



**HAL**  
open science

# Rôle de l'épitranscriptome dans la physiopathologie de la cellule $\beta$ pancréatique

Florine Bornaque

► **To cite this version:**

Florine Bornaque. Rôle de l'épitranscriptome dans la physiopathologie de la cellule  $\beta$  pancréatique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS059 . tel-03893422

**HAL Id: tel-03893422**

**<https://theses.hal.science/tel-03893422>**

Submitted on 11 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.



**Université de Lille**  
**École Doctorale Biologie-Santé de Lille**

EGID, UMR1283/8199

« (Épi)génétique fonctionnelle et mécanismes du diabète de type 2 et maladies associées »

**Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de**

**Docteur de l'Université de Lille**

**En science de la vie et de la santé**

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**RÔLE DE L'ÉPITRANSCRIPTOME DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE  
LA CELLULE  $\beta$  PANCRÉATIQUE**

Soutenue publiquement le 7 décembre 2021 par

**Florine BORNAQUE**

Membres du Jury :

Président :

Pr. Didier VIEAU

UMRS1172, Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, Lille

Rapporteurs :

Dr. Bertrand BLONDEAU

UMRS938, Centre de recherche Saint Antoine, Paris

Dr. Alexandre DAVID

UMR5203, Institut de génomique fonctionnelle, Montpellier

Examineurs :

Pr. Anne MUHR-TAILLEUX

UMR1011, Institut Pasteur, Lille

Dr. Catherine POSTIC

U1016/UMR8104, Institut Cochin, Paris

Directeur de thèse :

Dr. Jean-Sébastien ANNICOTTE

UMR1283, EGID, Lille



# Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements à tous les membres du jury pour avoir accepté d'apporter leur expertise au cours de ma soutenance, ainsi que pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir autour de mon projet de thèse. Je remercie le Docteur Alexandre David et le Docteur Bertrand Blondeau pour leur participation en tant que rapporteurs et leur investissement dans la correction de mon manuscrit. Je remercie également le Docteur Catherine Postic et le Professeur Anne Muhr-Tailleux qui ont accepté de juger mon travail en tant qu'examinatrices. Enfin, je souhaite remercier le Professeur Didier Vieau pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de présider ma soutenance.

Je souhaite également remercier le Docteur Yasmine Sebti et le Docteur Bertrand Blondeau qui ont accepté de suivre mon projet de thèse tout au long de mon parcours en participant aux comités de suivi individuel. Je vous remercie pour tous vos conseils et les échanges instructifs que nous avons pu avoir sur le projet m<sup>6</sup>A pendant ces 3 années.

Je voudrais aussi remercier le personnel de l'UMR1283 pour leur accueil lors de mon arrivée dans le laboratoire. Un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ma thèse pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, le Docteur Jean-Sébastien Annicotte, qui m'a donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci pour ton encadrement, ta bienveillance et ton enthousiasme pour le projet m<sup>6</sup>A, qui m'ont permis de m'épanouir pendant ces années de thèse tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je souhaite également te remercier pour la confiance que tu m'as accordé durant cette période. Même si c'était parfois difficile, tu as fait ton maximum pour que ce projet se déroule dans les meilleures conditions possibles. J'ai eu beaucoup de chance de faire partie de ton équipe.

Un grand merci à tous mes collègues et surtout amis, qui ont fait partie de cette équipe 2. Je n'aurai pas pu aller jusqu'au bout de ma thèse sans vous et votre bonne humeur quotidienne. Vous avez tous, de près comme de loin, contribué au bon déroulement de ces 3 années de thèse.

Fred et Christophe, je vous remercie pour tout l'intérêt porté envers mon projet, vos conseils avisés et les nombreuses discussions scientifiques que nous avons partagées.

Clément, merci pour toute l'aide précieuse que tu m'as apportée au cours de ma thèse, pour les expérimentations comme pour les corrections du papier et du manuscrit. Chacha et Emilie j'ai beaucoup appris sur l'expérimentation animale et l'isolement d'îlots grâce à vous, merci pour vos enseignements. Je remercie Laure et Maeva pour leur aide indispensable quant à la gestion des commandes mais également pour certaines expérimentations. Cyril, merci pour les réponses et les conseils que tu m'as apportés concernant les manip, mais aussi la thèse et son déroulement.

Je souhaite également vous remercier ainsi que les autres membres de l'équipe que je n'ai pas encore nommé, Nawel, Jessica, Bryan, Yasmina, et Arnaud, pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, que ce soient dans les bureaux ou lors de nos diverses sorties. J'ai adoré partager avec vous ces nombreuses conversations, drôles et parfois étranges. Je suis très heureuse d'avoir travaillé à vos côtés. Je vous souhaite, à tous, le meilleur pour la suite de vos aventures.

Je tiens à remercier toute ma famille, qui a toujours été présente pour moi. Rien n'aurait été possible sans vous et votre soutien indéfectible. Je souhaite plus particulièrement remercier, du fond du cœur, les femmes les plus importantes de ma vie : ma mère, ma grand-mère, et mes sœurs. Vous avez cru en moi pendant toutes ces années, quel que soient mes choix et vous m'avez toujours encouragé à donner le meilleur de moi-même. Un grand merci également à ma belle-famille, qui a suivi mon projet pendant ces nombreuses années. J'ai énormément de chance d'avoir une belle-famille comme vous. Vous m'avez toujours accueillie à bras ouverts, avec gentillesse et bienveillance.

Je remercie également mes amis de longue date Clémence, Ingrid, Thomas et Nico, qui pour certains suivent l'évolution de mon projet depuis près de 10 ans. Merci Ingrid et Clémence, pour les nombreuses soirées pyjama qui me manquent tellement. On a encore pas mal de soirées à rattraper tous ensemble pour combler le retard accumulé de ces derniers temps. Merci à toi Nico pour ta gentillesse sans faille, et les nombreuses soirées jeux de société passées à l'appart.

Enfin, je ne peux pas terminer sans remercier mon chéri, Xavier, qui m'a accompagné tout au long de mon parcours depuis maintenant 7 ans. Merci d'avoir pris soin de moi et de m'avoir cuisiné tes bons petits plats, tous les jours, pendant l'écrit de ce manuscrit. Merci également pour ta patience et ton soutien quotidien. Tu m'as écoutée avec attention pendant ces 3 ans lorsque je te parlais de sciences et de méthylation de l'ARN. Tu as su m'encourager pour aller de l'avant alors que je baissais les bras. Merci infiniment pour tous ces moments de bonheur et d'amour que tu m'as donné. Je t'aime.



« Nous changeons tous, quand on y réfléchit bien. Nous sommes tous plusieurs personnes et cela tout au long de nos vies. On doit continuer à avancer tant que l'on se souvient des différentes personnes que nous avons été. »

**M. Smith**

« La plus belle chose que nous puissions éprouver, c'est le côté mystérieux de la vie. »

**A. Einstein**



# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>12</b>
<b>Table des Figures</b> .....	<b>16</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>18</b>
I.    Maintien de l'homéostasie glycémique.....	18
A.  Cas de l'hypoglycémie .....	18
B.  Cas de l'hyperglycémie.....	20
II.   Le pancréas .....	23
A.  Organisation et fonction .....	23
B.  Développement embryonnaire du pancréas .....	25
III.  Le diabète.....	30
A.  Epidémiologie et caractéristiques principales.....	30
B.  Les différents types de diabète .....	30
C.  Le développement du diabète de type 2 .....	31
IV.  Dysfonction des cellules $\beta$ pancréatiques au cours du diabète de type 2 .....	33
A.  Stress du réticulum endoplasmique.....	33
B.  Stress oxydatif et altération de la fonction mitochondriale.....	36
C.  Inflammation .....	38
D.  IAPP et plaques amyloïdes .....	39
E.  Perte d'identité des cellules $\beta$ pancréatiques .....	40
V.    Facteurs de risques et étude génétique/épigénétique du diabète de type 2.....	43
A.  Facteurs génétiques .....	43
B.  Facteurs environnementaux et épigénétiques .....	43
VI.  L'épitranscriptomique.....	45
A.  La pseudouridine, première modification de l'ARN identifiée .....	46
B.  Exemples de méthylation de l'ARN .....	47
C.  La méthylation $m^6A$ .....	51
1.  Généralités.....	51
2.  La méthylation $m^6Am$ .....	54
3.  Les méthyltransférases $m^6A$ .....	55
4.  Les déméthylases $m^6A$ .....	60
5.  Les protéines « readers ».....	62
6.  Lien entre le métabolisme et co-facteurs des méthyltransférases et déméthylases .....	64
7.  Rôle physiologique de la méthylation $m^6A$ des ARN.....	67
8.  Implication physiopathologique de la méthylation $m^6A$ .....	69
9.  Méthylation $m^6A$ et diabète de type 2 .....	71
<b>Données préliminaires</b> .....	<b>73</b>

<b>Objectifs .....</b>	<b>76</b>
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>77</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>83</b>
I.    Importance du glucose dans la régulation de la méthylation m <sup>6</sup> A .....	83
A.    Quantification de la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN .....	83
B.    Étude des variations d'expression et de localisation cellulaire des méthyltransférases et déméthylases .....	86
II.   Effet du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m <sup>6</sup> A des cellules β .....	89
A.    Effet du traitement glucolipotoxique sur le stress du réticulum endoplasmique et la sécrétion d'insuline ..	89
B.    Effets du palmitate sur la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN et l'expression des enzymes.....	92
III.  Rôle du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m <sup>6</sup> A des îlots pancréatiques humains.....	94
A.    Effet du traitement glucolipotoxique sur le stress du réticulum endoplasmique.....	94
B.    Effets du palmitate sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN .....	96
IV.   Rôle du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m <sup>6</sup> A des cellules α pancréatiques. ....	98
V.    Rôle des enzymes m <sup>6</sup> A dans la régulation de l'identité et de la fonction des cellules β et l'îlot pancréatique.....	100
A.    Effets des siRNA dirigés contre les méthyltransférases et déméthylases sur les cellules β pancréatiques ..	100
B.    Effet de l'inhibiteur pharmacologique de la déméthylase FTO.....	103
VI.   Données supplémentaires .....	105
A.    Utilisation d'un modèle de souris invalidées pour la déméthylase FTO .....	105
B.    Mise en place d'un protocole d'immunoprécipitation de la méthylation m <sup>6</sup> A pour séquençage ARN .....	110
<b>Discussion et Perspectives.....</b>	<b>112</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>118</b>
<b>Références.....</b>	<b>121</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>147</b>



# Résumé

La prévalence du diabète dans le monde ne cesse d'augmenter, avec une estimation de 700 millions de malades en 2045. La compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la maladie est devenue un enjeu majeur de santé publique pour limiter la progression du diabète dans le monde.

Le diabète de type 2 (DT2) se caractérise par une hyperglycémie chronique causée par une résistance à l'insuline des tissus périphériques et une perte de fonction et/ou de masse des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ces cellules, présentes dans les îlots de Langerhans, interviennent dans la régulation de l'homéostasie glucidique en sécrétant de l'insuline, une hormone hypoglycémisante qui agit sur différents tissus, comme le foie, le muscle ou le tissu adipeux. Le dysfonctionnement physiopathologique des cellules  $\beta$ , suite à de nombreux stress cellulaires (stress oxydatif, stress du réticulum endoplasmique, inflammation), est à l'origine du développement du DT2.

Outre les facteurs génétiques, l'obésité induite par un régime riche en graisses et en glucides, l'inactivité physique et le vieillissement sont considérés comme des facteurs de risques environnementaux majeurs du développement du DT2. Ces facteurs peuvent induire des modifications épigénétiques sur l'ADN (méthylation des cytosines) ou les histones (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination), altérant l'expression des gènes.

