alteration of endoplasmic reticulum lipid rafts contributes to lipotoxicity in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 288, 26569–26582. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489310>
- Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A., Doniach, D., 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279–1283. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)90140-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)90140-8)



- Bränström, R., Efendić, S., Berggren, P.O., Larsson, O., 1998. Direct inhibition of the pancreatic beta-cell ATP-regulated potassium channel by alpha-ketoisocaproate. *J Biol Chem* 273, 14113–14118. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14113>
- Braun, M., Ramracheya, R., Amisten, S., Bengtsson, M., Moritoh, Y., Zhang, Q., Johnson, P.R., Rorsman, P., 2009. Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. *Diabetologia* 52, 1566–1578. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1382-z>
- 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., Lavandero, 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>
- Breier, M., Wahl, S., Prehn, C., Fugmann, M., Ferrari, U., Weise, M., Banning, F., Seissler, J., Grallert, H., Adamski, J., Lechner, A., 2014. Targeted metabolomics identifies reliable and stable metabolites in human serum and plasma samples. *PLoS One* 9, e89728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089728>
- 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., Ashcroft, F.M., 2016.  $\beta$ -Cell dysfunction in diabetes: a crisis of identity? *Diabetes Obes Metab* 18 Suppl 1, 102–109. <https://doi.org/10.1111/dom.12732>
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., Powers, A.C., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53, 1087–1097. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6684.2005>
- Broca, C., Brennan, L., Petit, P., Newsholme, P., Maechler, P., 2003. Mitochondria-derived glutamate at the interplay between branched-chain amino acid and glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 545, 167–172. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00526-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00526-x)
- Brown, L.J., Longacre, M.J., Hasan, N.M., Kendrick, M.A., Stoker, S.W., Macdonald, M.J., 2009. Chronic reduction of the cytosolic or mitochondrial NAD(P)-malic enzyme does not affect insulin secretion in a rat insulinoma cell line. *J Biol Chem* 284, 35359–35367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040394>
- Brownlee, M., 2003. A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112, 1788–1790. <https://doi.org/10.1172/JCI20501>
- Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., Lee, W.M., 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 34, 223–227. <https://doi.org/10.1042/BST20060223>
- Brun, T., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B.E., Prentki, M., 1997. Long-chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes* 46, 393–400. <https://doi.org/10.2337/diab.46.3.393>
- Brun, T., Li, N., Jourdain, A.A., Gaudet, P., Duhamel, D., Meyer, J., Bosco, D., Maechler, P., 2015. Diabetogenic milieus induce specific changes in mitochondrial transcriptome and differentiation of human pancreatic islets. *Hum Mol Genet* 24, 5270–5284. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv247>

- 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>
- Brun, T., Scarcia, P., Li, N., Gaudet, P., Duhamel, D., Palmieri, F., Maechler, P., 2013. Changes in mitochondrial carriers exhibit stress-specific signatures in INS-1E $\beta$ -cells exposed to glucose versus fatty acids. *PLoS One* 8, e82364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082364>
- Butler, A.E., Dhawan, S., Hoang, J., Cory, M., Zeng, K., Fritsch, H., Meier, J.J., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2016.  $\beta$ -Cell Deficit in Obese Type 2 Diabetes, a Minor Role of  $\beta$ -Cell Dedifferentiation and Degranulation. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 523–532. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3566>
- 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. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102>
- 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>
- Caicedo, J.M., Benjachareowong, S., Chou, E., Ruderman, N.B., Ido, Y., 2005. Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes: roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, and ceramide. *Diabetes* 54, 1838–1845. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1838>
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.-H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C.B., Birnbaum, M.J., Hallows, K.R., Fosskett, J.K., 2010. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria. *Cell* 142, 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.007>
- Carobbio, S., Ishihara, H., Fernandez-Pascual, S., Bartley, C., Martin-Del-Rio, R., Maechler, P., 2004. Insulin secretion profiles are modified by overexpression of glutamate dehydrogenase in pancreatic islets. *Diabetologia* 47, 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1306-2>
- Carter, J.D., Dula, S.B., Corbin, K.L., Wu, R., Nunemaker, C.S., 2009. A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment. *Biol Proced Online* 11, 3. <https://doi.org/10.1007/s12575-009-9021-0>
- 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>
- Caumo, A., Luzi, L., 2004. First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E371–385. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00139.2003>
- Cen, J., Sargsyan, E., Bergsten, P., 2016. Fatty acids stimulate insulin secretion from human pancreatic islets at fasting glucose concentrations via mitochondria-dependent and -independent mechanisms. *Nutr Metab (Lond)* 13, 59. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0119-5>

- Cerasi, E., Luft, R., 1967. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol (Copenh)* 55, 278–304. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0550278>
- Chaudhry, R., Varacallo, M., 2021. Biochemistry, Glycolysis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Chen, S., Borowiak, M., Fox, J.L., Maehr, R., Osafune, K., Davidow, L., Lam, K., Peng, L.F., Schreiber, S.L., Rubin, L.L., Melton, D., 2009. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 5, 258–265. <https://doi.org/10.1038/nchembio.154>
- 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, S., Ogawa, A., Ohneda, M., Unger, R.H., Foster, D.W., McGarry, J.D., 1994. More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes* 43, 878–883. <https://doi.org/10.2337/diab.43.7.878>
- Cherrington, A.D., Edgerton, D., Sindelar, D.K., 1998. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* 41, 987–996. <https://doi.org/10.1007/s001250051021>
- Cherrington, A.D., Sindelar, D., Edgerton, D., Steiner, K., McGuinness, O.P., 2002. Physiological consequences of phasic insulin release in the normal animal. *Diabetes* 51 Suppl 1, S103–108. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.s103>
- Christensen, A.A., Gannon, M., 2019. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 19, 81. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>
- Civelek, V.N., Deeney, J.T., Shalosky, N.J., Tornheim, K., Hansford, R.G., Prentki, M., Corkey, B.E., 1996. Regulation of pancreatic beta-cell mitochondrial metabolism: influence of Ca<sup>2+</sup>, substrate and ADP. *Biochem J* 318 ( Pt 2), 615–621. <https://doi.org/10.1042/bj3180615>
- Clark, A., Wells, C.A., Buley, I.D., Cruickshank, J.K., Vanhegan, R.I., Matthews, D.R., Cooper, G.J., Holman, R.R., Turner, R.C., 1988. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9, 151–159.
- Cline, G.W., Lepine, R.L., Papas, K.K., Kibbey, R.G., Shulman, G.I., 2004. <sup>13</sup>C NMR isotopomer analysis of anaplerotic pathways in INS-1 cells. *J Biol Chem* 279, 44370–44375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311842200>
- Cline, G.W., Petersen, K.F., Krssak, M., Shen, J., Hundal, R.S., Trajanoski, Z., Inzucchi, S., Dresner, A., Rothman, D.L., Shulman, G.I., 1999. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341, 240–246. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410404>
- Cnop, M., Abdulkarim, B., Bottu, G., Cunha, D.A., Igoillo-Esteve, M., Masini, M., Turatsinze, J.-V., Griebel, T., Villate, O., Santin, I., Bugliani, M., Ladriere, L., Marselli, L., McCarthy, M.I., Marchetti, P., Sammeth, M., Eizirik, D.L., 2014. RNA sequencing identifies dysregulation of the human pancreatic islet transcriptome by the saturated fatty acid palmitate. *Diabetes* 63, 1978–1993. <https://doi.org/10.2337/db13-1383>
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., Eizirik, D.L., 2005. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 54 Suppl 2, S97–107. [https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl\\_2.s97](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.s97)

- Cohen, G., Shamni, O., Avrahami, Y., Cohen, O., Broner, E.C., Filippov-Levy, N., Chatgililoglu, C., Ferreri, C., Kaiser, N., Sasson, S., 2015. Beta cell response to nutrient overload involves phospholipid remodelling and lipid peroxidation. *Diabetologia* 58, 1333–1343. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3566-z>
- Cohen, P., 2006. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 867–873. <https://doi.org/10.1038/nrm2043>
- Conrad, E., Stein, R., Hunter, C.S., 2014. Revealing transcription factors during human pancreatic  $\beta$  cell development. *Trends Endocrinol Metab* 25, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.013>
- Cook, D.L., Hales, C.N., 1984. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311, 271–273. <https://doi.org/10.1038/311271a0>
- Coore, H.G., Hellman, B., Täljedal, I.-B., 1970. PREPARATION AND PROPERTIES OF ISOLATED MAMMALIAN INSULIN STORAGE GRANULES, in: *The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets*. Elsevier, pp. 385–395. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-015844-0.50044-4>
- Coppieters, K.T., Wiberg, A., Amirian, N., Kay, T.W., von Herrath, M.G., 2011. Persistent glucose transporter expression on pancreatic beta cells from longstanding type 1 diabetic individuals. *Diabetes Metab Res Rev* 27, 746–754. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1246>
- Courant, F., Antignac, J.-P., Dervilly-Pinel, G., Le Bizec, B., 2014. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* 14, 2369–2388. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400255>
- Craig, T.J., Ashcroft, F.M., Proks, P., 2008. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. *J Gen Physiol* 132, 131–144. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709874>
- Crook, A.A., Powers, R., 2020. Quantitative NMR-Based Biomedical Metabolomics: Current Status and Applications. *Molecules* 25, E5128. <https://doi.org/10.3390/molecules25215128>
- Cruz, W.S., Kwon, G., Marshall, C.A., McDaniel, M.L., Semenkovich, C.F., 2001. Glucose and insulin stimulate heparin-releasable lipoprotein lipase activity in mouse islets and INS-1 cells. A potential link between insulin resistance and beta-cell dysfunction. *J Biol Chem* 276, 12162–12168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010707200>
- 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>
- Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M., 1968. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83, 572–584. <https://doi.org/10.1210/endo-83-3-572>
- Cushman, S.W., Wardzala, L.J., 1980. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255, 4758–4762.
- Czech, M.P., 2017. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med* 23, 804–814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>
- Da Silva Xavier, G., 2018. The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine* 7, 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2006. Production of pancreatic hormone-

- expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392–1401. <https://doi.org/10.1038/nbt1259>
- Davis, I.C., Ahmadizadeh, I., Randell, J., Younk, L., Davis, S.N., 2017. Understanding the impact of hypoglycemia on the cardiovascular system. *Expert Rev Endocrinol Metab* 12, 21–33. <https://doi.org/10.1080/17446651.2017.1275960>
- de Groot, M., de Haan, B.J., Keizer, P.P.M., Schuurs, T.A., van Schilfgaarde, R., Leuvenink, H.G.D., 2004. Rat islet isolation yield and function are donor strain dependent. *Lab Anim* 38, 200–206. <https://doi.org/10.1258/002367704322968885>
- De Meyts, P., 2008. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci* 33, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.06.003>
- 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 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>
- Deeney, J.T., Gromada, J., Høy, M., Olsen, H.L., Rhodes, C.J., Prentki, M., Berggren, P.O., Corkey, B.E., 2000. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem* 275, 9363–9368. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9363>
- Deeney, J.T., Köhler, M., Kubik, K., Brown, G., Schultz, V., Tornheim, K., Corkey, B.E., Berggren, P.O., 2001. Glucose-induced metabolic oscillations parallel those of Ca<sup>2+</sup> and insulin release in clonal insulin-secreting cells. A multiwell approach to oscillatory cell behavior. *J Biol Chem* 276, 36946–36950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105056200>
- DeFronzo, R.A., Tobin, J.D., Andres, R., 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237, E214–E223. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1979.237.3.E214>
- Deluca, H.F., Engstrom, G.W., 1961. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47, 1744–1750. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.11.1744>
- Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.-M., Frank, A., Velidedeoglu, E., Desai, N.M., Koeberlein, B., Wolf, B., Barker, C.F., Naji, A., Matschinsky, F.M., Markmann, J.F., 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53, 624–632. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.624>
- Denton, R.M., 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
- Denton, R.M., McCormack, J.G., 1990. Ca<sup>2+</sup> as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu Rev Physiol* 52, 451–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.52.030190.002315>
- Denton, R.M., McCormack, J.G., 1980. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 119, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80986-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80986-0)