D'autres aspects de la régulation de l'expression des gènes sont peu étudiés dans le contexte du diabète de type 2. En effet, les ARN peuvent également être soumis à des modifications chimiques sensibles aux signaux environnementaux, comme pour l'ADN. Ces modifications épitranscriptomiques, correspondent à l'ensemble des modifications chimiques et réversibles de l'ARN, la plus répandue étant la méthylation  $m^6A$ , en position N6 de l'adénosine. Le groupement méthyle est ajouté par un complexe protéique composé, notamment, des méthyltransférases METTL3 et METTL14 et peut être retiré par les déméthylases ALKBH5 ou FTO. Ces modifications pourront être reconnues par des protéines cytoplasmiques ou nucléaires, qui affecteront la traduction, l'épissage, la stabilité, la structure ou la localisation des ARN.

Cette modification intervient dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques. Toutefois, son rôle au cours du DT2 est encore peu connu, même s'il a été récemment démontré que la méthylation  $m^6A$  pouvait être altérée dans l'îlot pancréatique et affecter la sécrétion d'insuline.

Nous avons émis l'hypothèse que l'environnement, par le biais de variations de la glycémie ou des concentrations d'acides gras libres dans le sang, pourrait induire des changements de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN et conduire au dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du DT2.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent une diminution significative de la méthylation m<sup>6</sup>A en présence d'une concentration élevée de glucose, chez la souris et dans des îlots obtenus de donneurs humains, associée à une augmentation d'expression des déméthylases m<sup>6</sup>A. Le palmitate induit l'effet inverse avec une augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A et une réduction d'expression des déméthylases. De plus, l'utilisation de siRNA et d'inhibiteurs spécifiques démontre que ces enzymes modulent l'expression de gènes impliqués dans l'identité des cellules  $\beta$  et la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

Ces résultats, associés aux données de la littérature, suggèrent que les variations en glucose régulent la méthylation m<sup>6</sup>A, qui joue un rôle clé dans le contrôle de l'expression des gènes de l'identité et de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques. Nos résultats mettent en évidence de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans la physiopathologie du diabète de type 2 et peuvent donc contribuer à une meilleure compréhension de l'étiologie de cette maladie.

# Abstract

The prevalence of diabetes in the world continues to increase, with an estimate of 700 million patients by 2045. Understanding the mechanisms involved in the development of the disease has become a major public health issue to prevent the progression of diabetes in the world.

Type 2 diabetes (T2D) is characterized by chronic hyperglycemia ( $> 1.26$  g / L) caused by insulin resistance in peripheral tissues and loss of function and / or mass of pancreatic  $\beta$  cells. These cells, present in the islets of Langerhans, are involved in the regulation of carbohydrate homeostasis by secreting insulin, a hypoglycemic hormone that acts on various tissues sensitive to insulin, such as the liver, muscle or adipose tissue. The pathophysiological dysfunction of  $\beta$  cells, following numerous cellular stresses (oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation, etc.), is at the origin of the development of T2D.

In addition to genetic factors, obesity induced by a diet rich in fats and sugars, physical inactivity and aging are considered to be major environmental risk factors for the development of T2DM. These factors modify the environment of the cells and cause chemical modifications of DNA (methylation of cytosines) or histones (acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination), called epigenetic modifications, thus modulating the expression of many genes and altering, in particular, the identity or function of pancreatic  $\beta$  cells.

Other aspects of the regulation of gene expression are little studied in the context of type 2 diabetes. Indeed, RNAs can also be subjected to chemical changes sensitive to environmental signals, such as DNA. These epitranscriptomic modifications correspond to the chemical and reversible modifications of RNA, the most common is m<sup>6</sup>A methylation, at position N6 of adenosine. The methyl group is added by a protein complex composed in particular of methyltransferases METTL3 and METTL14 and can be removed by demethylases ALKBH5 or FTO. These modifications can be recognized by cytoplasmic or nuclear proteins, which will affect the translation, splicing, stability, structure or localization of RNAs.

This modification is involved in many physiological and pathophysiological processes. However, its role in T2D is still poorly understood, although it has recently been shown that m<sup>6</sup>A methylation may be altered in the pancreatic islet and affect insulin secretion.

Thus, in this thesis work, we hypothesized that the environment, through variations in glycemia or free fatty acid concentrations in the blood, could induce changes in the m<sup>6</sup>A methylation of RNAs and lead to pancreatic  $\beta$  cell dysfunction during T2D.

The results obtained during this thesis show a significant decrease in m<sup>6</sup>A methylation in the presence of a high concentration of glucose, both in mice and in islets obtained from human donors, associated with altered expression levels of m<sup>6</sup>A demethylases. Palmitate induces the opposite effect with an increase in m<sup>6</sup>A methylation and a reduction in the expression of demethylases. In addition, the use of siRNA and/or specific inhibitors demonstrates that these enzymes modulate the expression of genes involved in the identity of pancreatic  $\beta$  cells and insulin secretion stimulated by glucose.

These results, combined with data from the literature, suggest that changes in glucose concentration regulate m<sup>6</sup>A methylation, which plays a key role in controlling gene expression for the identity and function of pancreatic  $\beta$  cells. Thus, our results highlight new mechanisms potentially involved in the pathophysiology of type 2 diabetes and may therefore contribute to a better understanding of the etiology of this disease.

# Abréviations

Ψ : pseudouridine

## - A -

AAV : Adeno-associated virus  
ADCY5 : Adenylate cyclase 5  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADP : Adénosine diphosphate  
AgRP : Agouti-related protein  
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien  
AKT : Protein kinase B  
ALDH1A3 : Aldehyde dehydrogenase 1 family member A3  
ALKBH1 : AlkB homolog protein 1  
ALKBH3 : AlkB homolog protein 3  
ALKBH5 : AlkB homolog protein 5  
AMP : Adenosine monophosphate  
AMPK : AMP-activated protein kinase  
ARIDB5 : AT-rich interactive domain 5B  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNe : ARN enhancer  
ARNInc : ARN long non codant  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomique  
ARNsn : petit ARN nucléaire  
ARNt : ARN de transfert  
ARNvt : ARN vault  
ARX : Aristaless-related homeobox  
ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1  
ATF4 : Activating transcription factor 4  
ATF6 : Activating transcription factor 6  
ATP : Adenosine triphosphate  
AUC : Area under curve

## - B -

BACH1 : BTB domain and CNC homolog 1  
BAK : BCL2 antagonist/killer  
BAX : BCL-2-associated X  
BCL-2 : B-cell lymphoma 2  
BIP : Binding immunoglobulin protein  
BMP : Bone morphogenic protein  
BNIP3 : BCL2 interacting protein 3  
BSA : Bovin serum albumin

## - C -

CAPAM : Cap specific adenosine methyltransferase  
CCL2 : C-C motif chemokine ligand 2  
CCL3 : C-C motif chemokine ligand 3  
CCR4-NOT : carbon catabolite repression 4 negative on TATA-less  
CD : Chow diet  
CDKN2A : Cyclin dependent kinase inhibitor 2A  
CDS : Coding DNA sequence  
CHOP : CEBP homologous protein  
ChREBP : Carbohydrate response element binding protein  
CK1δ : Casein kinase 1 isoform delta  
COX7A1 : Cytochrome C oxidase subunit 7A1  
CPSF5 : Cleavage and polyadenylation specific factor 5  
CPSF6 : Cleavage and polyadenylation specific factor 6  
CPT-1α : Carnitine palmitoyltransferase 1α  
CXCL8 : C-X-C motif chemokine ligand 8

## - D -

DAPI : Diaminido phenyl indol  
DGAT2 : Diacylglycerol O-acyltransferase 2  
DGCR8 : DiGeorge syndrome critical region 8  
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium  
DNMT2 : DNA Methyltransferase 2  
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate  
DPI : Di-sulphide isomerase

## - E -

ECL : Enhanced chemiluminescent  
EGFR : Epidermal growth factor receptor  
EIF2a : Eukaryotic translation initiation factor 2A  
EIF3 : Eukaryotic translation initiation factor 3  
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay  
ER : oestrogen receptor  
ERAD : ER-associated degradation  
ERSE : éléments de réponse au stress endoplasmique

**- F -**

f<sup>5</sup>C : formylcytosine  
FAS : Fas Cell Surface Death Receptor  
FASN : Fatty acid synthase  
FGF10 : Fibroblast growth factor 10  
FGF2 : Fibroblast growth factor 2  
FOXO1 : Forkhead box O1  
FTO : Fat mass and obesity-associated protein

**- G -**

G6PC : Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit  
GCK : Glucokinase  
GE : Glucose excited (neurons)  
GI : Glucose inhibited (neurons)  
GIP : Glucose-dependent insulin releasing polypeptide  
GLP-1 : Glucagon-like peptide-1  
GLP-1R : GLP-1 receptor  
GLUT2 : Glucose transporter 2  
GLUT4 : Glucose transporter 4  
GRP78 : Glucose-Regulated Protein, 78kDa  
GRP94 : Glucose-Regulated Protein, 94kDa  
GSIS : Glucose-stimulated insulin secretion

**- H -**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
HAKAI : E3 ubiquitin-protein ligase HAKAI  
HCMV : Human cytomegalovirus  
HES1 : Hairy and enhancer of split-1  
HFD : High fat diet  
HHEX : Hematopoietically expressed homeobox  
HK2 : Hexokinase 2  
HNF6 : Hepatocyte nuclear factor 6  
hnRNPA2B1 : Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1  
hnRNPC : Heterogeneous Nuclear ribonucleoprotein C  
hnRNPG : Heterogeneous Nuclear ribonucleoprotein G  
HO : Hydroxyle

**- I -**

IAPP : Islet amyloid polypeptide  
IDH1,2 : isocitrate dehydrogenase 1,2  
IFN- $\alpha$  : Interferon  $\alpha$   
IFN- $\beta$  : Interferon  $\beta$   
IFN- $\gamma$  : Interferon  $\gamma$   
IGF1 : insulin-like growth factor-1

IGF2BP1 : Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1  
IGF2BP2 : Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2  
IGF2BP3 : Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3  
IL-1R1 : Interleukin 1 receptor type 1  
IL-1 $\beta$  : Interleukin 1  $\beta$   
IMC : Indice de masse corporelle  
iNOS : Inducible nitric oxide synthase  
INS : Insuline  
IPGTT : Intraperitoneal glucose tolerance test  
IRE-1a : Inositol-requiring element 1a  
IRX3 : Iroquois homeobox 3  
IRX5 : Iroquois homeobox 5

**- J -**

JAK : Janus Kinase  
JNK : c-Jun N-terminal kinase

**- K -**

KAT2B : Lysine acetyltransferase 2B  
KCNJ11/ KIR6.2: Potassium channel subfamily J member 11  
KRB : Krebs-Ringer

**- M -**

m<sup>1</sup>A : N1-méthyladénosine  
m<sup>6</sup>A : N6-méthyladénosine  
m<sup>6</sup>Am : 2'-O-méthyladénosine  
m<sup>5</sup>C : 5-méthylcytosine  
m<sup>7</sup>G : 7-méthylguanosine  
MAFA : MAF bZIP transcription factor A  
MAFB : MAF bZIP transcription factor B  
MALAT1 : metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1  
MAP3K6 : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6  
MAT1A : : Methionine adenosyltransferase 1A  
MAT2A : Methionine adenosyltransferase 2A  
MAT2B : : Methionine adenosyltransferase 2B  
MeRIP-seq :Methylation RNA immunoprecipitation and sequencing  
METTL1 : Methyltransferase-like 1  
METTL3 : Methyltransferase-like 3  
METTL4 : Methyltransferase-like 4  
METTL5 : Methyltransferase-like 5  
METTL14 : Methyltransferase-like 14

METTL16 : Methyltransferase-like 16  
MIP : Mouse insulin promoter  
miRNA : microARN  
MIST1 : Muscle, intestine and stomach  
expression 1  
MODY : Maturity onset diabetes of the young  
MTD : Methyltransferase domain  
MTERF4 : Mitochondrial transcription  
termination factor 4)

**- N -**

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide  
phosphate  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B  
NGN3 : Neurogenin-3  
NKX2.2 : NK2 homeobox 2  
NKX6.1 : NK6 homeobox 1  
NLRP3 : NLR family pyrin domain containing 3  
NLS : Nuclear localization signal  
NML : Nucleomethylin  
NO : Nitric oxide  
NPY : Neuropeptide Y  
NSUN1 à 7 : NOP2/Sun RNA methyltransferases  
NXF1 : Nuclear RNA Export Factor 1

**- O -**

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Superoxyde anion  
ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite

**- P -**

PAS : Polyadenylation site  
Pax4 : Paired box 4  
Pax6 : Paired box 6  
PBS : Phosphate-buffered saline  
PCAF : P300/CBP-associated factor  
PCR : Polymerase chain reaction  
PDX1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1  
PERK : Protein kinase RNA-like endoplasmic  
reticulum kinase  
POMC/CART : proopiomelanocortin / cocaine-  
and amphetamine-regulated transcript  
PPARGC1A : Peroxisome proliferator-activated  
receptor- $\gamma$  coactivator-1  
PTF1a : Pancreas associated transcription factor  
1a  
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

**- Q -**

qPCR : quantitative PCR

**- R -**

RBBP5 : Retinoblastoma-binding protein 5  
RBM15 : RNA-Binding Motif-protein 15  
RE : Réticulum endoplasmique  
RluA : Dual-specificity RNA pseudouridine  
synthase  
ROS : Reactive oxygen species  
RPMI : Roswell park memorial institute medium  
RsuA : Ribosomal small subunit pseudouridine  
synthase A  
RT-qPCR : retrotranscription qPCR  
RUNX1T1 : Runt-related transcription factor 1

**- S -**

S1P : Site 1 protease  
S2P : Site 2 protease  
SAH : S-adénosylhomocystéine  
SAM : S-adénosylméthionine  
SHH : Sonic hedgehog  
siRNA : Small interfering RNA  
SOCS2 : Suppressor of cytokine signaling 2  
SOCS3 : Suppressor of cytokine signaling 3  
SOX9 : SRY-box transcription factor 9  
SRSF3 : Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3  
STAT : Signal transducer and activator of  
transcription  
SUMO1 : Small Ubiquitin Like Modifier 1  
SVF : Sérum de veau foetal

**- T -**

TAZ : Tafazzin  
TBS : TRIS-buffered saline  
TCF7L2 : Transcription factor 7 like 2  
TE Buffer : Tampon Tris-EDTA  
TLR2 : Toll like receptor 2  
TLR4 : Toll like receptor 4  
TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
TRAF-2 : TNF receptor associated factor 2  
TRMT6/61 : tRNA methyltransferase 6/61  
TRMT112 : RNA methyltransferase activator  
subunit 11-2  
TruA : tRNA pseudouridine synthase A  
TruB : tRNA pseudouridine synthase B  
TruD : tRNA pseudouridine synthase D  
TXNIP : Thioredoxin-interacting protein

**- U -**

UCN3 : Urocortin 3

uOF : Upstream open reading frame

UPR : Unfolded protein response

USP5 : Ubiquitin Specific Peptidase 5

UTR : Untranslated transcribed region

**- V -**

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFA Vascular endothelial growth factor A

VIRMA : Vir-like m<sup>6</sup>A methyltransferase  
associated

**- W -**

WBSCR22 : Williams-Beuren syndrome critical  
region 22

WDR4 : WD repeat domain 4

WTAP : Wilms' tumor 1-associating protein

**- X -**

XBP1 : X-Box Binding Protein 1

XBP1s : X-Box Binding Protein 1 (spliced)

XIST : X-inactive specific transcript

**- Y -**

YTH : YT521-B homology

YTHDC1 : YTH domain containing 1

YTHDC2 : YTH domain containing 2

YTHDF1 : YTH N6-methyladenosine RNA binding  
protein 1

YTHDF2 : YTH N6-methyladenosine RNA binding  
protein 2

YTHDF3 : YTH N6-methyladenosine RNA binding  
protein 3

**- Z -**

ZC3H13 : Zinc finger CCCH-type containing 13

ZCCHC4 : Zinc finger CCHC-type containing 4

ZFD : Zinc finger domain



# Table des Figures

Figure 1 : Interaction inter-organes au cours d'une hypoglycémie. ....	20
Figure 2 : Interaction inter-organes dans la régulation de la glycémie post-prandiale. ....	22
Figure 3 : Organisation du pancréas humain.....	24
Figure 4 : Pancréas et organisation des îlots pancréatiques murins.....	24
Figure 5 : Interactions entre les différents tissus embryonnaires lors du bourgeonnement pancréatique... ..	25
Figure 6 : Interaction du mésoderme cardiaque avec l'endoderme ventral.....	26
Figure 7 : Étapes du développement pancréatique. ....	27
Figure 8: Délamination des progéniteurs endocrines au stade E15.5.....	28
Figure 9: Les différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des lignées cellulaires du pancréas. ....	29
Figure 10 : Evolution du diabète de type 2 au cours de temps.....	32
Figure 11 : Activation de la réponse UPR par accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique.....	34
Figure 12 : Le glucose induit la production d'espèces réactives à l'oxygène dans le cytoplasme et la mitochondrie.....	37
Figure 13 : Activation de l'inflammation dans la cellule $\beta$ pancréatique, production de cytokines pro-inflammatoires et recrutement des macrophages au cours du diabète de type 2.....	38
Figure 14 : Mécanismes conduisant à la formation des plaques amyloïdes au cours du diabète de type 2. .	40
Figure 15 : Dédifférenciation et transdifférenciation des cellules $\beta$ pancréatiques au cours du diabète de type 2.....	41
Figure 16: Exemples de la diversité des modifications épitranscriptomiques chez les archées, bactéries et eucaryotes. ....	45
Figure 17 : Isomérisation de l'uridine par rotation de $180^\circ$ de l'uracile. ....	46
Figure 18 : Localisation et cibles des différentes méthyltransférases impliquées dans la méthylation $m^5C$ de l'ARN.....	47
Figure 19 : Localisation et cibles des différentes méthyltransférases et déméthylases impliquées dans la méthylation $m^1A$ de l'ARN.....	49
Figure 20 : Traitement chimique des ARN méthylés en $m^7G$ avant séquençage.....	51
Figure 21: Localisation de la méthylation $m^6A$ sur l'ARNm.....	52
Figure 22: Méthylation $m^6A$ et déméthylation de l'ARNm.....	53
Figure 23: Méthylation $m^6Am$ de l'ARNm en 5'UTR par la méthyltransférase CAPAM. ....	54
Figure 24 : Structure des domaines méthyltransférases (MTD) de METTL3 et METTL14.....	56
Figure 25 : Composition du complexe méthyltransférase. ....	57
Figure 26 : Modèle de recrutement du complexe méthyltransférase au cours de la transcription. ....	58
Figure 27 : Régulation de l'expression de MAT2A et de la production de SAM par la méthyltransférase METTL16.....	59
Figure 28 : Le locus Fto régule l'expression de IRX3 et IRX5 de manière $m^6A$ -indépendante. ....	60
Figure 29 : Les déméthylases impliquées dans le retrait de la méthylation $m^6A$ . ....	61
Figure 30 : Fonction des différentes protéines « readers » impliquées dans la reconnaissance de la méthylation $m^6A$ .....	64
Figure 31 : Cycle de régénération de la S-adénosyl methionine. ....	65
Figure 32 : Production de l'alpha cétylglutrate au cours du cycle de Krebs. ....	66
Figure 33: Inactivation du chromosome X par l'intervention du complexe méthyltransférase. ....	67

Figure 34 : Impact de l'invalidation de Kat2b sur la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les îlots pancréatiques murins.....	74
Figure 35 : Effets de l'inhibition de KAT2B par utilisation de siRNA sur la méthylation m <sup>6</sup> A de l'ARN dans les îlots pancréatiques humains. ....	74
Figure 36 : Effets du glucose sur la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les cellules Min6.....	84
Figure 37 : Effets du glucose sur la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les îlots pancréatiques humains non diabétiques.....	85
Figure 38 : Effets du glucose sur l'expression des ARNm Alkbh5, Fto et Mettl3. ....	86
Figure 39 : Effets du glucose sur la localisation de la méthyltransférase METTL3 et de la déméthylase ALKBH5. ....	88
Figure 40 : Étude de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique. ....	90
Figure 41 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose après un traitement palmitate et glucose de 72h des cellules β pancréatiques. ....	91
Figure 42 : Effets du palmitate sur la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les cellules Min6.....	92
Figure 43 : Effets du palmitate associé au glucose sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les cellules β pancréatiques. ....	93
Figure 44 : Étude de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique. ....	94
Figure 45 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose après un traitement palmitate et glucose de 72h des îlots pancréatiques humains. ....	95
Figure 46 : Effets du palmitate associé au glucose sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les îlots pancréatiques humains.....	96
Figure 47 : Étude de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules α pancréatiques.....	98
Figure 48 : Effets du palmitate associé au glucose sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m <sup>6</sup> A des ARN dans les cellules α pancréatiques. ....	99
Figure 49 : Effets des différents siRNA sur l'expression des enzymes m <sup>6</sup> A dans les cellules Min6.....	100
Figure 50 : Effets des siRNA dirigés contre Alkbh5, Fto ou Mettl3 sur l'expression des gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques. ....	101
Figure 51 : Effets des différents siRNA utilisés sur la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques. ....	103
Figure 52 : Effets du bisanrène sur la sécrétion d'insuline des cellules β et des îlots pancréatiques de souris. ....	103
Figure 53 : Construction du modèle de souris Fto-Flox avant et après invalidation par la Cre recombinase. ....	105
Figure 54 : Test métabolique et étude de l'expression de Fto dans les îlots de souris invalidées femelles. ....	107
Figure 55 : Test métabolique et étude de l'expression de Fto dans les îlots de souris invalidées mâles. ....	109
Figure 56 : Etapes de l'immunoprécipitation de la méthylation m <sup>6</sup> A pour séquençage des ARN méthylés. ....	110
Figure 57 : Immunoprécipitation de la méthylation m <sup>6</sup> A et qPCR des ARNm de Ins1, Ins2 et MafA des cellules Min6.....	111
Figure 58 : Les variations de concentrations en glucose impactent la méthylation m <sup>6</sup> A ainsi que l'expression et la localisation des enzymes dans les cellules β pancréatiques. ....	119
Figure 59 : Rôles des méthyltransférases et déméthylases dans la fonction et l'identité des cellules β pancréatiques.....	120

# Introduction

## I. Maintien de l'homéostasie glycémique

Le glucose est la principale ressource énergétique de l'organisme. Il est assimilé par l'intestin au cours d'un repas et atteint la circulation sanguine pour alimenter l'ensemble des cellules de l'organisme. Le catabolisme du glucose permet de produire une grande quantité de molécules d'ATP (Adénosine triphosphate), par la glycolyse et le cycle de Krebs.