- Denton, R.M., McCormack, J.G., Edgell, N.J., 1980. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ruthenium red on the Ca<sup>2+</sup>-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochem J* 190, 107–117. <https://doi.org/10.1042/bj1900107>
- Denton, R.M., Richards, D.A., Chin, J.G., 1978. Calcium ions and the regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J* 176, 899–906. <https://doi.org/10.1042/bj1760899>
- Devaux, P.G., Horning, M.G., Horning, E.C., 1971. Benzyloxime Derivatives of Steroids. A New Metabolic Profile Procedure for Human Urinary Steroids Human Urinary Steroids. *Analytical Letters* 4, 151–160. <https://doi.org/10.1080/00032717108059686>
- Devin, A., Rigoulet, M., 2007. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C52–58. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00208.2006>
- Dias, D.A., Jones, O.A.H., Beale, D.J., Boughton, B.A., Benheim, D., Kouremenos, K.A., Wolfender, J.-L., Wishart, D.S., 2016. Current and Future Perspectives on the Structural Identification of Small Molecules in Biological Systems. *Metabolites* 6, 46. <https://doi.org/10.3390/metabo6040046>
- 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)
- Dinclaux, M., Cahoreau, E., Millard, P., Létisse, F., Lippens, G., 2020. Increasing field strength versus advanced isotope labeling for NMR-based fluxomics. *Magn Reson Chem* 58, 305–311. <https://doi.org/10.1002/mrc.4988>
- Dingreville, F., Panthu, B., Thivolet, C., Ducreux, S., Gouriou, Y., Pesenti, S., Chauvin, M.-A., Chikh, K., Errazuriz-Cerda, E., Van Coppenolle, F., Rieusset, J., Madec, A.-M., 2019. Differential Effect of Glucose on ER-Mitochondria Ca<sup>2+</sup> Exchange Participates in Insulin Secretion and Glucotoxicity-Mediated Dysfunction of  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 68, 1778–1794. <https://doi.org/10.2337/db18-1112>
- Dobbins, R.L., Chester, M.W., Stevenson, B.E., Daniels, M.B., Stein, D.T., McGarry, J.D., 1998. A fatty acid- dependent step is critically important for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion. *J Clin Invest* 101, 2370–2376. <https://doi.org/10.1172/JCI1813>
- Dodson, G., Steiner, D., 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 8, 189–194. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(98\)80037-7](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80037-7)
- Dolce, V., Cappello, A.R., Capobianco, L., 2014. Mitochondrial tricarboxylate and dicarboxylate-tricarboxylate carriers: from animals to plants. *IUBMB Life* 66, 462–471. <https://doi.org/10.1002/iub.1290>
- Dona, A.C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E.A., Varshavi, D., Veselkov, K., Everett, J.R., 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Comput Struct Biotechnol J* 14, 135–153. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.02.005>
- Duchen, M.R., 2000. Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 28, 339–348. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0170>
- Dumez, J.-N., Milani, J., Vuichoud, B., Bornet, A., Lalande-Martin, J., Tea, I., Yon, M., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., Frydman, L., Bodenhausen, G., Jannin, S., Giraudeau, P., 2015. Hyperpolarized NMR of plant and cancer cell extracts at natural abundance. *Analyst* 140, 5860–5863. <https://doi.org/10.1039/c5an01203a>

- Dunaway, G.A., Kasten, T.P., Sebo, T., Trapp, R., 1988. Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem J* 251, 677–683. <https://doi.org/10.1042/bj2510677>
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J.D., Halsall, A., Haselden, J.N., Nicholls, A.W., Wilson, I.D., Kell, D.B., Goodacre, R., Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium, 2011. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 6, 1060–1083. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P., Combourieu, B., 2010. Biodegradation pathway of mesotrione: Complementarities of NMR, LC–NMR and LC–MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* 81, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.07.017>
- Eaton, S. Boyd, Eaton, Stanley B., 2017. Physical Inactivity, Obesity, and Type 2 Diabetes: An Evolutionary Perspective. *Res Q Exerc Sport* 88, 1–8. <https://doi.org/10.1080/02701367.2016.1268519>
- Eguchi, K., Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., Nagai, R., 2012. Saturated fatty acid and TLR signaling link  $\beta$  cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab* 15, 518–533. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.023>
- Eguchi, K., Nagai, R., 2017. Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest* 127, 14–23. <https://doi.org/10.1172/JCI88877>
- Ehses, 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., Homo-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>
- Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., Cnop, M., 2008. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29, 42–61. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0015>
- Eknoyan, G., 2019. A Historical Overview of Diabetic Nephropathy, in: Roelofs, J.J., Vogt, L. (Eds.), *Diabetic Nephropathy: Pathophysiology and Clinical Aspects*. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93521-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93521-8_1)
- Emwas, A.-H., Luchinat, C., Turano, P., Tenori, L., Roy, R., Salek, R.M., Ryan, D., Merzaban, J.S., Kaddurah-Daouk, R., Zeri, A.C., Nagana Gowda, G.A., Raftery, D., Wang, Y., Brennan, L., Wishart, D.S., 2015. Standardizing the experimental conditions for using urine in NMR-based metabolomic studies with a particular focus on diagnostic studies: a review. *Metabolomics* 11, 872–894. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0746-7>
- Emwas, A.-H., Roy, R., McKay, R.T., Tenori, L., Saccenti, E., Gowda, G.A.N., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., Wishart, D.S., 2019. NMR Spectroscopy for Metabolomics Research. *Metabolites* 9, E123. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
- Erlandsen, S.L., Hegre, O.D., Parsons, J.A., McEvoy, R.C., Elde, R.P., 1976. Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell. *J Histochem Cytochem* 24, 883–897. <https://doi.org/10.1177/24.7.60437>
- Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y.,

- Kadowaki, T., 1999. Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283, 981–985. <https://doi.org/10.1126/science.283.5404.981>
- Eto, K., Yamashita, T., Hirose, K., Tsubamoto, Y., Ainscow, E.K., Rutter, G.A., Kimura, S., Noda, M., Iino, M., Kadowaki, T., 2003. Glucose metabolism and glutamate analog acutely alkalinize pH of insulin secretory vesicles of pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E262–271. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00542.2002>
- Fang, M., Ivanisevic, J., Benton, H.P., Johnson, C.H., Patti, G.J., Hoang, L.T., Uritboonthai, W., Kurczyk, M.E., Siuzdak, G., 2015. Thermal Degradation of Small Molecules: A Global Metabolomic Investigation. *Anal Chem* 87, 10935–10941. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03003>
- Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., Prentki, M., 2000. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49, 718–726. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.5.718>
- Feng, X., Zhang, L., Xu, S., Shen, A.-Z., 2020. ATP-citrate lyase (ACLY) in lipid metabolism and atherosclerosis: An updated review. *Prog Lipid Res* 77, 101006. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101006>
- Fernandez, C., Fransson, U., Hallgard, E., Spégel, P., Holm, C., Krogh, M., Wårell, K., James, P., Mulder, H., 2008. Metabolomic and proteomic analysis of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). *J Proteome Res* 7, 400–411. <https://doi.org/10.1021/pr070547d>
- Ferrer, J., Benito, C., Gomis, R., 1995. Pancreatic islet GLUT2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. *Diabetes* 44, 1369–1374. <https://doi.org/10.2337/diab.44.12.1369>
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48, 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Flamez, D., Berger, V., Kruhøffer, M., Orntoft, T., Pipeleers, D., Schuit, F.C., 2002. Critical role for cataplerosis via citrate in glucose-regulated insulin release. *Diabetes* 51, 2018–2024. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2018>
- Fletcher, B., Gulanick, M., Lamendola, C., 2002. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs* 16, 17–23. <https://doi.org/10.1097/00005082-200201000-00003>
- Fonville, J.M., Richards, S.E., Barton, R.H., Boulange, C.L., Ebbels, T.M.D., Nicholson, J.K., Holmes, E., Dumas, M.-E., 2010. The evolution of partial least squares models and related chemometric approaches in metabolomics and metabolic phenotyping. *Journal of Chemometrics* 24, 636–649. <https://doi.org/10.1002/cem.1359>
- Gammelsaeter, R., Coppola, T., Marcaggi, P., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Attwell, D., Regazzi, R., Gundersen, V., 2011. A role for glutamate transporters in the regulation of insulin secretion. *PLoS One* 6, e22960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022960>
- Gehart, H., Ricci, R., 2013. Saving the neck from scission. *Commun Integr Biol* 6, e23098. <https://doi.org/10.4161/cib.23098>
- Getty, L., Hamilton-Wessler, M., Ader, M., Dea, M.K., Bergman, R.N., 1998. Biphasic insulin secretion during intravenous glucose tolerance test promotes optimal interstitial insulin profile. *Diabetes* 47, 1941–1947. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.12.1941>
- Ghadially, F.N., 2014. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix: a Text and Atlas of Physiological and Pathological Alterations in the Fine Structure of Cellular and Extracellular Components*. Elsevier Science, Cambridge.



- Gheni, G., Ogura, M., Iwasaki, M., Yokoi, N., Minami, K., Nakayama, Y., Harada, K., Hastoy, B., Wu, X., Takahashi, H., Kimura, K., Matsubara, T., Hoshikawa, R., Hatano, N., Sugawara, K., Shibasaki, T., Inagaki, N., Bamba, T., Mizoguchi, A., Fukusaki, E., Rorsman, P., Seino, S., 2014. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Rep* 9, 661–673. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.030>
- Gilon, P., Chae, H.-Y., Rutter, G.A., Ravier, M.A., 2014. Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium, Calcium in diabetes* 56, 340–361. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.09.001>
- 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. <https://doi.org/10.1023/a:1005670527340>
- Giorgio, V., Guo, L., Bassot, C., Petronilli, V., Bernardi, P., 2018. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium* 70, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.004>
- Glancy, B., Balaban, R.S., 2012. Role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* 51, 2959–2973. <https://doi.org/10.1021/bi2018909>
- Glancy, B., Willis, W.T., Chess, D.J., Balaban, R.S., 2013. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry* 52, 2793–2809. <https://doi.org/10.1021/bi3015983>
- Göhring, I., Sharoyko, V.V., Malmgren, S., Andersson, L.E., Spégel, P., Nicholls, D.G., Mulder, H., 2014. Chronic High Glucose and Pyruvate Levels Differentially Affect Mitochondrial Bioenergetics and Fuel-stimulated Insulin Secretion from Clonal INS-1 832/13 Cells. *J Biol Chem* 289, 3786–3798. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507335>
- Goldhammer, A.R., Paradies, H.H., 1979. Phosphofructokinase: structure and function. *Curr Top Cell Regul* 15, 109–141.
- Gotoh, M., Maki, T., Kiyozumi, T., Satomi, S., Monaco, A.P., 1985. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40, 437–438. <https://doi.org/10.1097/00007890-198510000-00018>
- Gowda, G.A.N., Djukovic, D., 2014. Overview of mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol Biol* 1198, 3–12. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1258-2_1)
- Goyal, R., Jialal, I., 2021. Diabetes Mellitus Type 2, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Graciano, M.F., Valle, M.M., Curi, R., Carpinelli, A.R., 2013. Evidence for the involvement of GPR40 and NADPH oxidase in palmitic acid-induced superoxide production and insulin secretion. *Islets* 5, 139–148. <https://doi.org/10.4161/isl.25459>
- Griffin, J.L., Keun, H., Richter, C., Moskau, D., Rae, C., Nicholson, J.K., 2003. Compartmentation of metabolism probed by [2- $^{13}\text{C}$ ]alanine: improved  $^{13}\text{C}$  NMR sensitivity using a CryoProbe detects evidence of a glial metabolon. *Neurochem Int* 42, 93–99. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00064-5](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00064-5)
- Grill, V., Efendić, S., 1984. Stimulation by calcium and barium of somatostatin release. Evidence for lower sensitivity of D- vis-à-vis B- and A-cells. *Acta Physiol Scand* 122, 401–407. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1984.tb07525.x>
- Gromada, J., Bokvist, K., Ding, W.G., Barg, S., Buschard, K., Renström, E., Rorsman, P., 1997. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the  $\text{Ca}^{2+}$