Le taux de glucose dans le sang, ou glycémie, varie de manière importante au cours de la journée. Après un repas, la glycémie augmente de manière transitoire pour revenir à la normale après quelques heures, avec une valeur comprise entre 0,8 et 1,2 g/L chez l'Homme (4 à 6 mM de glucose). A l'inverse, la glycémie diminue entre les repas, au cours d'activités physiques ou lors de périodes de jeûne.

Une hypoglycémie prolongée est nocive pour l'organisme, les besoins énergétiques des cellules étant constants. De même, une hyperglycémie prolongée est également délétère. Ces conditions provoquent toutes deux un stress oxydatif et un dysfonctionnement cellulaire pouvant aller jusqu'à l'apoptose (Kato et al., 2019). La glycémie doit donc être finement régulée pour maintenir un équilibre entre l'apport de glucose dans le sang et la consommation du glucose par les cellules. L'organisme a donc mis en place de nombreux mécanismes de régulation de la glycémie par l'action de divers organes et l'instauration d'un dialogue multi-tissulaire (Castillo-Armengol et al., 2019).

Les variations de concentrations en glucose peuvent être détectées par différents types cellulaires. Par exemple, deux types de neurones spécialisés sont capables de détecter des variations de la glycémie : les neurones activés par l'hyperglycémie (neurones GE « glucose excited ») ou par l'hypoglycémie (neurones GI, « glucose inhibited »)(Routh, 2002). Les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  pancréatiques situés dans les îlots de Langerhans, sont d'autres exemples de cellules sensibles au glucose qui seront décrites ultérieurement. Ces différentes cellules répondent en conséquence par messages nerveux ou hormonaux, qui seront ensuite reconnus par les différents organes cibles.

### A. Cas de l'hypoglycémie

En période de jeûne (Figure 1), l'épithélium gastrique sécrète la ghréline lorsque l'estomac est vide (Ariyasu et al., 2001). Cette hormone agit au niveau du cerveau pour augmenter la prise alimentaire.

Elle induit la synthèse de neuropeptides orexigènes NPY (neuropeptide Y) et AgRP (agouti-related protein) qui stimulent l'appétit et la prise alimentaire (Kamegai et al., 2001).

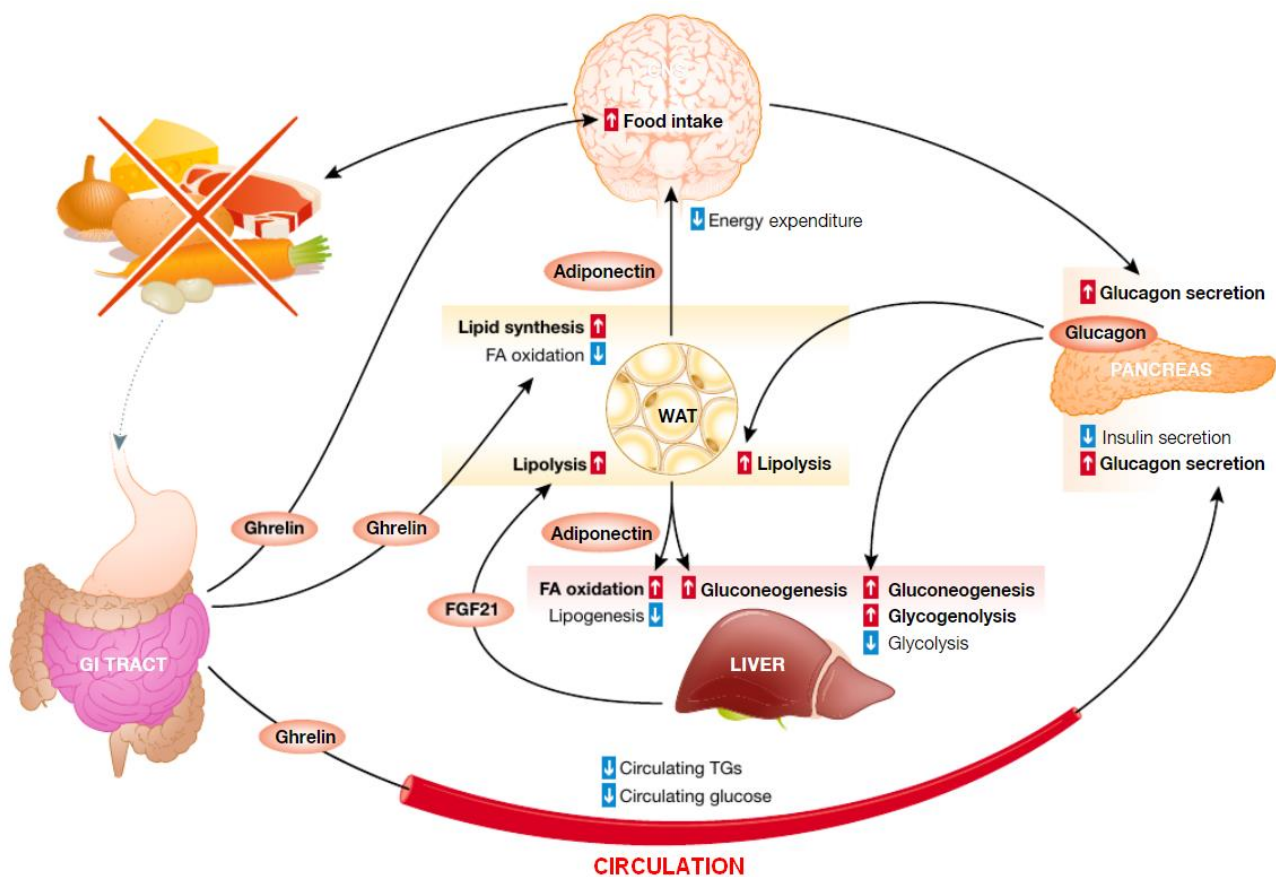
La ghréline réduit aussi l'effet du GLP-1 (Glucagon-like peptide-1), une autre hormone gastro-intestinale, qui agit sur le cerveau et la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Drucker, 2018) et qui sera décrite dans la partie suivante. La ghréline empêche l'action de l'hormone par internalisation du récepteur au GLP-1 (GLP-1R) (Ronveaux et al., 2015).

La ghréline favorise également l'utilisation du glucose, la synthèse des lipides et inhibe l'oxydation des acides gras dans le tissu adipeux en réduisant, par exemple, l'expression de CPT-1 $\alpha$  (Carnitine Palmitoyltransferase 1 $\alpha$ ), impliquée dans la  $\beta$ -oxydation et en augmentant l'expression de FASN (Fatty acid synthase), impliquée dans la synthèse d'acides gras (Theander-Carrillo et al., 2006). En parallèle, la ghréline stimule la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques (Chuang et al., 2011).

Une concentration faible en glucose induit également l'activation des neurones GI, suite à une augmentation du ratio AMP/ATP (Adénosine monophosphate), qui active l'AMPK (AMP-activated protein kinase). Cette enzyme contrôle l'activité des canaux ioniques dans les neurones. Elle induit une augmentation de leur activité électrique et la sécrétion de neurotransmetteurs, stimulant la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques (Fioramonti et al., 2010; Lamy et al., 2014).

De plus, le glucose affecte directement les cellules  $\alpha$  pancréatiques. En effet, la diminution d'ATP en absence de glucose dans les cellules  $\alpha$  induit la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (Rix et al., 2000). La dépolarisation de la membrane plasmique favorise l'entrée de calcium dans la cellule induisant l'exocytose des granules de sécrétion du glucagon. Le glucagon augmente la lipolyse dans le tissu adipeux pour continuer à produire de l'énergie sous forme d'ATP à partir des acides gras. Pour parer au manque de glucose, le glucagon induit également, dans le foie, la glycogénolyse, pour libérer le glucose stocké sous la forme de glycogène, et la gluconéogenèse, qui permet la synthèse de glucose à partir d'acides aminés.

Le tissu adipeux, en réponse aux différents stimuli induit par l'hypoglycémie, sécrète de l'adiponectine qui active la voie AMPK dans différents organes. Dans le cerveau, l'adiponectine augmente l'appétit et réduit les dépenses énergétiques (Kubota et al., 2007). Dans le foie, cette hormone favorise la  $\beta$ -oxydation et réduit la lipogenèse (Yamauchi et al., 2002). Enfin, elle augmente la sensibilité à l'insuline des organes cibles (Berg et al., 2001; Yamauchi et al., 2001) pour permettre une réaction rapide en cas de prise alimentaire.



**Figure 1 : Interaction inter-organes au cours d'une hypoglycémie.**

Interaction des différents organes via la sécrétion d'hormones ou de neurotransmetteurs pour contrer l'hypoglycémie. Les différentes hormones permettent d'augmenter la glycémie en activant la production de glucose dans les différents organes de stockage ou l'utilisation d'autres substrats pour la production d'énergie (Adapté de Castillo-Armengol et al., 2019).

Tous ces mécanismes permettent provisoirement de pallier le manque de glucose dans l'organisme en stimulant la prise alimentaire, en réduisant les dépenses énergétiques et en activant la production d'énergie à partir d'autres substrats.

## B. Cas de l'hyperglycémie

Au cours du repas (Figure 2), les nutriments ingérés sont détectés par les cellules intestinales qui libèrent alors différentes hormones dans la circulation sanguine. Les cellules L intestinales notamment, sécrètent le GLP-1. Cette hormone se lie au niveau de ses récepteurs GLP1-R dans le cerveau pour activer les neurones POMC/CART (Proopiomelanocortin / Cocaine and amphetamine-regulated transcript), qui sécrètent alors des neuropeptides anorexigènes diminuant l'appétit (Ronveaux et al., 2015).

Le GLP-1 agit également sur les cellules  $\beta$  pancréatiques en synergie avec le GIP (Glucose-dependent insulin releasing polypeptide), une hormone sécrétée par les cellules K intestinales (Nauck et al., 1986; Parker et al., 2009). Ces hormones potentialisent la sécrétion d'insuline et augmentent sa synthèse dans les cellules  $\beta$ , contribuant à la régulation de la glycémie (Seino et al., 2010).

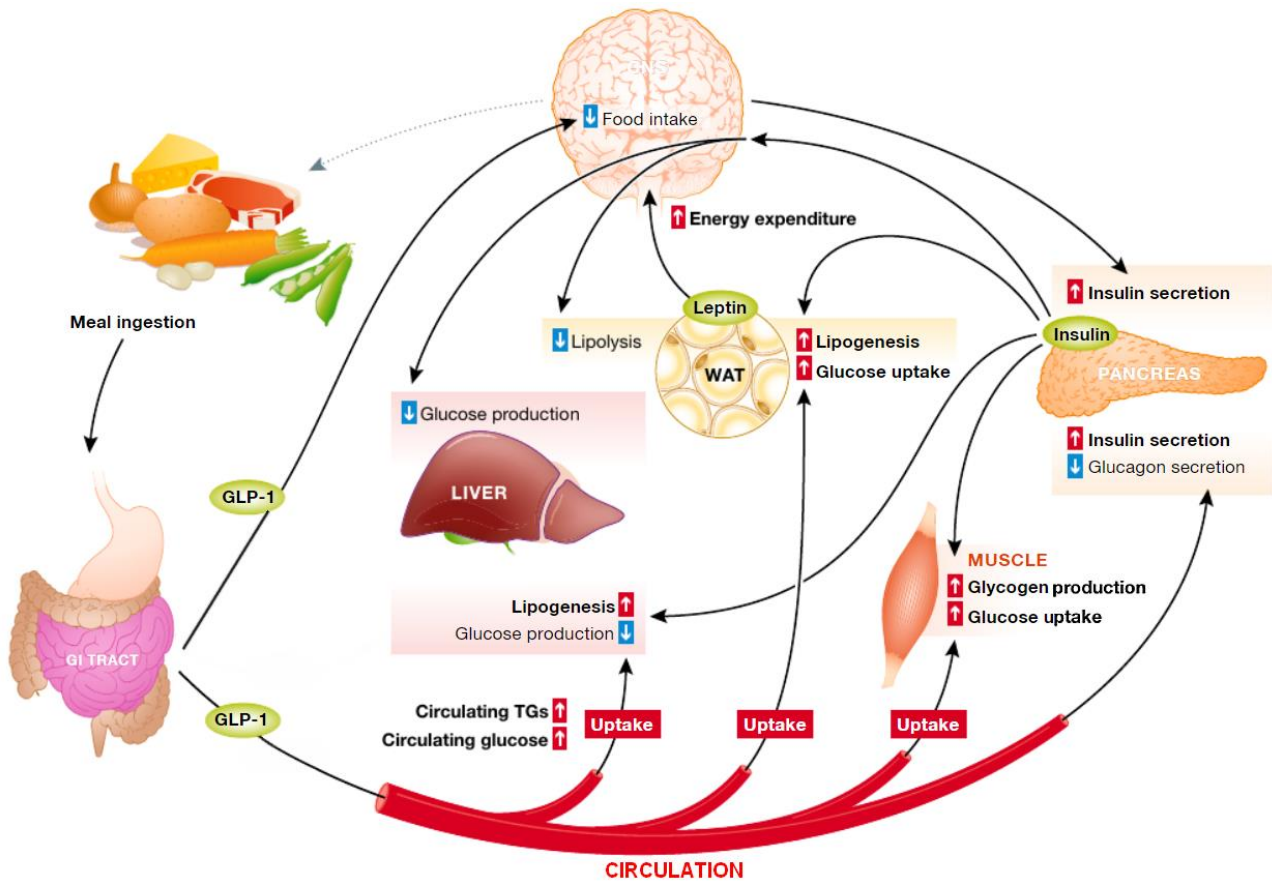
Le glucose, qui rejoint la circulation sanguine par la veine portale, est détecté par les cellules neuronales à proximité. Les neurones GE sont alors activés de manière similaire aux cellules  $\beta$  (voir ci-dessous) et sécrètent des neurotransmetteurs suite à l'entrée de calcium dans la cellule (Ashford et al., 2004). Ces neurotransmetteurs induisent, dans les cellules  $\beta$ , la première phase de sécrétion d'insuline pour s'adapter rapidement aux variations de concentration en glucose (Miki et al., 2001).

Au niveau du pancréas, le glucose traverse la membrane des cellules  $\beta$  par le transporteur GLUT2 (glucose transporter 2). Il est ensuite métabolisé dans la cellule après phosphorylation par la glucokinase et permet la production importante d'ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP (Adenosine diphosphate) induit la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants, induisant la dépolarisation de la membrane plasmique et l'entrée de calcium, activant l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline.

Cette hormone agit sur le foie, les muscles et les tissus adipeux. Elle augmente notamment la captation du glucose dans ces organes par les transporteurs du glucose présent à la membrane cellulaire (GLUT2 pour le foie, GLUT4 pour les muscles et tissus adipeux) (Chadt & Al-Hasani, 2020). L'insuline active également la glycogénogenèse, permettant le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie et les muscles. En parallèle, l'insuline inhibe la gluconéogenèse hépatique et la sécrétion du glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques. Enfin cette hormone régule le métabolisme des lipides en favorisant la synthèse d'acide gras et de triglycérides dans le tissu adipeux mais également dans le foie.

Le stockage des triglycérides dans les adipocytes entraîne la sécrétion de leptine, une hormone agissant sur le système nerveux via les voies JAK/STAT (Janus Kinase / Signal transducer and activator of transcription). Ce signal induit une diminution de la prise alimentaire (Klok et al., 2007) et augmente la dépense énergétique afin d'éviter un stockage trop important de triglycérides, nocif pour l'organisme.

Après un repas, la réponse coordonnée des différents tissus permet de maintenir l'homéostasie glycémique. La prise alimentaire est réduite, la dépense énergétique augmentée et le stockage du glucose est mis en place dans les différents organes afin de réduire la glycémie.



**Figure 2 : Interaction inter-organes dans la régulation de la glycémie post-prandiale.**

L'interaction des différents organes via la sécrétion d'hormones ou de neurotransmetteurs reconnus par les différents tissus cibles permet le maintien de l'homéostasie glycémique après un repas. Ces messages hormonaux ou nerveux réduisent la prise alimentaire, augmentent les dépenses énergétiques et induisent le stockage du glucose (Adapté de Castillo-Armengol et al., 2019).

La dérégulation d'une de ces voies permettant de maintenir l'homéostasie glycémique peut entraîner l'apparition de désordres métaboliques. Par exemple, un régime hypercalorique peut induire un stockage trop important de lipides qui conduit à l'obésité, mais peut aussi provoquer une résistance à l'insuline et à la leptine dans les tissus périphériques (Frederich et al., 1995). Ainsi, l'appétit et la prise alimentaire ne sont pas réduits malgré la présence de leptine, et le glucose n'est pas stocké sous l'effet de l'insuline, entraînant une hyperglycémie pouvant causer l'apparition d'un diabète.

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la régulation de l'homéostasie énergétique et à l'adaptation métabolique, notamment au niveau de la cellule  $\beta$  pancréatique. Par la suite, nous nous intéresserons donc plus particulièrement au pancréas, un des organes clés contrôlant l'homéostasie glycémique, dont les mécanismes de sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques sont particulièrement étudiés dans notre laboratoire.

## //. Le pancréas

### A. Organisation et fonction

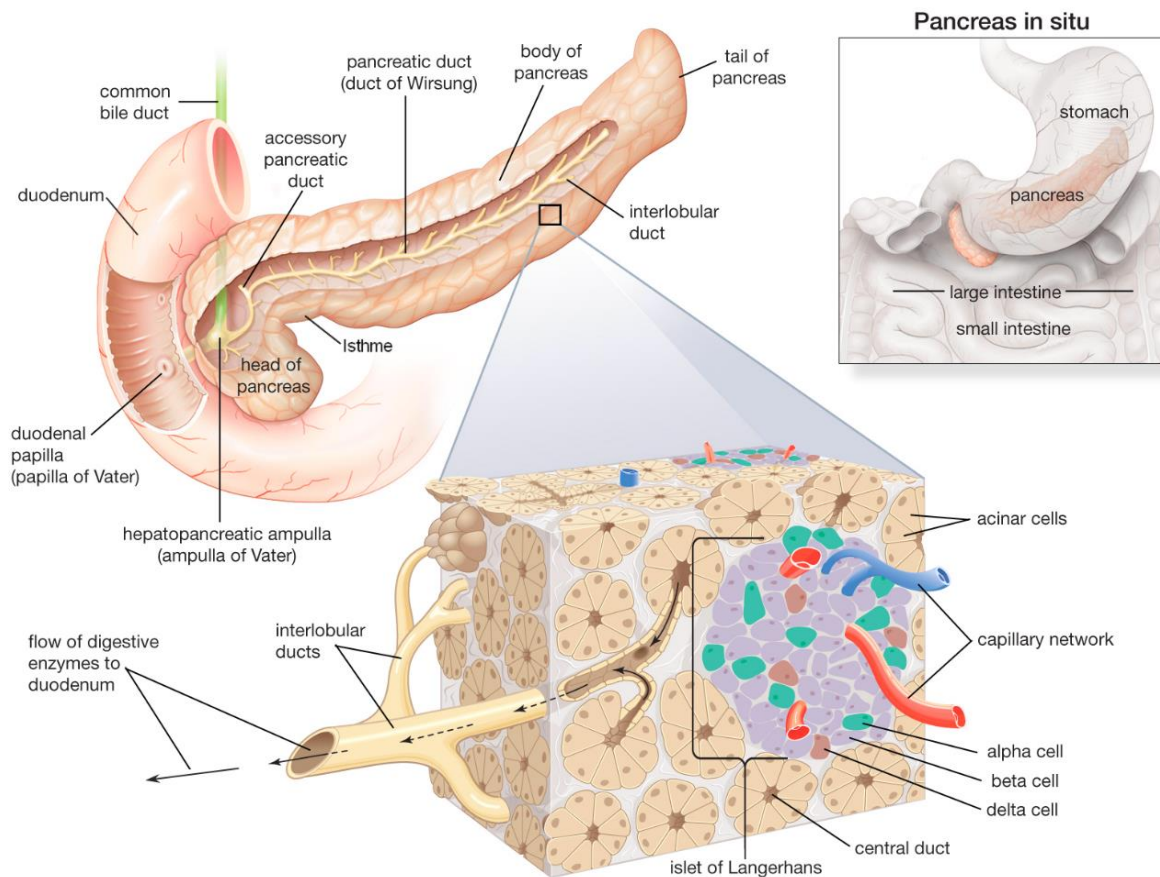
Le pancréas est une glande mixte composée de deux parties distinctes ayant chacune une fonction spécifique.

La partie exocrine, qui correspond à 98% de la masse du pancréas, est impliquée dans la digestion. Elle est composée de cellules acinaires et ductales (Figure 3). Les cellules acinaires s'organisent en acini pour former des lobules et produisent des sucs digestifs contenant des enzymes dégradant les lipides (lipases), les glucides (glycosidases), les protéines (protéinases et peptidases) et les acides nucléiques (nucléases). Ces enzymes sont indispensables à la dégradation des nutriments pour permettre une bonne absorption par l'intestin. Les cellules ductales forment les réseaux de canaux qui déversent les sucs digestifs dans le duodénum par le canal de Wirsung. Elles sécrètent également des ions bicarbonates qui régulent le pH des sucs digestifs pour une activité optimale des enzymes de digestion.

La partie endocrine représente 2 % de la masse du pancréas. Elle correspond aux îlots de Langerhans (Figure 3), composés de cinq types cellulaires distincts dont la principale fonction est de maintenir l'homéostasie glycémique. Ces cellules sécrètent des hormones qui pourront avoir un effet autocrine, paracrine ou endocrine, par libération d'hormones dans le sang grâce aux capillaires qui traversent les îlots pancréatiques. Les cellules  $\beta$ , qui constituent une part cellulaire importante de l'îlot, sécrètent l'insuline, une hormone hypoglycémiant qui induit la glycogénogénèse et la lipogénèse. Les cellules  $\alpha$ , second type cellulaire le plus représenté, sécrètent le glucagon, une hormone hyperglycémiant qui induit la néoglucogénèse et la glycogénolyse. Les autres types de cellules sont présents en faibles quantités dans l'îlot, mais jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Les cellules  $\delta$  sécrètent la somatostatine, les cellules PP sécrètent le polypeptide pancréatique et les cellules  $\epsilon$  sécrètent la ghréline. Ces hormones inhibent la sécrétion des cellules exocrines (Heintges et al., 1994; Louie et al., 1985; Ohnishi et al., 1994; Zhang et al., 2001) et régulent la sécrétion d'insuline et de glucagon par les cellules endocrines (Hauge-Evans et al., 2009; Tong et al., 2010) et permettent ainsi une régulation fine de la glycémie.

L'organisation des îlots pancréatiques varie selon les espèces (Steiner et al., 2010) et influence leur fonctionnement (Cabrera et al., 2006). Chez l'Homme, les différents types de cellules endocrines sont répartis dans l'ensemble de l'îlot avec environ 50 % de cellules  $\beta$ , 40 % de cellules  $\alpha$ , 10 % de cellules  $\delta$  et quelques cellules des autres types cellulaires (Figure 3).