- current and the number of granules close to the L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol* 110, 217–228. <https://doi.org/10.1085/jgp.110.3.217>
- Gromada, J., Ma, X., Høy, M., Bokvist, K., Salehi, A., Berggren, P.-O., Rorsman, P., 2004. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1<sup>-/-</sup> mouse alpha-cells. *Diabetes* 53 Suppl 3, S181-189. [https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl\\_3.s181](https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s181)
- Guay, C., Madiraju, S.R.M., Aumais, A., Joly, E., Prentki, M., 2007. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 282, 35657–35665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707294200>
- Guillam, M.T., Dupraz, P., Thorens, B., 2000. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49, 1485–1491. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1485>
- Guillam, M.T., Hümmler, E., Schaerer, E., Yeh, J.I., Birnbaum, M.J., Beermann, F., Schmidt, A., Dériaz, N., Thorens, B., Wu, J.Y., 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17, 327–330. <https://doi.org/10.1038/ng1197-327>
- Gunton, J.E., Kulkarni, R.N., Yim, S., Okada, T., Hawthorne, W.J., Tseng, Y.-H., Roberson, R.S., Ricordi, C., O'Connell, P.J., Gonzalez, F.J., Kahn, C.R., 2005. Loss of ARNT/HIF1 $\beta$  Mediates Altered Gene Expression and Pancreatic-Islet Dysfunction in Human Type 2 Diabetes. *Cell* 122, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.027>
- 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  $\beta$  cell transcription factors in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 123, 3305–3316. <https://doi.org/10.1172/JCI65390>
- Gylfe, E., 1976. Comparison of the effects of leucines, non-metabolizable leucine analogues and other insulin secretagogues on the activity of glutamate dehydrogenase. *Acta Diabetol Lat* 13, 20–24. <https://doi.org/10.1007/BF02591577>
- Haber, M.H., 1988. Pisse prophecy: a brief history of urinalysis. *Clin Lab Med* 8, 415–430.
- Haeusler, R.A., McGraw, T.E., Accili, D., 2018. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hansford, R.G., 1991. Dehydrogenase activation by Ca<sup>2+</sup> in cells and tissues. *J Bioenerg Biomembr* 23, 823–854. <https://doi.org/10.1007/BF00786004>
- Hart, N.J., Powers, A.C., 2019. Use of human islets to understand islet biology and diabetes: progress, challenges and suggestions. *Diabetologia* 62, 212–222. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4772-2>
- Hauge, M., Vestmar, M.A., Husted, A.S., Ekberg, J.P., Wright, M.J., Di Salvo, J., Weinglass, A.B., Engelstoft, M.S., Madsen, A.N., Lückmann, M., Miller, M.W., Trujillo, M.E., Frimurer, T.M., Holst, B., Howard, A.D., Schwartz, T.W., 2015. GPR40 (FFAR1) - Combined Gs and Gq signaling in vitro is associated with robust incretin secretagogue action ex vivo and in vivo. *Mol Metab* 4, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.10.002>
- Hauge-Evans, A.C., King, A.J., Carmignac, D., Richardson, C.C., Robinson, I.C.A.F., Low, M.J., Christie, M.R., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2009. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58, 403–411. <https://doi.org/10.2337/db08-0792>
- Haythorne, E., Rohm, M., van de Bunt, M., Brereton, M.F., Tarasov, A.I., Blacker, T.S., Sachse, G., Silva Dos Santos, M., Terron Exposito, R., Davis, S., Baba, O., Fischer, R., Duchon, M.R., Rorsman, P., MacRae, J.I., Ashcroft, F.M., 2019. Diabetes causes marked

- inhibition of mitochondrial metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nat Commun* 10, 2474. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10189-x>
- Hegele, R.A., Maltman, G.M., 2020. Insulin's centenary: the birth of an idea. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8, 971–977. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30337-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30337-5)
- Heimberg, H., De Vos, A., Pipeleers, D., Thorens, B., Schuit, F., 1995. Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. *J Biol Chem* 270, 8971–8975. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8971>
- Heimberg, H., De Vos, A., Vandercammen, A., Van Schaftingen, E., Pipeleers, D., Schuit, F., 1993. Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. *EMBO J* 12, 2873–2879.
- Hellerstroem, C., 1964. A METHOD FOR THE MICRODISSECTION OF INTACT PANCREATIC ISLETS OF MAMMALS. *Acta Endocrinol (Copenh)* 45, 122–132.
- Henquin, J.-C., 2011. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in  $\beta$ -cells. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S27-31. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70010-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70010-9)
- Henquin, J.C., 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751–1760. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1751>
- Henquin, J.-C., Dufrane, D., Nenquin, M., 2006a. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55, 3470–3477. <https://doi.org/10.2337/db06-0868>
- Henquin, J.C., Gembal, M., Detimary, P., Gao, Z.Y., Warnotte, C., Gilon, P., 1994. Multisite control of insulin release by glucose. *Diabetes Metab* 20, 132–137.
- Henquin, J.-C., Ishiyama, N., Nenquin, M., Ravier, M.A., Jonas, J.-C., 2002. Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1, S60-67. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.s60>
- Henquin, J.-C., Nenquin, M., Stienet, P., Ahren, B., 2006b. In vivo and in vitro glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and amplification signals in beta-cells. *Diabetes* 55, 441–451. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1051>
- Henquin, J.C., Ravier, M.A., Nenquin, M., Jonas, J.C., Gilon, P., 2003. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest* 33, 742–750. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2003.01207.x>
- Herder, C., Roden, M., 2011. Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation* 41, 679–692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02454.x>
- Herrera-Cruz, M.S., Simmen, T., 2017. Over Six Decades of Discovery and Characterization of the Architecture at Mitochondria-Associated Membranes (MAMs). *Adv Exp Med Biol* 997, 13–31. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4567-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4567-7_2)
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.-L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S., Martinou, J.-C., 2012. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* 337, 93–96. <https://doi.org/10.1126/science.1218530>
- Hill, A.V., 1950. A challenge to biochemists. *Biochim Biophys Acta* 4, 4–11. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(50\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(50)90003-5)
- Himsworth, H.P., 1936. Diabetes mellitus. Its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Lancet* 230, 127–130.

- Hirschberg, J., 1890. Aegypten: geschichtliche Studien eines Augenarztes. Thieme.
- Hochachka, P.W., McClelland, G.B., 1997. Cellular metabolic homeostasis during large-scale change in ATP turnover rates in muscles. *J Exp Biol* 200, 381–386.
- Hodakoski, C., Hopkins, B.D., Barrows, D., Mense, S.M., Keniry, M., Anderson, K.E., Kern, P.A., Hawkins, P.T., Stephens, L.R., Parsons, R., 2014. Regulation of PTEN inhibition by the pleckstrin homology domain of P-REX2 during insulin signaling and glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 155–160. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213773111>
- Hökfelt, T., Efendić, S., Hellerström, C., Johansson, O., Luft, R., Arimura, A., 1975. Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A1-cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 200, 5–41.
- Holzer, P., Reichmann, F., Farzi, A., 2012. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides* 46, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.08.005>
- 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>
- Hopper, R.K., Carroll, S., Aponte, A.M., Johnson, D.T., French, S., Shen, R.-F., Witzmann, F.A., Harris, R.A., Balaban, R.S., 2006. Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* 45, 2524–2536. <https://doi.org/10.1021/bi052475e>
- Horgan, R.P., Kenny, L.C., 2011. ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist* 13, 189–195. <https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>
- Horning, E.C., Horning, M.G., 1971. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem* 17, 802–809.
- Hosoya, M., 2012. Preparation of pancreatic  $\beta$ -cells from human iPS cells with small molecules. *Islets* 4, 249–252. <https://doi.org/10.4161/isl.20856>
- Høy, M., Maechler, P., Efanov, A.M., Wollheim, C.B., Berggren, P.O., Gromada, J., 2002. Increase in cellular glutamate levels stimulates exocytosis in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 531, 199–203. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03500-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03500-7)
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40, 430–443. <https://doi.org/10.1002/jms.856>
- Huang, L., Shen, H., Atkinson, M.A., Kennedy, R.T., 1995. Detection of exocytosis at individual pancreatic beta cells by amperometry at a chemically modified microelectrode. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9608–9612. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9608>
- Hubbard, S.R., 2013. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008946. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>
- Hubbard, S.R., Wei, L., Ellis, L., Hendrickson, W.A., 1994. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372, 746–754. <https://doi.org/10.1038/372746a0>
- Huising, M.O., 2020. Paracrine regulation of insulin secretion. *Diabetologia* 63, 2057–2063. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05213-5>

- Hunkeler, M., Hagmann, A., Stutfeld, E., Chami, M., Guri, Y., Stahlberg, H., Maier, T., 2018. Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase. *Nature* 558, 470–474. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0201-4>
- Huret, J.L., Dessen, P., 2017. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [WWW Document]. URL [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_IDH2.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_IDH2.html) (accessed 10.18.21).
- Husted, A.S., Trauelsen, M., Rudenko, O., Hjorth, S.A., Schwartz, T.W., 2017. GPCR-Mediated Signaling of Metabolites. *Cell Metab* 25, 777–796. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.008>
- Hutton, J.C., Sener, A., Herchuelz, A., Atwater, I., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Malaisse, W.J., 1980. Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose- and 2-keto acid-induced insulin release. *Endocrinology* 106, 203–219. <https://doi.org/10.1210/endo-106-1-203>
- IDF Atlas 9th edition and other resources [WWW Document], n.d. URL <https://diabetesatlas.org/en/resources/> (accessed 10.5.21).
- Igoillo-Esteve, M., Marselli, L., Cunha, D.A., Ladrière, L., Ortis, F., Grieco, F.A., Dotta, F., Weir, G.C., Marchetti, P., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2010. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 53, 1395–1405. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1707-y>
- Ikeda, H., 1994. KK mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 24 Suppl, S313–316. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(94\)90268-2](https://doi.org/10.1016/0168-8227(94)90268-2)
- Imai, Y., Dobrian, A.D., Morris, M.A., Taylor-Fishwick, D.A., Nadler, J.L., 2016. Lipids and immunoinflammatory pathways of beta cell destruction. *Diabetologia* 59, 673–678. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3890-y>
- Ipp, E., Rivier, J., Dobbs, R.E., Brown, M., Vale, W., Unger, R.H., 1979. Somatostatin analogs inhibit somatostatin release. *Endocrinology* 104, 1270–1273. <https://doi.org/10.1210/endo-104-5-1270>
- Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P.-L., Wollheim, C.B., 2003. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* 5, 330–335. <https://doi.org/10.1038/ncb951>
- 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>
- Jaeger's Atlas of Diseases of the Ocular Fundus: with New Descriptions, Revisions, and Additions, 1972. . *Br J Ophthalmol* 56, 924.
- Jannin, S., Dumez, J.-N., Giraudeau, P., Kurzbach, D., 2019. Application and methodology of dissolution dynamic nuclear polarization in physical, chemical and biological contexts. *J Magn Reson* 305, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.06.001>
- Jansson, L., Hellerström, C., 1986. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol* 251, E644–647. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1986.251.6.E644>
- Jenkinson, C.P., Göring, H.H.H., Arya, R., Blangero, J., Duggirala, R., DeFronzo, R.A., 2016. Transcriptomics in type 2 diabetes: Bridging the gap between genotype and phenotype. *Genomics Data* 8, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.12.001>

- Ježek, J., Dlasková, A., Zelenka, J., Jabůrek, M., Ježek, P., 2015. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Activated Mitochondrial Phospholipase iPLA<sub>2</sub>γ Prevents Lipotoxic Oxidative Stress in Synergy with UCP2, Amplifies Signaling via G-Protein-Coupled Receptor GPR40, and Regulates Insulin Secretion in Pancreatic β-Cells. *Antioxid Redox Signal* 23, 958–972. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6195>
- Ježek, J., Jabůrek, M., Zelenka, J., Ježek, P., 2010. Mitochondrial phospholipase A2 activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling. *Physiol Res* 59, 737–747. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931905>
- Ježek, P., Hlavatá, L., 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2478–2503. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.05.013>
- Ježek, P., Holendová, B., Garlid, K.D., Jabůrek, M., 2018a. Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal* 29, 667–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7225>
- Ježek, P., Jabůrek, M., Holendová, B., Plecítá-Hlavatá, L., 2018b. Fatty Acid-Stimulated Insulin Secretion vs. Lipotoxicity. *Molecules* 23, E1483. <https://doi.org/10.3390/molecules23061483>
- Ježek, P., Olejár, T., Smolková, K., Ježek, J., Dlasková, A., Plecítá-Hlavatá, L., Zelenka, J., Špaček, T., Engstová, H., Pajuelo Reguera, D., Jabůrek, M., 2014. Antioxidant and regulatory role of mitochondrial uncoupling protein UCP2 in pancreatic beta-cells. *Physiol Res* 63, S73-91. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932633>
- Jiang, J., Au, M., Lu, K., Eshpeter, A., Korbitt, G., Fisk, G., Majumdar, A.S., 2007. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 1940–1953. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0761>
- Jimenez-Sánchez, C., Brun, T., Maechler, P., 2020. Mitochondrial Carriers Regulating Insulin Secretion Profiled in Human Islets upon Metabolic Stress. *Biomolecules* 10, 1543. <https://doi.org/10.3390/biom10111543>
- Jin Chan, S., Steiner, D.F., 2000. Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. *Am Zool* 40, 213–222. <https://doi.org/10.1093/icb/40.2.213>
- Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J.C., MacDonald, M.J., 2010. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 53, 1019–1032. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1685-0>
- Jm, B., F, P., Hs, G., M, P., Ca, B.-T., Y, S., Xr, B., L, S., O, G., Rl, B., V, K., Vk, M., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476. <https://doi.org/10.1038/nature10234>
- Johnson, J.H., Newgard, C.B., Milburn, J.L., Lodish, H.F., Thorens, B., 1990. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *Journal of Biological Chemistry* 265, 6548–6551. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39181-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39181-1)
- Jonas, J.C., Gilon, P., Henquin, J.C., 1998. Temporal and quantitative correlations between insulin secretion and stably elevated or oscillatory cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 47, 1266–1273. <https://doi.org/10.2337/diab.47.8.1266>
- Jörgens, V., 2021. The discovery of insulin in 1914: Georg Zülzer, from Berlin, and Camille Reuter, the forgotten chemist from Luxembourg. *Diabetes Metab* 47, 101180. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2020.07.007>

- Joseph, J.W., Jensen, M.V., Ilkayeva, O., Palmieri, F., Alárcon, C., Rhodes, C.J., Newgard, C.B., 2006. The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281, 35624–35632. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602606200>
- Judge, A., Dodd, M.S., 2020. Metabolism. *Essays Biochem* 64, 607–647. <https://doi.org/10.1042/EBC20190041>
- Jung, Y.-S., Hyeon, J.-S., Hwang, G.-S., 2016. Software-assisted serum metabolite quantification using NMR. *Anal Chim Acta* 934, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.054>
- Kahn, S.E., 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46, 3–19. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-1009-0>
- Karamitsos, D.T., 2011. The story of insulin discovery. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S2–8. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70007-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70007-9)
- Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., Jacobsen, L.M., Schatz, D.A., Lernmark, Å., 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kaul, K., Tarr, J.M., Ahmad, S.I., Kohner, E.M., Chibber, R., 2012. Introduction to diabetes mellitus. *Adv Exp Med Biol* 771, 1–11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_1)
- Kaul, N., Ali, S., 2016. Genes, Genetics, and Environment in Type 2 Diabetes: Implication in Personalized Medicine. *DNA Cell Biol* 35, 1–12. <https://doi.org/10.1089/dna.2015.2883>
- Kayton, N.S., Poffenberger, G., Henske, J., Dai, C., Thompson, C., Aramandla, R., Shostak, A., Nicholson, W., Brissova, M., Bush, W.S., Powers, A.C., 2015. Human islet preparations distributed for research exhibit a variety of insulin-secretory profiles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308, E592–E602. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00437.2014>
- 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  $\beta$ -cell line. *Clin Sci (Lond)* 120, 195–206. <https://doi.org/10.1042/CS20100282>
- Kell, D.B., 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology* 7, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.012>
- Kemp, R.G., Gunasekera, D., 2002. Evolution of the allosteric ligand sites of mammalian phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry* 41, 9426–9430. <https://doi.org/10.1021/bi020110d>
- Kennedy, R.T., Kauri, L.M., Dahlgren, G.M., Jung, S.-K., 2002. Metabolic Oscillations in  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 51, S152–S161. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.S152>
- Khan, S., Kowluru, A., 2018. CD36 mediates lipid accumulation in pancreatic beta cells under the duress of glucolipotoxic conditions: Novel roles of lysine deacetylases. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 2221–2226. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.111>
- Kibbey, R.G., Pongratz, R.L., Romanelli, A.J., Wollheim, C.B., Cline, G.W., Shulman, G.I., 2007. Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab* 5, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.008>
- Kieffer, T.J., Heller, R.S., Unson, C.G., Weir, G.C., Habener, J.F., 1996. Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 137, 5119–5125. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895386>

- 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>
- Kirwan, J.A., Brennan, L., Broadhurst, D., Fiehn, O., Cascante, M., Dunn, W.B., Schmidt, M.A., Velagapudi, V., 2018. Preanalytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for “Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group”-The Metabolomics Society Initiative). *Clin Chem* 64, 1158–1182. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287045>
- Korsgren, O., Nilsson, B., Berne, C., Felldin, M., Foss, A., Kallen, R., Lundgren, T., Salmela, K., Tibell, A., Tufveson, G., 2005. Current status of clinical islet transplantation. *Transplantation* 79, 1289–1293. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000157273.60147.7c>
- Kostidis, S., Addie, R.D., Morreau, H., Mayboroda, O.A., Giera, M., 2017. Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial. *Anal Chim Acta* 980, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.011>
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., Scorrano, L., Dalgaard, L.T., St-Pierre, J., Grey, S.T., Lowell, B.B., 2003. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112, 1831–1842. <https://doi.org/10.1172/JCI19774>
- Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., Agulnick, A.D., D’Amour, K.A., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443–452. <https://doi.org/10.1038/nbt1393>
- Krus, U., Kotova, O., Spégel, P., Hallgard, E., Sharoyko, V.V., Vedin, A., Moritz, T., Sugden, M.C., Koeck, T., Mulder, H., 2010. Pyruvate dehydrogenase kinase 1 controls mitochondrial metabolism and insulin secretion in INS-1 832/13 clonal beta-cells. *Biochem J* 429, 205–213. <https://doi.org/10.1042/BJ20100142>
- Kumari, A., 2018. Chapter 1 - Glycolysis, in: Kumari, A. (Ed.), *Sweet Biochemistry*. Academic Press, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814453-4.00001-7>
- Kunisada, Y., Tsubooka-Yamazoe, N., Shoji, M., Hosoya, M., 2012. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 8, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.10.002>
- Lacy, P.E., Kostianovsky, M., 1967. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16, 35–39. <https://doi.org/10.2337/diab.16.1.35>
- Langenberg, C., Lotta, L.A., 2018. Genomic insights into the causes of type 2 diabetes. *The Lancet* 391, 2463–2474. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31132-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31132-2)
- Langerhans, P., 1869. Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse : Inaugural-Dissertation, zur Erlangung der Doctorwürde in der Medicin und Chirurgie vorgelegt der Medicinischen Facultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin | The Discovery and Early Development of Insulin [WWW Document]. URL <https://insulin.library.utoronto.ca/islandora/object/insulin%3AT10076> (accessed 10.13.21).
- Lauridsen, M., Hansen, S.H., Jaroszewski, J.W., Cornett, C., 2007. Human urine as test material in <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics: recommendations for sample preparation and storage. *Anal Chem* 79, 1181–1186. <https://doi.org/10.1021/ac061354x>
- Lawlis, V.B., Roche, T.E., 1981. Regulation of bovine kidney alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by calcium ion and adenine nucleotides. Effects on S0.5 for



- alpha-ketoglutarate. *Biochemistry* 20, 2512–2518. <https://doi.org/10.1021/bi00512a023>
- Lee, B., Miles, P.D., Vargas, L., Luan, P., Glasco, S., Kushnareva, Y., Kornbrust, E.S., Grako, K.A., Wollheim, C.B., Maechler, P., Olefsky, J.M., Anderson, C.M., 2003. Inhibition of mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger increases mitochondrial metabolism and potentiates glucose-stimulated insulin secretion in rat pancreatic islets. *Diabetes* 52, 965–973. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.4.965>
- Lefevre, C., Panthu, B., Naville, D., Guibert, S., Pinteur, C., Elena-Herrmann, B., Vidal, H., Rautureau, G.J.P., Mey, A., 2019. Metabolic Phenotyping of Adipose-Derived Stem Cells Reveals a Unique Signature and Intrinsic Differences between Fat Pads. *Stem Cells Int* 2019, 9323864. <https://doi.org/10.1155/2019/9323864>
- Leggett, A., Wang, C., Li, D.-W., Somogyi, A., Bruschweiler-Li, L., Brüsweiler, R., 2019. Identification of Unknown Metabolomics Mixture Compounds by Combining NMR, MS, and Cheminformatics. *Methods Enzymol* 615, 407–422. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.09.003>
- Lenzen, S., Tiedge, M., Panten, U., 1987. Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115, 21–29. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1150021>
- Leto, D., Saltiel, A.R., 2012. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3351>
- Lewandowski, S.L., Cardone, R.L., Foster, H.R., Ho, T., Potapenko, E., Poudel, C., VanDeusen, H.R., Sdao, S.M., Alves, T.C., Zhao, X., Capozzi, M.E., Souza, A.H. de, Jahan, I., Thomas, C.J., Nunemaker, C.S., Davis, D.B., Campbell, J.E., Kibbey, R.G., Merrins, M.J., 2020. Pyruvate Kinase Controls Signal Strength in the Insulin Secretory Pathway. *Cell Metabolism* 32, 736-750.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.007>
- Lewis, G.F., O’Meara, N.M., Cabana, V.G., Blackman, J.D., Pugh, W.L., Druetzler, A.F., Lukens, J.R., Getz, G.S., Polonsky, K.S., 1991. Postprandial triglyceride response in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is not altered by short-term deterioration in glycaemic control or level of postprandial insulin replacement. *Diabetologia* 34, 253–259. <https://doi.org/10.1007/BF00405084>
- Li, C., Liu, C., Nissim, Itzhak, Chen, J., Chen, P., Doliba, N., Zhang, T., Nissim, Ilana, Daikhin, Y., Stokes, D., Yudkoff, M., Bennett, M.J., Stanley, C.A., Matschinsky, F.M., Naji, A., 2013. Regulation of glucagon secretion in normal and diabetic human islets by  $\gamma$ -hydroxybutyrate and glycine. *J Biol Chem* 288, 3938–3951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.385682>
- 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., Frigerio, F., Maechler, P., 2008. The sensitivity of pancreatic beta-cells to mitochondrial injuries triggered by lipotoxicity and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 36, 930–934. <https://doi.org/10.1042/BST0360930>
- Liakopoulos, V., Franzén, S., Svensson, A.-M., Miftaraj, M., Ottosson, J., Näslund, I., Gudbjörnsdottir, S., Eliasson, B., 2019. Pros and cons of gastric bypass surgery in individuals with obesity and type 2 diabetes: nationwide, matched, observational cohort study. *BMJ Open* 9, e023882. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-023882>

- Lin, T.M., Chance, R.E., 1974. Candidate hormones of the gut. VI. Bovine pancreatic polypeptide (BPP) and avian pancreatic polypeptide (APP). *Gastroenterology* 67, 737–738.
- Lindall, A., Steffes, M., Sorenson, R., 1969. Immunoassayable insulin content of subcellular fractions of rat islets. *Endocrinology* 85, 218–223. <https://doi.org/10.1210/endo-85-2-218>
- Lipfert, M., Rout, M.K., Berjanskii, M., Wishart, D.S., 2019. Automated Tools for the Analysis of 1D-NMR and 2D-NMR Spectra. *Methods Mol Biol* 2037, 429–449. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2_24)
- Liu, M., Wan, Z.-L., Chu, Y.-C., Aladdin, H., Klaproth, B., Choquette, M., Hua, Q.-X., Mackin, R.B., Rao, J.S., De Meyts, P., Katsoyannis, P.G., Arvan, P., Weiss, M.A., 2009. Crystal structure of a “nonfoldable” insulin: impaired folding efficiency despite native activity. *J Biol Chem* 284, 35259–35272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046888>
- Liu, M., Weiss, M.A., Arunagiri, A., Yong, J., Rege, N., Sun, J., Haataja, L., Kaufman, R.J., Arvan, P., 2018. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes Metab* 20 Suppl 2, 28–50. <https://doi.org/10.1111/dom.13378>
- Liu, M., Wright, J., Guo, H., Xiong, Y., Arvan, P., 2014. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. *Vitam Horm* 95, 35–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00002-8>
- Liu, Y.Q., Moibi, J.A., Leahy, J.L., 2004. Chronic high glucose lowers pyruvate dehydrogenase activity in islets through enhanced production of long chain acyl-CoA: prevention of impaired glucose oxidation by enhanced pyruvate recycling through the malate-pyruvate shuttle. *J Biol Chem* 279, 7470–7475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307921200>
- Lowell, B.B., Shulman, G.I., 2005. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307, 384–387. <https://doi.org/10.1126/science.1104343>
- Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S.C., Jensen, M.V., Kamzolova, S., Newgard, C.B., Sherry, A.D., 2002. <sup>13</sup>C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2708–2713. <https://doi.org/10.1073/pnas.052005699>
- Luciani, D.S., Mislser, S., Polonsky, K.S., 2006. Ca<sup>2+</sup> controls slow NAD(P)H oscillations in glucose-stimulated mouse pancreatic islets. *J Physiol* 572, 379–392. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101766>
- Lupi, R., Dotta, F., Marselli, L., Del Guerra, S., Masini, M., Santangelo, C., Patané, G., Boggi, U., Piro, S., Anello, M., Bergamini, E., Mosca, F., Di Mario, U., Del Prato, S., Marchetti, P., 2002. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes* 51, 1437–1442. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1437>
- Lutz, N.W., Maillet, S., Nicoli, F., Viout, P., Cozzone, P.J., 1998. Further assignment of resonances in <sup>1</sup>H NMR spectra of cerebrospinal fluid (CSF). *FEBS Lett* 425, 345–351. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00262-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00262-2)
- Luzi, L., DeFronzo, R.A., 1989. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am J Physiol* 257, E241–246. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.257.2.E241>
- Ma, X., Zhang, Y., Gromada, J., Sewing, S., Berggren, P.-O., Buschard, K., Salehi, A., Vikman, J., Rorsman, P., Eliasson, L., 2005. Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat

- pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors. *Mol Endocrinol* 19, 198–212. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0059>
- MacDonald, M.J., 1995. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* 270, 20051–20058.
- MacDonald, M.J., 1993a. Estimates of glycolysis, pyruvate (de)carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* 305, 205–214. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1413>
- MacDonald, M.J., 1993b. Metabolism of the insulin secretagogue methyl succinate by pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* 300, 201–205. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1028>
- MacDonald, Michael J., Brown, L.J., Longacre, M.J., Stoker, S.W., Kendrick, M.A., Hasan, N.M., 2013. Knockdown of both mitochondrial isocitrate dehydrogenase enzymes in pancreatic beta cells inhibits insulin secretion. *Biochim Biophys Acta* 1830, 5104–5111. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.013>
- MacDonald, M.J., Dobrzyn, A., Ntambi, J., Stoker, S.W., 2008. The role of rapid lipogenesis in insulin secretion: Insulin secretagogues acutely alter lipid composition of INS-1832/13 cells. *Arch Biochem Biophys* 470, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.11.017>
- MacDonald, M.J., Fahien, L.A., Buss, J.D., Hasan, N.M., Fallon, M.J., Kendrick, M.A., 2003. Citrate oscillates in liver and pancreatic beta cell mitochondria and in INS-1 insulinoma cells. *J Biol Chem* 278, 51894–51900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309038200>
- MacDonald, M.J., Longacre, M.J., Langberg, E.-C., Tibell, A., Kendrick, M.A., Fukao, T., Ostenson, C.-G., 2009. Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52, 1087–1091. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1319-6>
- MacDonald, M.J., Longacre, M.J., Stoker, S.W., Kendrick, M., Thonpho, A., Brown, L.J., Hasan, N.M., Jitrapakdee, S., Fukao, T., Hanson, M.S., Fernandez, L.A., Odorico, J., 2011. Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, atp citrate lyase, and pyruvate carboxylation and high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *J Biol Chem* 286, 18383–18396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241182>
- MacDonald, M. J., Longacre, M.J., Warner, T.F., Thonpho, A., 2013. High level of ATP citrate lyase expression in human and rat pancreatic islets. *Horm Metab Res* 45, 391–393. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1329987>
- MacDonald, M.J., Marshall, L.K., 2001. Survey of normal appearing mouse strain which lacks malic enzyme and Nad<sup>+</sup>-linked glycerol phosphate dehydrogenase: normal pancreatic beta cell function, but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 220, 117–125. <https://doi.org/10.1023/a:1010821821921>
- MacDonald, P.E., De Marinis, Y.Z., Ramracheya, R., Salehi, A., Ma, X., Johnson, P.R.V., Cox, R., Eliasson, L., Rorsman, P., 2007. A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol* 5, e143. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050143>
- 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* 27, 5122–5130. <https://doi.org/10.1096/fj.13-234104>

- Madec, A.-M., Perrier, J., Panthu, B., Dingreville, F., 2021. Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAMs) interactions and calcium exchange in the development of type 2 diabetes. *Int Rev Cell Mol Biol* 363, 169–202. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.06.001>
- Maechler, P., 2017. Glutamate pathways of the beta-cell and the control of insulin secretion. *Diabetes Res Clin Pract* 131, 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.009>
- Maechler, P., Wollheim, C.B., 2001. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414, 807–812. <https://doi.org/10.1038/414807a>
- Maechler, P., Wollheim, C.B., 1999. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402, 685–689. <https://doi.org/10.1038/45280>
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinass, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., Donath, M.Y., 2002. Glucose-induced beta cell production of IL-1 $\beta$  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  $\beta$  pancréatique. *EMC - Endocrinologie* 2, 241–264. <https://doi.org/10.1016/j.emcend.2005.07.001>
- Mahdi, T., Hänzelmann, S., Salehi, A., Muhammed, S.J., Reinbothe, T.M., Tang, Y., Axelsson, A.S., Zhou, Y., Jing, X., Almgren, P., Krus, U., Taneera, J., Blom, A.M., Lyssenko, V., Esguerra, J.L.S., Hansson, O., Eliasson, L., Derry, J., Zhang, E., Wollheim, C.B., Groop, L., Renström, E., Rosengren, A.H., 2012. Secreted frizzled-related protein 4 reduces insulin secretion and is overexpressed in type 2 diabetes. *Cell Metab* 16, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.009>
- Malinowski, R.M., Ghiasi, S.M., Mandrup-Poulsen, T., Meier, S., Lerche, M.H., Ardenkjær-Larsen, J.H., Jensen, P.R., 2020. Pancreatic  $\beta$ -cells respond to fuel pressure with an early metabolic switch. *Sci Rep* 10, 15413. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72348-1>
- Mallilankaraman, K., Cárdenas, C., Doonan, P.J., Chandramoorthy, H.C., Irrinki, K.M., Golenár, T., Csordás, G., Madireddi, P., Yang, J., Müller, M., Miller, R., Kolesar, J.E., Molgó, J., Kaufman, B., Hajnóczky, G., Foskett, J.K., Madesh, M., 2012. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 14, 1336–1343. <https://doi.org/10.1038/ncb2622>
- Malmgren, S., Nicholls, D.G., Taneera, J., Bacos, K., Koeck, T., Tamaddon, A., Wibom, R., Groop, L., Ling, C., Mulder, H., Sharoyko, V.V., 2009. Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion. *J Biol Chem* 284, 32395–32404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026708>
- Mamas, M., Dunn, W.B., Neyses, L., Goodacre, R., 2011. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* 85, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>
- 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>
- Mancini, A.D., Bertrand, G., Vivot, K., Carpentier, É., Tremblay, C., Ghislain, J., Bouvier, M., Poitout, V., 2015.  $\beta$ -Arrestin Recruitment and Biased Agonism at Free Fatty Acid Receptor 1. *J Biol Chem* 290, 21131–21140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.644450>

- 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* 8, 225–228. <https://doi.org/10.1002/biof.5520080309>
- Marchetti, P., 2016. Islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetologia* 59, 668–672. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3875-x>
- Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Boggi, U., Filipponi, F., Weir, G.C., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2007. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50, 2486–2494. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0816-8>
- Marchetti, P., Del Guerra, S., Marselli, L., Lupi, R., Masini, M., Pollera, M., Bugliani, M., Boggi, U., Vistoli, F., Mosca, F., Del Prato, S., 2004. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5535–5541. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0150>
- Markley, J.L., Brüschweiler, R., Edison, A.S., Eghbalnia, H.R., Powers, R., Raftery, D., Wishart, D.S., 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol* 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- Marquard, J., Otter, S., Welters, A., Stirban, A., Fischer, A., Eglinger, J., Herebian, D., Kletke, O., Klemen, M.S., Stožer, A., Wnendt, S., Piemonti, L., Köhler, M., Ferrer, J., Thorens, B., Schliess, F., Rupnik, M.S., Heise, T., Berggren, P.-O., Klöcker, N., Meissner, T., Mayatepek, E., Eberhard, D., Kragl, M., Lammert, E., 2015. Characterization of pancreatic NMDA receptors as possible drug targets for diabetes treatment. *Nat Med* 21, 363–372. <https://doi.org/10.1038/nm.3822>
- Marselli, L., Thorne, J., Dahiya, S., Sgroi, D.C., Sharma, A., Bonner-Weir, S., Marchetti, P., Weir, G.C., 2010. Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* 5, e11499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011499>
- Marshall, B.A., Tordjman, K., Host, H.H., Ensor, N.J., Kwon, G., Marshall, C.A., Coleman, T., McDaniel, M.L., Semenkovich, C.F., 1999. Relative hypoglycemia and hyperinsulinemia in mice with heterozygous lipoprotein lipase (LPL) deficiency. Islet LPL regulates insulin secretion. *J Biol Chem* 274, 27426–27432. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27426>
- Marshall, D.D., Powers, R., 2017. Beyond the paradigm: Combining mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for metabolomics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 100, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2017.01.001>
- Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., 1992. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340, 925–929. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92814-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92814-v)
- Martin, E., 1989. Problems of Priority in the Discovery of Insulin, in: von Engelhardt, D. (Ed.), *Diabetes Its Medical and Cultural History*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 420–426. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-48364-6\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-642-48364-6_31)
- Martineau, E., Tea, I., Loaëc, G., Giraudeau, P., Akoka, S., 2011. Strategy for choosing extraction procedures for NMR-based metabolomic analysis of mammalian cells. *Anal Bioanal Chem* 401, 2133–2142. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5310-y>
- Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* 11, 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>

- 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>
- McCormack, J.G., Denton, R.M., 1979. The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J* 180, 533–544. <https://doi.org/10.1042/bj1800533>
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., Denton, R.M., 1990a. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70, 391–425. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.391>
- McCormack, J.G., Longo, E.A., Corkey, B.E., 1990b. Glucose-induced activation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat pancreatic islets. *Biochem J* 267, 527–530. <https://doi.org/10.1042/bj2670527>
- 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>
- McQuarrie, I., 1954. Idiopathic spontaneously occurring hypoglycemia in infants; clinical significance of problem and treatment. *AMA Am J Dis Child* 87, 399–428.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90335-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90335-7)
- Meigs, J.B., 2019. The Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes: Opportunities for Health Translation. *Curr Diab Rep* 19, 62. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1173-y>
- Michael, J., Carroll, R., Swift, H.H., Steiner, D.F., 1987. Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules. *J Biol Chem* 262, 16531–16535.
- Mili, M., Panthu, B., Madec, A.-M., Berger, M.-A., Rautureau, G.J.P., Elena-Herrmann, B., 2020. Fast and ergonomic extraction of adherent mammalian cells for NMR-based metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem* 412, 5453–5463. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02764-9>
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., Yamamura, K., 1990. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127, 126–132. <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-126>
- Mobasser, M., Shirmohammadi, M., Amiri, T., Vahed, N., Hosseini Fard, H., Ghojzadeh, M., 2020. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health Promot Perspect* 10, 98–115. <https://doi.org/10.34172/hpp.2020.18>
- Molinaro, Angela, Becattini, B., Mazzoli, A., Bleve, A., Radici, L., Maxvill, I., Sopasakis, V.R., Molinaro, Antonio, Bäckhed, F., Solinas, G., 2019. Insulin-Driven PI3K-AKT Signaling in the Hepatocyte Is Mediated by Redundant PI3K $\alpha$  and PI3K $\beta$  Activities and Is Promoted by RAS. *Cell Metab* 29, 1400–1409.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.010>
- Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H.A., Flatt, P.R., McKillop, A.M., 2014. Activation of GPR119 by fatty acid agonists augments insulin release from clonal  $\beta$ -cells and isolated pancreatic

- islets and improves glucose tolerance in mice. *Biol Chem* 395, 453–464. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0255>
- Moskalewski, S., 1965. ISOLATION AND CULTURE OF THE ISLETS OF LANGERHANS OF THE GUINEA PIG. *Gen Comp Endocrinol* 5, 342–353. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(65\)90059-6](https://doi.org/10.1016/0016-6480(65)90059-6)
- Moulinier-Brogi, L., 2016. L'examen des urines dans la médecine médiévale en terre d'Islam et en Occident. Un aperçu. *Médiévales. Langues, Textes, Histoire* 25–41. <https://doi.org/10.4000/medievales.7707>
- Mukhuty, A., Fouzder, C., Mukherjee, S., Malick, C., Mukhopadhyay, S., Bhattacharya, S., Kundu, R., 2017. Palmitate induced Fetuin-A secretion from pancreatic  $\beta$ -cells adversely affects its function and elicits inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 491, 1118–1124. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.022>
- Murlin, J.R., Kramer, B., 1913. The influence of pancreatic and duodenal extracts on the glycosuria and the respiratory metabolism of depancreatized dogs. *Experimental Biology and Medicine* 10, 171–173. <https://doi.org/10.3181/00379727-10-108>
- Muschet, C., Möller, G., Prehn, C., de Angelis, M.H., Adamski, J., Tokarz, J., 2016. Removing the bottlenecks of cell culture metabolomics: fast normalization procedure, correlation of metabolites to cell number, and impact of the cell harvesting method. *Metabolomics* 12, 151. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1104-8>
- Nagana Gowda, G.A., Raftery, D., 2019. Overview of NMR Spectroscopy-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol Biol* 2037, 3–14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9690-2_1)
- Neher, E., Marty, A., 1982. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6712–6716. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.21.6712>
- Nesher, R., Cerasi, E., 2002. Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1, S53-59. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.s53>
- Nicholson, J.K., Foxall, P.J., Spraul, M., Farrant, R.D., Lindon, J.C., 1995. 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal Chem* 67, 793–811. <https://doi.org/10.1021/ac00101a004>
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., 2008. Systems biology: Metabonomics. *Nature* 455, 1054–1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E., 1999. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Nicholson, J.K., O'Flynn, M.P., Sadler, P.J., Macleod, A.F., Juul, S.M., Sönksen, P.H., 1984. Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem J* 217, 365–375. <https://doi.org/10.1042/bj2170365>
- Nicolson, T.J., Bellomo, E.A., Wijesekara, N., Loder, M.K., Baldwin, J.M., Gyulhandanyan, A.V., Koshkin, V., Tarasov, A.I., Carzaniga, R., Kronenberger, K., Taneja, T.K., da Silva Xavier, G., Libert, S., Froguel, P., Scharfmann, R., Stetsyuk, V., Ravassard, P., Parker, H., Gribble, F.M., Reimann, F., Sladek, R., Hughes, S.J., Johnson, P.R.V., Masseboeuf, M., Burcelin, R., Baldwin, S.A., Liu, M., Lara-Lemus, R., Arvan, P., Schuit, F.C., Wheeler, M.B., Chimienti, F., Rutter, G.A., 2009. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null