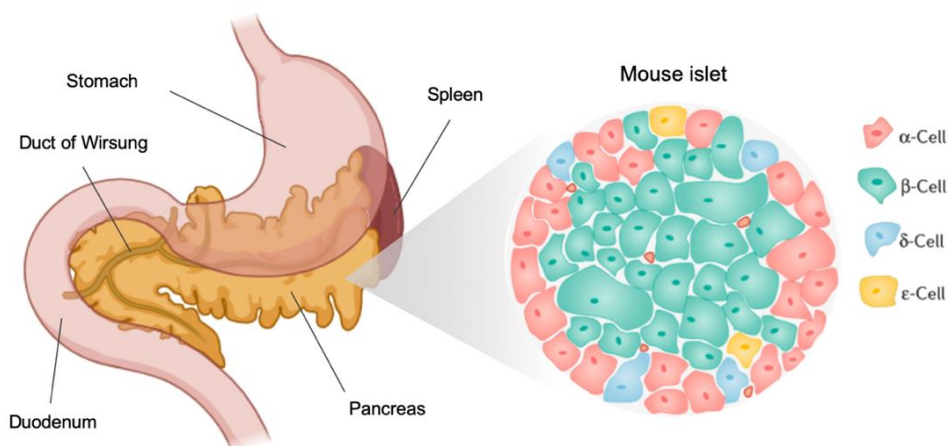




**Figure 3 : Organisation du pancréas humain.**

Le pancréas se situe derrière l'estomac, entre le duodénum (au niveau de la tête) et la rate (au niveau de la queue du pancréas). Les cellules acinaires et ductales constituent la partie exocrine du pancréas. La partie endocrine correspond aux îlots de Langerhans, composés de 5 types cellulaires distincts (Encyclopaedia Britannica).

Chez la souris (Figure 4), le pancréas est diffus, avec 60 à 80% de cellules  $\beta$  localisées au centre de l'îlot. Les cellules  $\alpha$ , qui représentent 15 à 20 % de l'îlot, se situent en périphérie, avec les autres types cellulaires.



**Figure 4 : Pancréas et organisation des îlots pancréatiques murins.**

Chez la souris le pancréas est plus diffus. La partie exocrine est semblable à l'Homme mais l'organisation des îlots pancréatiques est différente, avec les cellules  $\beta$  au centre de l'îlot et les autres types cellulaires en périphérie (Adapté de Campbell & Newgard, 2021 et Biorender.com).

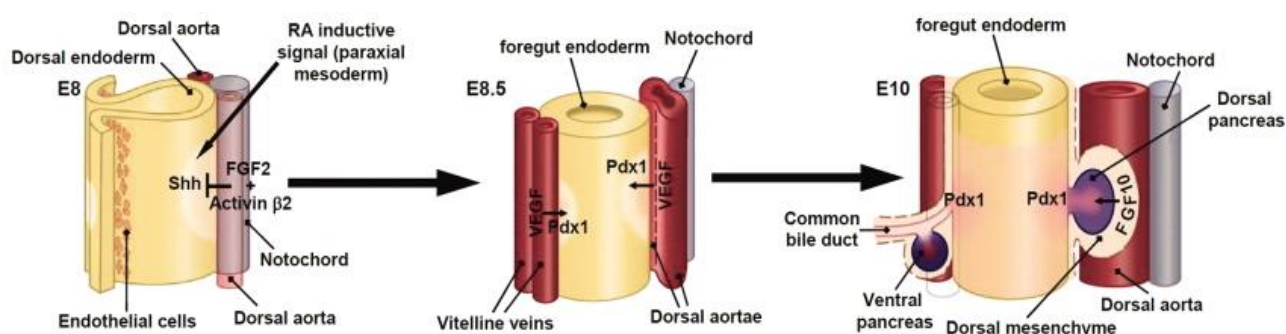
## B. Développement embryonnaire du pancréas

Bien que nous ne travaillions pas directement sur le développement du pancréas endocrine, il est important de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués pour mieux appréhender le rôle de ces facteurs dans le fonctionnement normal ou pathologique du pancréas adulte.

Le pancréas a pour origine l'endoderme, feuillet embryonnaire à l'origine de la formation des appareils digestif et respiratoire, du foie, de la vésicule biliaire et du pancréas (pour revue, voir Larsen & Grapin-Botton, 2017).

Chez la souris, dès le 8<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (E8), la notochorde envoie un signal de spécification pancréatique à l'endoderme antérieur par production d'Activine- $\beta$ 2 et de FGF2 (Fibroblast growth factor 2) qui inhibent l'expression de SHH (Sonic hedgehog) (Hebrok et al., 1998) (Figure 5). Ces signaux, en plus de l'acide rétinoïque produit par le mésoderme latéral (Martín et al., 2005), permettent l'expression de PDX1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1), un facteur de transcription clé dans le développement du pancréas. En effet, une mutation du gène *PDX1* chez l'Homme ou une invalidation chez la souris conduisent à une agénésie du pancréas (Jonsson et al., 1994; Stoffers et al., 1997). Les cellules multipotentes exprimant ce facteur de transcription donneront naissance aux cellules progénitrices pancréatiques (Gu et al., 2002).

Après fusion des aortes dorsales à E8.5, la notochorde est séparée de l'endoderme mais l'expression de PDX1 est maintenue par la sécrétion de signaux produits par l'aorte comme le VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Lammert et al., 2001; Yoshitomi & Zaret, 2004) (Figure 5).



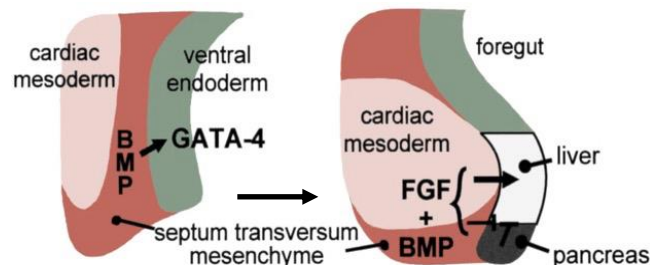
**Figure 5 : Interactions entre les différents tissus embryonnaires lors du bourgeonnement pancréatique.**

La notochorde, l'aorte et le mésoderme influencent la spécification pancréatique du bourgeon dorsal. Les veines vitellines influencent la spécification pancréatique du bourgeon ventral (Pan & Wright, 2011).

L'expression de PDX1 dans l'endoderme dorsal associée à l'expression de FGF10 par le mésenchyme conduit au développement du bourgeon dorsal pancréatique à E9.5 (Figure 5) (Bhushan et al., 2001; Pictet et al., 1972).

Ces signaux aortiques permettent également d'induire l'expression du facteur de transcription PTF1a/P48 (Pancreas associated transcription factor 1a) à E10.5 qui intervient, tout comme PDX1, dans la spécification pancréatique (Kawaguchi et al., 2002; Yoshitomi & Zaret, 2004). Dans la région ventrale de l'endoderme, les veines vitellines produisent également des signaux permettant d'induire l'expression de PDX1 (Lammert et al., 2001).

En parallèle, le FGF et BMP (Bone morphogenetic protein), sécrétés respectivement par le mésoderme cardiaque et les cellules mésenchymateuses du septum transversal, induisent la formation d'un bourgeon embryonnaire à l'origine du foie (Rossi et al., 2001) (Figure 6). L'absence de ce signal en aval permet le développement du bourgeon ventral pancréatique à E10 par absence d'expression de SHH (Deutsch et al., 2001).



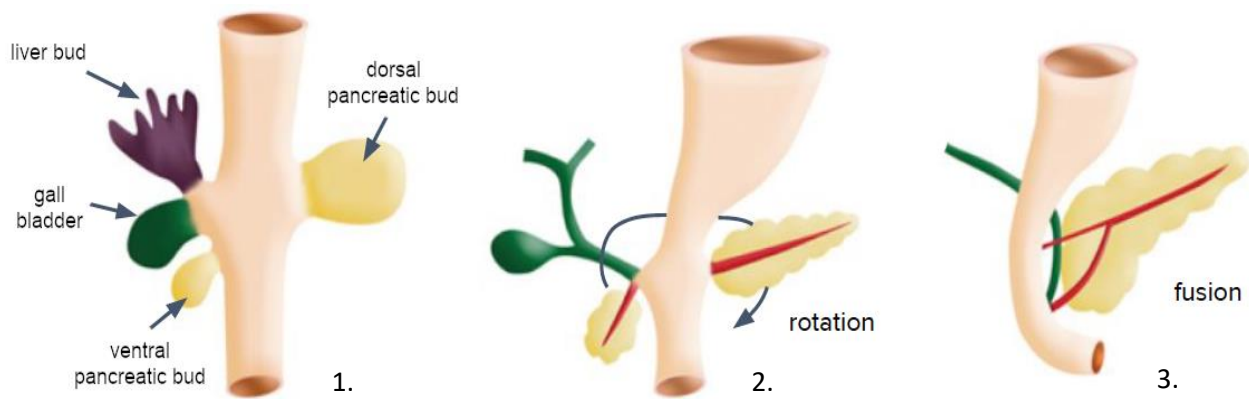
**Figure 6 : Interaction du mésoderme cardiaque avec l'endoderme ventrale.**

*Le mésoderme cardiaque et le septum transversal inhibent la spécification pancréatique au profit d'une spécification hépatique (Adapté de Rossi et al., 2001)*

Les cellules multipotentes des bourgeons pancréatiques subissent une première phase de transition de E9.5 jusqu'à E12.5. Cette phase correspond à la prolifération des cellules épithéliales pancréatiques et au début de leur différenciation. Ces cellules expriment le facteur de transcription SOX9 (SRY-box transcription factor 9), qui stimule leur prolifération et maintien leur état indifférencié (Seymour et al., 2007).

À ce stade, les premières cellules positives au glucagon et à l'insuline apparaissent respectivement à E9.5 et 10.5 (Sosa-Pineda et al., 1997) suite au début d'expression de la Neurogenin-3 (NGN3), un facteur de transcription des progéniteurs endocriniens (Gu et al., 2003; Villasenor et al., 2008).

L'épithélium des deux bourgeons pancréatiques prolifère et se ramifie dans le mésenchyme. À E11.5 la rotation de l'estomac induit le déplacement du pancréas ventral jusqu'au pancréas dorsal, permettant leur fusion à E13 (Figure 7).



**Figure 7 : Étapes du développement pancréatique.**

1. Développement des bourgeons embryonnaires dorsal et ventral. 2. Rotation du pancréas ventral vers le pancréas dorsal. 3. fusion des deux pancréas (Adapté de Türkvatan et al., 2013).