- for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes* 58, 2070–2083. <https://doi.org/10.2337/db09-0551>
- Noda, M., Yamashita, S., Takahashi, N., Eto, K., Shen, L.-M., Izumi, K., Daniel, S., Tsubamoto, Y., Nemoto, T., Iino, M., Kasai, H., Sharp, G.W.G., Kadowaki, T., 2002. Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the beta-cell model of mitochondrial diabetes. Characteristics of betaHC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription. *J Biol Chem* 277, 41817–41826. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207690200>
- Nordmann, T.M., Dror, E., Schulze, F., Traub, S., Berishvili, E., Barbieux, C., Böni-Schnetzler, M., Donath, M.Y., 2017. The Role of Inflammation in  $\beta$ -cell Dedifferentiation. *Sci Rep* 7, 6285. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06731-w>
- Nunemaker, C.S., Wasserman, D.H., McGuinness, O.P., Sweet, I.R., Teague, J.C., Satin, L.S., 2006. Insulin secretion in the conscious mouse is biphasic and pulsatile. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E523–E529. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00392.2005>
- Nyblom, H.K., 2007. Glucotoxicity in Insulin-Producing  $\beta$ -Cells.
- Nyhan, W.L., 2010. When to Suspect Metabolic Disease, in: Hoffmann, G.F., Zschocke, J., Nyhan, W.L. (Eds.), *Inherited Metabolic Diseases: A Clinical Approach*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 15–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-74723-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-540-74723-9_4)
- Nyrén, R., Chang, C.L., Lindström, P., Barmina, A., Vorrjö, E., Ali, Y., Juntti-Berggren, L., Bensadoun, A., Young, S.G., Olivecrona, T., Olivecrona, G., 2012. Localization of lipoprotein lipase and GPIHBP1 in mouse pancreas: effects of diet and leptin deficiency. *BMC Physiol* 12, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-12-14>
- O’Connell, T.M., 2012. Recent advances in metabolomics in oncology. *Bioanalysis* 4, 431–451. <https://doi.org/10.4155/bio.11.326>
- O’Dowd, J.F., 2009. The isolation and purification of rodent pancreatic islets of Langerhans. *Methods Mol Biol* 560, 37–42. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-448-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-448-3_3)
- Oh, W., Abu-Elheiga, L., Kordari, P., Gu, Z., Shaikenov, T., Chirala, S.S., Wakil, S.J., 2005. Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1384–1389. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409451102>
- 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 (Lausanne)* 9, 384. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00384>
- Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>
- Okita, K., Yamanaka, S., 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 103–111. <https://doi.org/10.2174/157488806775269061>
- Olmsted, J.M.D., 1953. Claude Bernard, 1813–1878; a pioneer in the study of carbohydrate metabolism. *Diabetes* 2, 162–164. <https://doi.org/10.2337/diab.2.2.162>
- Olofsson, C.S., Göpel, S.O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P., Eliasson, L., 2002. Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 444, 43–51. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0781-5>
- Orci, L., Unger, R.H., 1975. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 2, 1243–1244. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)92078-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)92078-4)



- O'Shea, K., Misra, B.B., 2020. Software tools, databases and resources in metabolomics: updates from 2018 to 2019. *Metabolomics* 16, 36. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01657-3>
- O'Toole, T.J., Sharma, S., 2021. Physiology, Somatostatin, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Palmer, A.E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S.A., Lev-Ram, V., Baker, D., Tsien, R.Y., 2006. Ca<sup>2+</sup> indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol* 13, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.03.007>
- Pan, Z., Raftery, D., 2007. Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics. *Anal Bioanal Chem* 387, 525–527. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0687-8>
- Pandol, S.J., 2010. The Exocrine Pancreas, Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Panov, A., Scarpa, A., 1996. Independent modulation of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Biochemistry* 35, 427–432. <https://doi.org/10.1021/bi952101t>
- Panthu, B., Ohlmann, T., Perrier, J., Schlattner, U., Jalinot, P., Elena-Herrmann, B., Rautureau, G.J.P., 2018. Cell-Free Protein Synthesis Enhancement from Real-Time NMR Metabolite Kinetics: Redirecting Energy Fluxes in Hybrid RRL Systems. *ACS Synth Biol* 7, 218–226. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00280>
- Parmeggiani, A., Bowman, R.H., 1963. REGULATION OF PHOSPHOFRUCTOKINASE ACTIVITY BY CITRATE IN NORMAL AND DIABETIC MUSCLE. *Biochem Biophys Res Commun* 12, 268–273. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(63\)90294-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(63)90294-8)
- Patel, M.S., Korotchkina, L.G., 2001. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med* 33, 191–197. <https://doi.org/10.1038/emm.2001.32>
- Patoulas, D., Papadopoulos, C., Stavropoulos, K., Zografou, I., Doumas, M., Karagiannis, A., 2020. Prognostic value of arterial stiffness measurements in cardiovascular disease, diabetes, and its complications: The potential role of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 22, 562–571. <https://doi.org/10.1111/jch.13831>
- Patterson, J.N., Cousteils, K., Lou, J.W., Manning Fox, J.E., MacDonald, P.E., Joseph, J.W., 2014. Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 289, 13335–13346. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521666>
- Paul, D., Höhne, M., Pinkert, C., Piasecki, A., Ummelmann, E., Brinster, R.L., 1988. Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes. *Exp Cell Res* 175, 354–362. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90199-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90199-1)
- Pavy, F., 1885. INTRODUCTORY ADDRESS TO THE DISCUSSION ON THE CLINICAL ASPECT OF GLYCOSURIA. *The Lancet* 126, 1085–1087.
- Pender, C., Trentadue, A.R., Pories, W.J., Dohm, G.L., Houmard, J.A., Youngren, J.F., 2006. Expression of genes regulating malonyl-CoA in human skeletal muscle. *J Cell Biochem* 99, 860–867. <https://doi.org/10.1002/jcb.20944>
- 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>
- Perry, R.J., Camporez, J.-P.G., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.-M., Ruan, H.-B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S.M., Sul, H.S., Birnbaum, M.J., Davis, R.J., Cline, G.W., Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2015. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* 160, 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012>
- Petersen, K.F., Laurent, D., Rothman, D.L., Cline, G.W., Shulman, G.I., 1998. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J Clin Invest* 101, 1203–1209. <https://doi.org/10.1172/JCI579>
- Petersen, M.C., Shulman, G.I., 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98, 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Phalaraksh, C., Lenz, E.M., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Farrant, R.D., Reynolds, S.E., Wilson, I.D., Osborn, D., Weeks, J.M., 1999. NMR spectroscopic studies on the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 795–805. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00053-3)
- Plečtitá-Hlavatá, L., Ježek, P., 2016. Integration of superoxide formation and cristae morphology for mitochondrial redox signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 80, 31–50. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.010>
- Plötz, T., Krümmel, B., Laporte, A., Pingitore, A., Persaud, S.J., Jörns, A., Elsner, M., Mehmeti, I., Lenzen, S., 2017. The monounsaturated fatty acid oleate is the major physiological toxic free fatty acid for human beta cells. *Nutr Diabetes* 7, 305. <https://doi.org/10.1038/s41387-017-0005-x>
- Poitout, V., Robertson, R.P., 2008. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 29, 351–366. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0023>
- Pongratz, R.L., Kibbey, R.G., Shulman, G.I., Cline, G.W., 2007. Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem* 282, 200–207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602954200>
- Pratt, J.H., 1989. On the History of the Discovery of Insulin, in: von Engelhardt, D. (Ed.), *Diabetes Its Medical and Cultural History*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 411–419. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-48364-6\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-642-48364-6_30)
- Prentki, M., Corkey, B.E., Madiraju, S.R.M., 2020. Lipid-associated metabolic signalling networks in pancreatic beta cell function. *Diabetologia* 63, 10–20. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-04976-w>
- Prentki, M., Nolan, C.J., 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802–1812. <https://doi.org/10.1172/JCI29103>
- Pullen, T.J., Khan, A.M., Barton, G., Butcher, S.A., Sun, G., Rutter, G.A., 2010. Identification of genes selectively disallowed in the pancreatic islet. *Islets* 2, 89–95. <https://doi.org/10.4161/isl.2.2.11025>
- Qi, F., Pradhan, R.K., Dash, R.K., Beard, D.A., 2011. Detailed kinetics and regulation of mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase. *BMC Biochem* 12, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-12-53>
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., Nadal, A., 2008. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199, 5–19. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0290>

- Quintens, R., Hendrickx, N., Lemaire, K., Schuit, F., 2008. Why expression of some genes is disallowed in beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36, 300–305. <https://doi.org/10.1042/BST0360300>
- Rabaglia, M.E., Gray-Keller, M.P., Frey, B.L., Shortreed, M.R., Smith, L.M., Attie, A.D., 2005. Alpha-Ketoisocaproate-induced hypersecretion of insulin by islets from diabetes-susceptible mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E218–224. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00573.2004>
- 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>
- Randle, P.J., 1993. Glucokinase and candidate genes for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 269–275. <https://doi.org/10.1007/BF00400227>
- Randle, P.J., Denton, R.M., Pask, H.T., Severson, D.L., 1974. Calcium ions and the regulation of pyruvate dehydrogenase. *Biochem Soc Symp* 75–88.
- Rao, P.V., Reddy, A.P., Lu, X., Dasari, S., Krishnaprasad, A., Biggs, E., Roberts, C.T., Nagalla, S.R., 2009. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *J. Proteome Res.* 8, 239–245. <https://doi.org/10.1021/pr8003776>
- Rautureau, G.J.P., Morio, B., Guibert, S., Lefevre, C., Perrier, J., Alves, A., Chauvin, M.A., Pinteur, C., Monet, M.A., Godet, M., Madec, A.M., Rieusset, J., Mey, A., Panthu, B., 2021. Dietary obesity in mice is associated with lipid deposition and metabolic shifts in the lungs sharing features with the liver. *Sci Rep* 11, 8712. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88097-8>
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., Scharfmann, R., 2011. A genetically engineered human pancreatic  $\beta$  cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 121, 3589–3597. <https://doi.org/10.1172/JCI58447>
- Ravier, M.A., Rutter, G.A., 2005. Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 54, 1789–1797. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1789>
- Reaven, G.M., 2005. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr* 25, 391–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155>
- Reaven, G.M., 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
- Remedi, M.S., Emfinger, C., 2016. Pancreatic  $\beta$ -cell identity in diabetes. *Diabetes Obes Metab* 18 Suppl 1, 110–116. <https://doi.org/10.1111/dom.12727>
- Ren, J.M., Marshall, B.A., Gulve, E.A., Gao, J., Johnson, D.W., Holloszy, J.O., Mueckler, M., 1993. Evidence from transgenic mice that glucose transport is rate-limiting for glycogen deposition and glycolysis in skeletal muscle. *J Biol Chem* 268, 16113–16115.
- Rhee, E.P., Gerszten, R.E., 2012. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. *Clin Chem* 58, 139–147. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.169573>
- Rhodes, C.J., Alarcón, C., 1994. What  $\beta$ -cell Defect Could Lead to Hyperproinsulinemia in NIDDM?: Some Clues From Recent Advances Made in Understanding the Proinsulin-Processing Mechanism. *Diabetes* 43, 511–517. <https://doi.org/10.2337/diab.43.4.511>
- Rich, P.R., 2003. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 31, 1095–1105. <https://doi.org/10.1042/bst0311095>

- Richard, A.-M.T., Webb, D.-L., Goodman, J.M., Schultz, V., Flanagan, J.N., Getty-Kaushik, L., Deeney, J.T., Yaney, G.C., Dunaway, G.A., Berggren, P.-O., Tornheim, K., 2007. Tissue-dependent loss of phosphofructokinase-M in mice with interrupted activity of the distal promoter: impairment in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E794-801. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00168.2007>
- Ricken, S., Leipziger, J., Greger, R., Nitschke, R., 1998. Simultaneous measurements of cytosolic and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients in HT29 cells. *J Biol Chem* 273, 34961–34969. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.52.34961>
- 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>
- Ristow, M., Vorgerd, M., Möhlig, M., Schatz, H., Pfeiffer, A., 1997. Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans impairs insulin secretion and causes insulin resistance. *J Clin Invest* 100, 2833–2841. <https://doi.org/10.1172/JCI119831>
- Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., 1994. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in intact cells. *J Cell Biol* 126, 1183–1194. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.5.1183>
- 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 Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* 280, 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>
- Rizzuto, R., Pozzan, T., 2006. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86, 369–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2005>
- Robert, V., Gurlini, P., Tosello, V., Nagai, T., Miyawaki, A., Di Lisa, F., Pozzan, T., 2001. Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac cells. *EMBO J* 20, 4998–5007. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4998>
- Robertson, D.G., Watkins, P.B., Reily, M.D., 2011. Metabolomics in toxicology: preclinical and clinical applications. *Toxicol Sci* 120 Suppl 1, S146-170. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq358>
- Roche Biochemical Pathway [WWW Document], n.d. URL <http://biochemical-pathways.com/#/map/1> (accessed 10.20.21).
- Roduit, R., Nolan, C., Alarcon, C., Moore, P., Barbeau, A., Delghingaro-Augusto, V., Przybykowski, E., Morin, J., Massé, F., Massie, B., Ruderman, N., Rhodes, C., Poitout, V., Prentki, M., 2004. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53, 1007–1019. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.1007>
- Ronnebaum, S.M., Ilkayeva, O., Burgess, S.C., Joseph, J.W., Lu, D., Stevens, R.D., Becker, T.C., Sherry, A.D., Newgard, C.B., Jensen, M.V., 2006. A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated

- insulin secretion. *J Biol Chem* 281, 30593–30602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511908200>
- Ronnebaum, S.M., Jensen, M.V., Hohmeier, H.E., Burgess, S.C., Zhou, Y.-P., Qian, S., MacNeil, D., Howard, A., Thornberry, N., Ilkayeva, O., Lu, D., Sherry, A.D., Newgard, C.B., 2008. Silencing of cytosolic or mitochondrial isoforms of malic enzyme has no effect on glucose-stimulated insulin secretion from rodent islets. *J Biol Chem* 283, 28909–28917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804665200>
- Rorsman, P., Ashcroft, F.M., 2018. Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological Reviews* 98, 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renström, E., Gromada, J., Barg, S., Göpel, S., 2000. The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15, 72–77. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.2.72>
- Rorsman, P., Huising, M.O., 2018. The somatostatin-secreting pancreatic  $\delta$ -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>
- Rossi, A., Pizzo, P., Filadi, R., 2019. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866, 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>
- 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)
- Rutter, G.A., Denton, R.M., 1989. The binding of  $\text{Ca}^{2+}$  ions to pig heart  $\text{NAD}^{+}$ -isocitrate dehydrogenase and the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J* 263, 453–462. <https://doi.org/10.1042/bj2630453>
- Rutter, G.A., Denton, R.M., 1988. Regulation of  $\text{NAD}^{+}$ -linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by  $\text{Ca}^{2+}$  ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and  $\text{NADH}/\text{NAD}^{+}$  ratios. *Biochem J* 252, 181–189. <https://doi.org/10.1042/bj2520181>
- Ryan, D., Robards, K., 2006. Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? *Anal. Chem.* 78, 7954–7958. <https://doi.org/10.1021/ac0614341>
- Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N.M., Lakey, J.R.T., Shapiro, A.M.J., 2005. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54, 2060–2069. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.7.2060>
- Sabrautzki, S., Kaiser, G., Przemeck, G.K.H., Gerst, F., Lorza-Gil, E., Panse, M., Sartorius, T., Hoene, M., Marschall, S., Häring, H.-U., Hrabě de Angelis, M., Ullrich, S., 2017. Point mutation of *Ffar1* abrogates fatty acid-dependent insulin secretion, but protects against HFD-induced glucose intolerance. *Mol Metab* 6, 1304–1312. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.07.007>
- Saisho, Y., Butler, A.E., Manesso, E., Elashoff, D., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2013.  $\beta$ -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care* 36, 111–117. <https://doi.org/10.2337/dc12-0421>
- Saito, K., Iwama, N., Takahashi, T., 1978. Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J Exp Med* 124, 177–186. <https://doi.org/10.1620/tjem.124.177>

- Sale, G.J., Randle, P.J., 1981. Analysis of site occupancies in [32P]phosphorylated pyruvate dehydrogenase complexes by aspartyl-prolyl cleavage of tryptic phosphopeptides. *Eur J Biochem* 120, 535–540. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05733.x>
- Sale, G.J., Randle, P.J., 1980. Incorporation of [32P]phosphate into the pyruvate dehydrogenase complex in rat heart mitochondria. *Biochem J* 188, 409–421. <https://doi.org/10.1042/bj1880409>
- Sangster, T., Major, H., Plumb, R., Wilson, A.J., Wilson, I.D., 2006. A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabolomic analysis. *Analyst* 131, 1075–1078. <https://doi.org/10.1039/b604498k>
- Sansbury, F.H., Flanagan, S.E., Houghton, J. a. L., Shuixian Shen, F.L., Al-Senani, A.M.S., Habeb, A.M., Abdullah, M., Kariminejad, A., Ellard, S., Hattersley, A.T., 2012. SLC2A2 mutations can cause neonatal diabetes, suggesting GLUT2 may have a role in human insulin secretion. *Diabetologia* 55, 2381–2385. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2595-0>
- Saponaro, C., Mühlemann, M., Acosta-Montalvo, A., Piron, A., Gmyr, V., Delalleau, N., Moerman, E., Thévenet, J., Pasquetti, G., Coddeville, A., Cnop, M., Kerr-Conte, J., Staels, B., Pattou, F., Bonner, C., 2020. Interindividual Heterogeneity of SGLT2 Expression and Function in Human Pancreatic Islets. *Diabetes* 69, 902–914. <https://doi.org/10.2337/db19-0888>
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- 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>
- Scalbert, A., Brennan, L., Fiehn, O., Hankemeier, T., Kristal, B.S., van Ommen, B., Pujos-Guillot, E., Verheij, E., Wishart, D., Wopereis, S., 2009. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics* 5, 435–458. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0168-0>
- Scalbert, A., Brennan, L., Manach, C., Andres-Lacueva, C., Dragsted, L.O., Draper, J., Rappaport, S.M., van der Hoof, J.J.J., Wishart, D.S., 2014. The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am J Clin Nutr* 99, 1286–1308. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.076133>
- Scheen, A.J., 2003. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg* 58, 335–341. <https://doi.org/10.1179/acb.2003.58.6.001>
- Schmidt, V., 1986. Ivar Christian Bang (1869-1918), founder of modern clinical microchemistry. *Clin Chem* 32, 213–215.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770–774. <https://doi.org/10.1038/35008096>
- Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., Prentki, M., 1997. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* 272, 18572–18579. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18572>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(91\)91017-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(91)91017-7)

- Schwartz, T.W., 1983. Pancreatic polypeptide: a unique model for vagal control of endocrine systems. *J Auton Nerv Syst* 9, 99–111. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(83\)90134-0](https://doi.org/10.1016/0165-1838(83)90134-0)
- Scott, E.L., 1912. ON THE INFLUENCE OF INTRAVENOUS INJECTIONS OF AN EXTRACT OF THE PANCREAS ON EXPERIMENTAL PANCREATIC DIABETES. *American Journal of Physiology-Legacy* Content 29, 306–310. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1912.29.3.306>
- Sekine, N., Cirulli, V., Regazzi, R., Brown, L.J., Gine, E., Tamarit-Rodriguez, J., Girotti, M., Marie, S., MacDonald, M.J., Wollheim, C.B., 1994. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* 269, 4895–4902.
- Sener, A., Malaisse, W.J., 1980. L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288, 187–189. <https://doi.org/10.1038/288187a0>
- Sener, A., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J., 1981. Stimulation of pancreatic islet metabolism and insulin release by a nonmetabolizable amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5460–5464. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5460>
- Sener, A., Rasschaert, J., Malaisse, W.J., 1990. Hexose metabolism in pancreatic islets. Participation of Ca<sup>2+</sup>(+)-sensitive 2-ketoglutarate dehydrogenase in the regulation of mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1019, 42–50. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90122-k](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90122-k)
- Shah, S.H., Kraus, W.E., Newgard, C.B., 2012. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases: form and function. *Circulation* 126, 1110–1120. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060368>
- Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Rajotte, R.V., 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230–238. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007273430401>
- Shapiro, A.M.J., Pokrywczynska, M., Ricordi, C., 2017. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol* 13, 268–277. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.178>
- Shapiro, H., Shachar, S., Sekler, I., Hershfinkel, M., Walker, M.D., 2005. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.042>
- Shewade, Y.M., Umrani, M., Bhande, R.R., 1999. Large-scale isolation of islets by tissue culture of adult mouse pancreas. *Transplant Proc* 31, 1721–1723. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(99\)00077-9](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(99)00077-9)
- Shi, L., Du, X., Jiang, H., Xie, J., 2017. Ghrelin and Neurodegenerative Disorders-a Review. *Mol Neurobiol* 54, 1144–1155. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9729-1>
- Shiota, C., Rocheleau, J.V., Shiota, M., Piston, D.W., Magnuson, M.A., 2005. Impaired glucagon secretory responses in mice lacking the type 1 sulfonyleurea receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E570–577. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00102.2005>
- Shoshan, M., 2017. On mitochondrial metabolism in tumor biology. *Curr Opin Oncol* 29, 48–54. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000336>
- Shulman, R.G., Rothman, D.L., 1996. Enzymatic phosphorylation of muscle glycogen synthase: a mechanism for maintenance of metabolic homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7491–7495. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7491>

- Sims, E.K., Carr, A.L.J., Oram, R.A., DiMeglio, L.A., Evans-Molina, C., 2021. 100 years of insulin: celebrating the past, present and future of diabetes therapy. *Nat Med* 27, 1154–1164. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01418-2>
- Smith, S., Witkowski, A., Joshi, A.K., 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 42, 289–317. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00067-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00067-x)
- Sola, M.M., Oliver, F.J., Salto, R., Gutiérrez, M., Vargas, A., 1994. Citrate inhibition of rat-kidney cortex phosphofructokinase. *Mol Cell Biochem* 135, 123–128. <https://doi.org/10.1007/BF00926514>
- Sommerweiss, D., Gorski, T., Richter, S., Garten, A., Kiess, W., 2013. Oleate rescues INS-1E  $\beta$ -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>
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., Gruss, P., 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386, 399–402. <https://doi.org/10.1038/386399a0>
- Spégel, P., Andersson, L.E., Storm, P., Sharoyko, V., Göhring, I., Rosengren, A.H., Mulder, H., 2015. Unique and Shared Metabolic Regulation in Clonal  $\beta$ -Cells and Primary Islets Derived From Rat Revealed by Metabolomics Analysis. *Endocrinology* 156, 1995–2005. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1391>
- Spégel, P., Mulder, H., 2020. Metabolomics Analysis of Nutrient Metabolism in  $\beta$ -Cells. *J Mol Biol* 432, 1429–1445. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.020>
- Stark, R., Pasquel, F., Turcu, A., Pongratz, R.L., Roden, M., Cline, G.W., Shulman, G.I., Kibbey, R.G., 2009. Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *J Biol Chem* 284, 26578–26590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011775>
- Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., Unger, R.H., 1982. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31, 694–700. <https://doi.org/10.2337/diab.31.8.694>
- Steiner, D.F., 1982. The biosynthesis of insulin: genetic, evolutionary, and pathophysiologic aspects. *Harvey Lect* 78, 191–228.
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T., 1998. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710–714. <https://doi.org/10.1126/science.279.5351.710>
- Straub, S.G., Sharp, G.W.G., 2007. Inhibition of insulin secretion by cerulenin might be due to impaired glucose metabolism. *Diabetes Metab Res Rev* 23, 146–151. <https://doi.org/10.1002/dmrr.649>
- Straub, S.G., Sharp, G.W.G., 2002. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 451–463. <https://doi.org/10.1002/dmrr.329>
- Sugden, M.C., Holness, M.J., 2011. The pyruvate carboxylase-pyruvate dehydrogenase axis in islet pyruvate metabolism: Going round in circles? *Islets* 3, 302–319. <https://doi.org/10.4161/isl.3.6.17806>
- Sumner, L.W., Mendes, P., Dixon, R.A., 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817–836. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00708-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00708-2)