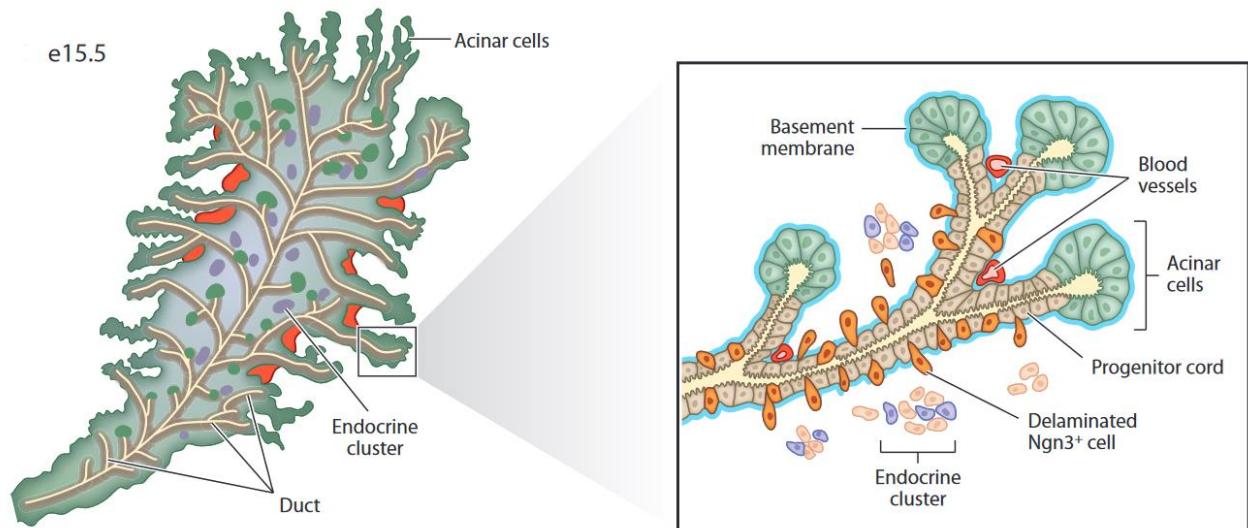
La 2<sup>e</sup> phase de transition a lieu à partir de E12.5, avec une seconde vague de différenciation plus importante et une perte d'expression de PDX1.

L'expression de PTF1a/P48 persiste uniquement dans les « tip cells » correspondant aux progéniteurs acinaires (Krapp et al., 1998) (Figure 8). L'expression de MIST1 (Muscle, intestine and stomach expression 1) dans ces cellules induit leur différenciation terminale en cellules acinaires (D. Jia et al., 2008).

Les « trunk cells », qui n'expriment plus PTF1a/P48 mais NKX6.1 (NK6 homeobox 1), sont des progéniteurs capables de se différencier en cellules ductales ou cellules endocrines (Schaffer et al., 2010).

Au cours de cette phase de transition, une seconde vague d'expression de la Neurogenin-3 dans certaines cellules induit leur différenciation en progéniteurs endocrines (Gu et al., 2002; Lee et al., 2001). Les autres cellules, qui n'expriment pas la Neurogenin-3 mais expriment les facteurs de transcription HES1 (Hairy and enhancer of split-1) et HNF6 (Hepatocyte nuclear factor 6), se différencient en cellules ductales (Lee et al., 2001; Pierreux et al., 2006).

Par la suite, les progéniteurs endocriniens exprimant la Neurogenin-3 se différencient en cellules endocrines matures grâce à l'expression de gènes spécifiques. Au cours de la différenciation, la délamination des cellules exprimant la Neurogenin-3 à E15.5 permet de former des clusters de cellules endocrines dans le mésenchyme qui deviendront par la suite les îlots pancréatiques (Figure 8).



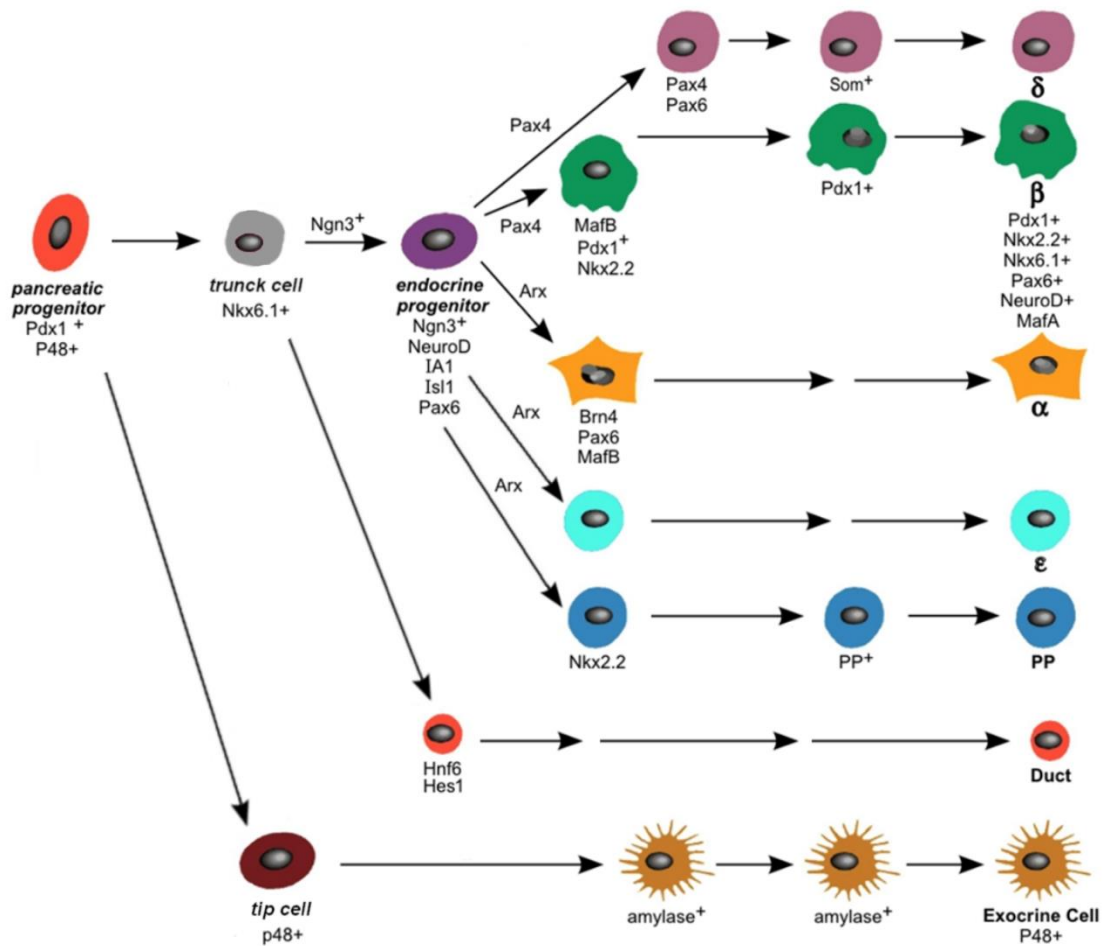
**Figure 8: Délimitation des progéniteurs endocrines au stade E15.5.**

Les cellules exprimant la neurogenin-3 ont pour origine les « trunk cells » et s'organisent, après délimitation, en clusters de cellules endocrines dans le mésenchyme pour former, par la suite, des îlots pancréatiques matures (Shih et al., 2013).

Dans ces clusters, le facteur de transcription ARX (Aristaless related homeobox) promeut la différenciation en progéniteurs de cellules  $\alpha$ , PP ou  $\epsilon$  (Figure 9)(Collombat et al., 2003, 2007; Heller et al., 2005). Les cellules qui expriment MAFB (MAF bZIP transcription factor B) et PAX6 (Paired box 6) deviendront alors des cellules  $\alpha$ , celles exprimant NKX2.2 (NK2 homeobox 2) des cellules PP et les autres progéniteurs des cellules  $\epsilon$  (Figure 8).

Avec un effet antagoniste à ARX, l'expression de PAX4 (Paired box 4) induit une différenciation en progéniteurs de cellules  $\beta$  ou  $\delta$  (Figure 9)(Collombat et al., 2003). Parmi ces cellules, celles exprimant PAX6 sans exprimer PDX1 deviendront des cellules  $\delta$ . Les autres cellules, qui réexpriment fortement PDX1 associé à l'expression de NKX6.1, NKX2.2 et MAFA (MAF bZIP transcription factor A), deviendront des cellules  $\beta$  matures (Sander et al., 2000). Dans les cellules  $\beta$  matures, PDX1 intervient dans la régulation des gènes impliqués dans la fonction des cellules  $\beta$  comme le gène de l'insuline (Peers et al., 1994; Petersen et al., 1994), de la glucokinase, qui intervient dans le métabolisme du glucose, ou de l'amyline, une autre hormone sécrétée par les cellules  $\beta$  qui intervient la régulation de la glycémie (Chakrabarti et al., 2002; Serup et al., 1996).

Une fois les cellules de l'îlot pancréatique différenciées, les cellules  $\beta$  sécrètent du VEGF-A (Vascular endothelium growth factor A) pour attirer les cellules endothéliales (Nikolova et al., 2006), qui formeront les réseaux de capillaires dans l'îlot pancréatique. En réponse, les cellules endothéliales synthétisent des chaînes de laminines  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$  qui vont interagir avec les  $\beta$ -intégrines présentes à la surface des cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette interaction induit, *in vitro*, l'expression du gène de l'insuline et la prolifération des cellules  $\beta$  (Nikolova et al., 2006).



**Figure 9: Les différents facteurs de transcription impliqués dans le développement des lignées cellulaires du pancréas.** (Adapté de Jiang & Morahan, 2011).

Chez l'Homme, le développement embryonnaire du pancréas est similaire (Voir tableau 1), avec néanmoins quelques différences. Par exemple, on ne retrouve qu'une seule phase d'expression de la Neurogenin-3 chez l'Homme (Salisbury et al., 2014) alors que son expression est biphasique chez la souris (Villasenor et al., 2008), ce qui explique l'apparition relativement tardive des premières cellules endocrines dans le pancréas humain.

	Souris	Homme
Développement du bourgeon dorsal	E9.5	E26
Développement du bourgeon ventral	E10	E32
Rotation du bourgeon ventral	E11.5	E37
Fusion du pancréas dorsal et ventral	E13	E56
Début d'expression de l'insuline	E10.5	E52
Début d'expression du glucagon	E9.5	E56
Formation des îlots pancréatiques matures	E18	E91

**Tableau 1 : Comparaison du temps de développement du pancréas humains et murins.**

Données exprimées en jours de développement embryonnaires (E) (pour revue, voir Mfopou et al., 2010).

### III. Le diabète

#### A. Epidémiologie et caractéristiques principales

Le diabète est l'une des maladies les plus répandues dans le monde, avec une prévalence qui ne cesse d'augmenter. D'après la Fédération Internationale du Diabète (Saeedi et al., 2019), cette maladie touchait en 2019, 463 millions de personnes dans le monde et causait 4,2 millions de morts. Pour 2045, des études estiment que le nombre de personnes malades atteindra les 700 millions. Comprendre les causes et les mécanismes impliqués dans le développement de la maladie est donc un enjeu majeur pour contrer la progression du diabète dans le monde.

Le diabète se caractérise par une hyperglycémie chronique, avec une valeur à jeun supérieure à 1,26 g/L. Ce défaut de régulation de la glycémie peut être à l'origine de nombreuses complications (Forbes & Cooper, 2013). En effet, le diabète peut entraîner des complications microangiopathiques (affectant les petits vaisseaux) causant des rétinopathies, néphropathies ou neuropathies mais également des complications macroangiopathiques (affectant les artères) avec des conséquences plus graves comme une insuffisance cardiaque, un infarctus ou un accident vasculaire cérébral.

#### B. Les différents types de diabète

Il existe quatre formes principales de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2, le diabète gestationnel et les diabètes monogéniques.

Les diabètes monogéniques sont des formes rares causées par la mutation d'un seul gène. Parmi ces diabètes, on retrouve le diabète néonatal qui survient peu après la naissance et le diabète MODY (Maturity onset diabetes of the young) qui survient avant l'âge de 25 ans. Les diabètes MODY peuvent être induits par la mutation de 14 gènes différents (Firdous et al., 2018), comme les gènes *GCK* (Glucokinase) (MODY-2), *PDX1* (MODY-4) ou *KCNJ11* (Potassium channel subfamily J member 11) (MODY-13), impliqués dans l'identité et la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Le diabète gestationnel touche environ 7 à 10% des femmes enceintes et apparaît généralement au cours du 2<sup>e</sup> trimestre (Behboudi-Gandevani et al., 2019). Lors de la grossesse, une insulino-résistance s'installe pour répondre aux besoins en glucose du fœtus, les cellules  $\beta$  maternelles augmentent alors leur sécrétion d'insuline pour compenser. Dans certains cas, la compensation insulinémique des cellules  $\beta$  pancréatiques est insuffisante, conduisant alors au développement d'un diabète gestationnel (Zhang et al., 2010).