- Sun, J., Cui, J., He, Q., Chen, Z., Arvan, P., Liu, M., 2015. Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Mol Aspects Med* 42, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.01.001>
- Sun, X., Yu, W., Hu, C., 2014. Genetics of type 2 diabetes: insights into the pathogenesis and its clinical application. *Biomed Res Int* 2014, 926713. <https://doi.org/10.1155/2014/926713>
- Sundler, F., Håkanson, R., Lundquist, I., Larsson, L.I., 1977. Effect of alloxan on rat pancreatic polypeptide (PP) cells. *Cell Tissue Res* 178, 307–312. <https://doi.org/10.1007/BF00218695>
- Supale, S., Li, N., Brun, T., Maechler, P., 2012. Mitochondrial dysfunction in pancreatic  $\beta$  cells. *Trends Endocrinol Metab* 23, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.002>
- Suzuki, K., Kono, T., 1980. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2542–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2542>
- 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>
- Takeuchi, A., Kim, B., Matsuoka, S., 2015. The destiny of Ca(2+) released by mitochondria. *J Physiol Sci* 65, 11–24. <https://doi.org/10.1007/s12576-014-0326-7>
- Talchai, C., Xuan, S., Lin, H.V., Sussel, L., Accili, D., 2012. Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic  $\beta$  cell failure. *Cell* 150, 1223–1234. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029>
- Taneera, J., Lang, S., Sharma, A., Fadista, J., Zhou, Y., Ahlqvist, E., Jonsson, A., Lyssenko, V., Vikman, P., Hansson, O., Parikh, H., Korsgren, O., Soni, A., Krus, U., Zhang, E., Jing, X.-J., Esguerra, J.L.S., Wollheim, C.B., Salehi, A., Rosengren, A., Renström, E., Groop, L., 2012. A systems genetics approach identifies genes and pathways for type 2 diabetes in human islets. *Cell Metab* 16, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.006>
- 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  $\beta$  cells. *Pflugers Arch* 465, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1177-9>
- Tarasov, A.I., Semplici, F., Ravier, M.A., Bellomo, E.A., Pullen, T.J., Gilon, P., Sekler, I., Rizzuto, R., Rutter, G.A., 2012. The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells. *PLoS One* 7, e39722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039722>
- Tattersall, R.B., 2017. The History of Diabetes Mellitus, in: *Textbook of Diabetes*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1002/9781118924853.ch1>
- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., Balaban, R.S., 2000. Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C423–435. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C423>
- Thatava, T., Nelson, T.J., Edukulla, R., Sakuma, T., Ohmine, S., Tonne, J.M., Yamada, S., Kudva, Y., Terzic, A., Ikeda, Y., 2011. Indolactam V/GLP-1-mediated differentiation of human iPS cells into glucose-responsive insulin-secreting progeny. *Gene Ther* 18, 283–293. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.145>

- 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>
- Thompson, J.A., Markey, S.P., 1975. Quantitative metabolic profiling of urinary organic acids by gas chromatography-mass spectrometry: comparison of isolation methods. *Anal Chem* 47, 1313–1321. <https://doi.org/10.1021/ac60358a074>
- Toplak, H., Hoppichler, F., Wascher, T.C., Schindler, K., Ludvik, B., 2016. [Obesity and type 2 diabetes]. *Wien Klin Wochenschr* 128 Suppl 2, S196-200. <https://doi.org/10.1007/s00508-016-0986-9>
- Trock, B.J., 2011. Application of metabolomics to prostate cancer. *Urol Oncol* 29, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2011.08.002>
- Trollinger, D.R., Cascio, W.E., Lemasters, J.J., 2000. Mitochondrial calcium transients in adult rabbit cardiac myocytes: inhibition by ruthenium red and artifacts caused by lysosomal loading of Ca(2+)-indicating fluorophores. *Biophys J* 79, 39–50. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76272-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76272-2)
- 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., 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>
- Underwood, A.H., Newsholme, E.A., 1965. PROPERTIES OF PHOSPHOFRUCTOKINASE FROM RAT LIVER AND THEIR RELATION TO THE CONTROL OF GLYCOLYSIS AND GLUCONEOGENESIS. *Biochem J* 95, 868–875. <https://doi.org/10.1042/bj0950868>
- Unger, R.H., Orci, L., 2010. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16009–16012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006639107>
- v. Mering, J., Minkowski, O., 1890. Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 26, 371–387. <https://doi.org/10.1007/BF01831214>
- Vakilian, M., Tahamtani, Y., Ghaedi, K., 2019. A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene* 706, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.063>
- van der Greef, J., van Wietmarschen, H., van Ommen, B., Verheij, E., 2013. Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO. *Mass Spectrom Rev* 32, 399–415. <https://doi.org/10.1002/mas.21370>
- van Raalte, D.H., Diamant, M., 2011. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S37-46. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70012-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70012-2)
- Van Schaftingen, E., 1993. Glycolysis revisited. *Diabetologia* 36, 581–588. <https://doi.org/10.1007/BF00404065>
- Vecchio, I., Tornali, C., Bragazzi, N.L., Martini, M., 2018. The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 613. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00613>

- Velasquez, C., Vasquez, J.S., Balcazar, N., 2017. In Vitro Effect of Fatty Acids Identified in the Plasma of Obese Adolescents on the Function of Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Diabetes Metab J* 41, 303–315. <https://doi.org/10.4093/dmj.2017.41.4.303>
- Venugopal, S.K., Mowery, M.L., Jialal, I., 2021. C Peptide, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Vetterli, L., Carobbio, S., Pournourmohammadi, S., Martin-Del-Rio, R., Skytt, D.M., Waagepetersen, H.S., Tamarit-Rodriguez, J., Maechler, P., 2012. Delineation of glutamate pathways and secretory responses in pancreatic islets with  $\beta$ -cell-specific abrogation of the glutamate dehydrogenase. *Mol Biol Cell* 23, 3851–3862. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0676>
- Viant, M.R., 2003. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 943–948. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.092>
- Victor, V.M., Rocha, M., Herance, R., Hernandez-Mijares, A., 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Curr Pharm Des* 17, 3947–3958. <https://doi.org/10.2174/138161211798764915>
- Vieira, E., Salehi, A., Gylfe, E., 2007. Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 50, 370–379. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0511-1>
- Vigueira, P.A., McCommis, K.S., Schweitzer, G.G., Remedi, M.S., Chambers, K.T., Fu, X., McDonald, W.G., Cole, S.L., Colca, J.R., Kletzien, R.F., Burgess, S.C., Finck, B.N., 2014. Mitochondrial pyruvate carrier 2 hypomorphism in mice leads to defects in glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Rep* 7, 2042–2053. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.017>
- Vuguin, P.M., Charron, M.J., 2011. Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1, 144–150. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01447.x>
- Wajchenberg, B.L., 2007. beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev* 28, 187–218. <https://doi.org/10.1210/10.1210/er.2006-0038>
- Wallace, J.C., Jitrapakdee, S., Chapman-Smith, A., 1998. Pyruvate carboxylase. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1–5. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00147-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00147-7)
- Wallace, M., Whelan, H., Brennan, L., 2013. Metabolomic analysis of pancreatic beta cells following exposure to high glucose. *Biochim Biophys Acta* 1830, 2583–2590. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.025>
- Wallmeier, J., Samol, C., Ellmann, L., Zacharias, H.U., Vogl, F.C., Garcia, M., Dettmer, K., Oefner, P.J., Gronwald, W., GCKD Study Investigators, 2017. Quantification of Metabolites by NMR Spectroscopy in the Presence of Protein. *J Proteome Res* 16, 1784–1796. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00057>
- Wang, B., Maldonado-Devincci, A.M., Jiang, L., 2020. Evaluating line-broadening factors on a reference spectrum as a bucketing method for NMR based metabolomics. *Anal Biochem* 606, 113872. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113872>
- 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, X., Vatamaniuk, M.Z., Roneker, C.A., Pepper, M.P., Hu, L.G., Simmons, R.A., Lei, X.G., 2011. Knockouts of SOD1 and GPX1 exert different impacts on murine islet function and pancreatic integrity. *Antioxid Redox Signal* 14, 391–401. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3302>

- Wei, L., Hubbard, S.R., Hendrickson, W.A., Ellis, L., 1995. Expression, characterization, and crystallization of the catalytic core of the human insulin receptor protein-tyrosine kinase domain. *J Biol Chem* 270, 8122–8130. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.14.8122>
- Weir, G.C., 2020. Glucolipotoxicity,  $\beta$ -Cells, and Diabetes: The Emperor Has No Clothes. *Diabetes* 69, 273–278. <https://doi.org/10.2337/db19-0138>
- Weir, G.C., Aguayo-Mazzucato, C., Bonner-Weir, S., 2013.  $\beta$ -cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? *Islets* 5, 233–237. <https://doi.org/10.4161/isl.27494>
- Weir, G.C., Butler, P.C., Bonner-Weir, S., 2021. The  $\beta$ -cell glucose toxicity hypothesis: Attractive but difficult to prove. *Metabolism - Clinical and Experimental* 124. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154870>
- Weir, G.C., Samols, E., Loo, S., Patel, Y.C., Gabbay, K.H., 1979. Somatostatin and pancreatic polypeptide secretion: effects of glucagon, insulin, and arginine. *Diabetes* 28, 35–40.
- Weiss, M., Steiner, D.F., Philipson, L.H., 2000. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J.M., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., McGee, E.A., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Singer, F., Stratakis, C.A., Trence, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Weiss, M.A., 2009. Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 284, 19159–19163. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.009936>
- Weiss, R.H., Kim, K., 2011. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 8, 22–33. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.152>
- Weljie, A.M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E., Slupsky, C.M., 2006. Targeted profiling: quantitative analysis of <sup>1</sup>H NMR metabolomics data. *Anal Chem* 78, 4430–4442. <https://doi.org/10.1021/ac060209g>
- Welsh, N., Cnop, M., Kharroubi, I., Bugliani, M., Lupi, R., Marchetti, P., Eizirik, D.L., 2005. Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes* 54, 3238–3244. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3238>
- Wiederkehr, A., Szanda, G., Akhmedov, D., Matakı, 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>
- Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., 2008. Impact of mitochondrial calcium on the coupling of metabolism to insulin secretion in the pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 44, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.004>
- Wiederkehr, A., Wollheim, C.B., 2006. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* 147, 2643–2649. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0057>
- 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, R35–49. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0122>

- Williams, M.D., Reeves, R., Resar, L.S., Hill, H.H., 2013. Metabolomics of colorectal cancer: past and current analytical platforms. *Anal Bioanal Chem* 405, 5013–5030. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6777-5>
- Wilson, J.E., 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* 206, 2049–2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
- Winzell, M.S., Ström, K., Holm, C., Ahrén, B., 2006. Glucose-stimulated insulin secretion correlates with beta-cell lipolysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1, S11-16. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.11.006>
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Marcu, A., Guo, A.C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C., Scalbert, A., 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 46, D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Wolff, M.M., Stephens, W.E., 1953. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Review of Scientific Instruments* 24, 616–617. <https://doi.org/10.1063/1.1770801>
- Wolkowicz, K.L., Aiello, E.M., Vargas, E., Teymourian, H., Tehrani, F., Wang, J., Pinsker, J.E., Doyle, F.J., Patti, M.-E., Laffel, L.M., Dassau, E., 2021. A review of biomarkers in the context of type 1 diabetes: Biological sensing for enhanced glucose control. *Bioeng Transl Med* 6, e10201. <https://doi.org/10.1002/btm2.10201>
- Wollheim, C.B., Sharp, G.W., 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 61, 914–973. <https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.4.914>
- Wright Jr., J.R., McIntyre, L., 2020. Misread and mistaken: Étienne Lancereaux’s enduring legacy in the classification of diabetes mellitus. *J Med Biogr* 0967772020914797. <https://doi.org/10.1177/0967772020914797>
- Xu, J., Han, J., Long, Y.S., Epstein, P.N., Liu, Y.Q., 2008a. The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 51, 2022–2030. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1130-9>
- Xu, J., Han, J., Long, Y.S., Lock, J., Weir, G.C., Epstein, P.N., Liu, Y.Q., 2008b. Malic enzyme is present in mouse islets and modulates insulin secretion. *Diabetologia* 51, 2281–2289. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1155-0>
- Yaney, G.C., Schultz, V., Cunningham, B.A., Dunaway, G.A., Corkey, B.E., Tornheim, K., 1995. Phosphofruktokinase isozymes in pancreatic islets and clonal beta-cells (INS-1). *Diabetes* 44, 1285–1289. <https://doi.org/10.2337/diab.44.11.1285>
- Yang, F., Chen, Y., Xue, Z., Lv, Y., Shen, L., Li, K., Zheng, P., Pan, P., Feng, T., Jin, L., Yao, Y., 2020. High-Throughput Sequencing and Exploration of the lncRNA-circRNA-miRNA-mRNA Network in Type 2 Diabetes Mellitus. *BioMed Research International* 2020, e8162524. <https://doi.org/10.1155/2020/8162524>
- Yang, J., Chi, Y., Burkhardt, B.R., Guan, Y., Wolf, B.A., 2010. Leucine metabolism in regulation of insulin secretion from pancreatic beta cells. *Nutr Rev* 68, 270–279. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00282.x>
- Yang, W., Wang, Y., Zhou, Q., Tang, H., 2008. Analysis of human urine metabolites using SPE and NMR spectroscopy. *Sci. China Ser. B-Chem.* 51, 218–225. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0031-6>
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J.D., Yamamoto, M., Takahashi, S., 2005.

- MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 25, 4969–4976. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.4969-4976>. 2005
- Zhang, Q., Bengtsson, M., Partridge, C., Salehi, A., Braun, M., Cox, R., Eliasson, L., Johnson, P.R.V., Renström, E., Schneider, T., Berggren, P.-O., Göpel, S., Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2007. R-type Ca(2+)-channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nat Cell Biol* 9, 453–460. <https://doi.org/10.1038/ncb1563>
- Zheng, S., Ren, X., Han, T., Chen, Y., Qiu, H., Liu, W., Hu, Y., 2017. Fenofibrate attenuates fatty acid-induced islet  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis via inhibiting the NF- $\kappa$ B/MIF dependent inflammatory pathway. *Metabolism* 77, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.001>