La glycémie et la sensibilité à l'insuline reviennent à la normale après l'accouchement, mais les femmes atteintes, ainsi que leurs enfants, ont un risque plus important de développer par la suite un diabète de type 2 (Bellamy et al., 2009; Clausen et al., 2008).

Le diabète de type 1 se caractérise par une absence de sécrétion d'insuline à la suite d'une destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques. Les malades sont donc dépendants des injections d'insuline pour réguler leur glycémie. Cette destruction des cellules est causée par une réaction auto-immune, avec des auto-anticorps reconnaissant des antigènes sur la cellule  $\beta$ . Le diabète de type 1 apparaît généralement avant l'âge de 30 ans et correspond à 10 % des cas de diabètes. Cette maladie a en partie une origine génétique, avec de nombreux gènes de susceptibilité identifiés comme, par exemple, les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. Le diabète de type 1 peut également être causé par des facteurs environnementaux, comme une infection virale ou un changement du microbiote intestinal (Beyan et al., 2012).

Le diabète de type 2 représente environ 90% des cas de diabètes dans le monde. L'hyperglycémie chronique est causée par l'apparition d'une résistance à l'insuline au niveau du foie, des muscles ou du tissu adipeux, associée à une perte de fonction et/ou de masse des cellules  $\beta$  pancréatiques, qui sécrètent l'insuline. Les études génétiques expliquent seulement 10% à 15% de l'héritabilité du diabète de type 2. D'autres facteurs de risques, comme les facteurs environnementaux, semblent également jouer un rôle majeur dans le développement de la maladie.

### C. Le développement du diabète de type 2

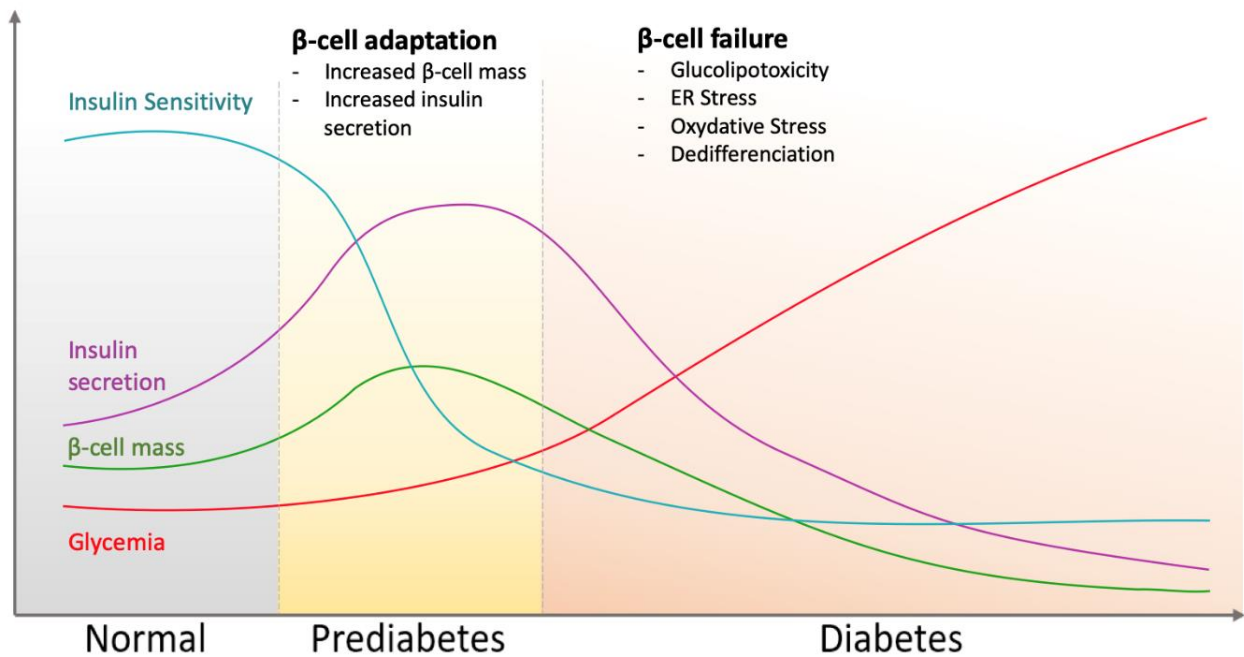
Au cours du développement de la maladie apparaît une résistance à l'insuline des tissus périphériques (foie, muscles et tissus adipeux). Le plus souvent, cette résistance est causée par l'obésité qui provoque, notamment, une augmentation des acides gras libres dans le sang et les tissus (Boden, 2008), inhibant l'activation de la voie de signalisation de l'insuline (Yuan et al., 2001). Différentes équipes ont émis l'hypothèse que de nouvelles cellules  $\beta$  pancréatiques pouvaient se former par néogenèse (Butler et al., 2003; Yoneda et al., 2013), afin d'augmenter la sécrétion d'insuline et éviter l'hyperglycémie causée par l'insulino-résistance.

Ainsi, l'homéostasie glycémique est maintenue par compensation des cellules  $\beta$  malgré la résistance à l'insuline. On parle alors d'une situation de prédiabète (Figure 10). Au-delà d'un certain stade, les cellules  $\beta$  ne réussissent plus à compenser l'hyperglycémie causée par la résistance à l'insuline. Une



diminution de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques de 20 à 65% est alors observée, associée à une réduction de la sécrétion d'insuline.

Cette diminution de la masse des cellules  $\beta$  est induite par un environnement gluco- et lipotoxique, qui cause un stress oxydatif, un stress du réticulum endoplasmique, un dysfonctionnement des mitochondries et une inflammation dans les îlots pancréatiques (Raalte & Diamant, 2011).



**Figure 10 : Evolution du diabète de type 2 au cours de temps.**

En condition physiologique, les cellules  $\beta$  sécrètent l'insuline pour réduire la glycémie après un repas. Au cours du développement du diabète, une résistance à l'insuline s'installe et les cellules  $\beta$  pancréatiques augmentent leur masse et la sécrétion d'insuline pour compenser l'hyperglycémie, en parle alors de prédiabète. Par la suite, les cellules  $\beta$  ne parviennent plus à compenser l'hyperglycémie. La glucolipotoxicité induit une diminution critique de la masse des cellules  $\beta$  et une perte de sécrétion d'insuline conduisant à l'hyperglycémie chronique et au diabète de type 2

## IV. Dysfonction des cellules $\beta$ pancréatiques au cours du diabète de type 2

Le diabète de type 2 se caractérise plus particulièrement par un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques, conduisant à une perte de sécrétion d'insuline et une réduction de la masse de ces cellules. La glucotoxicité et la lipotoxicité observées au cours de la maladie engendrent de nombreux stress dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, altérant leur fonction et favorisant la progression du diabète. Par la suite, nous nous intéresserons donc aux différents mécanismes à l'origine de ces altérations.

### A. Stress du réticulum endoplasmique

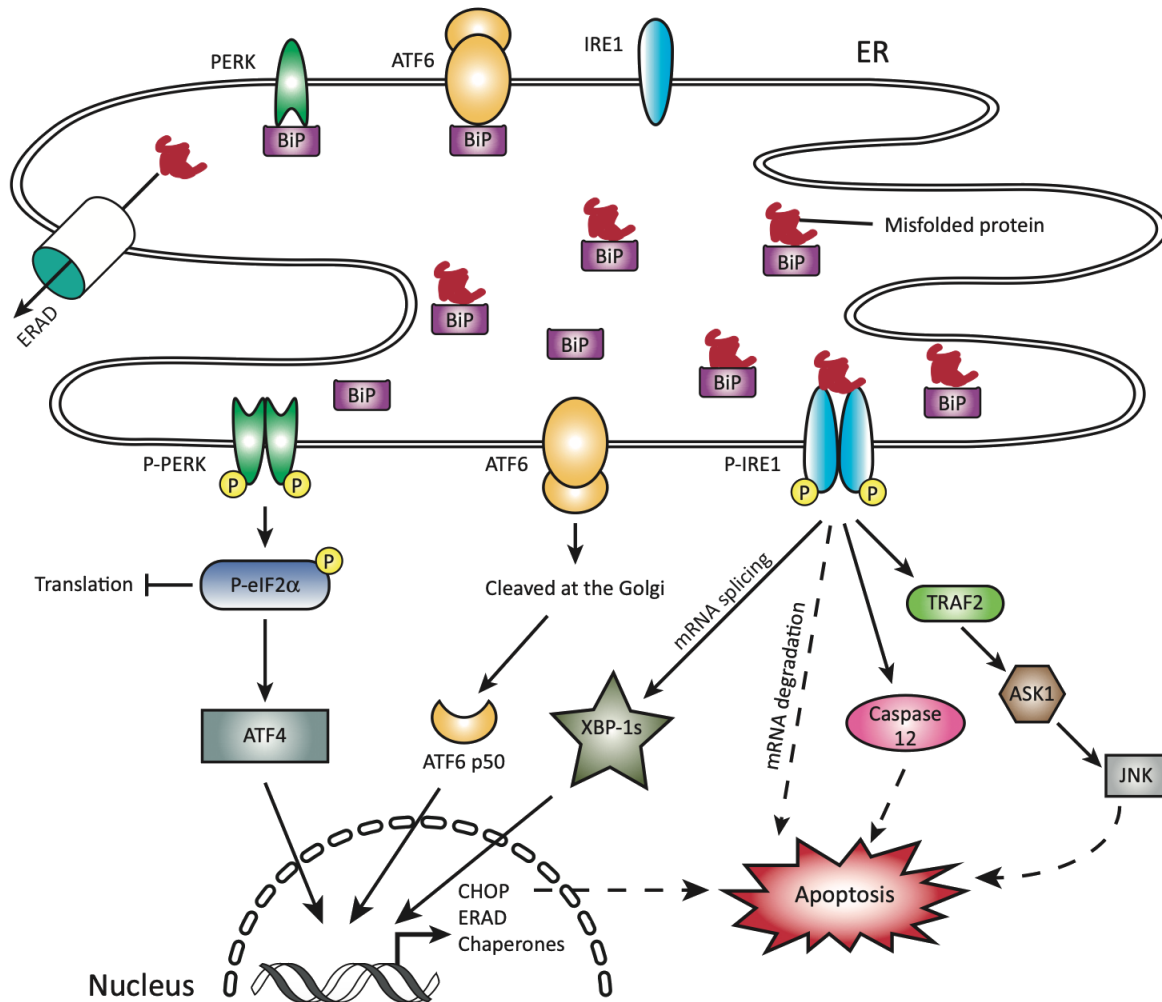
Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite clé de la cellule  $\beta$  pancréatique. Cet organite est un réservoir important de calcium, intervenant notamment dans l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline. Il intervient également dans la synthèse de lipides ainsi que dans la production, la modification et la mise en conformation des protéines. Les protéines nouvellement synthétisées sont modifiées et repliées par l'intervention de protéines chaperonnes et d'enzymes spécifiques. L'environnement oxydatif dans la lumière du réticulum endoplasmique permet également la formation de ponts disulfures par l'intermédiaire de l'enzyme DPI (Di-Sulphide Isomerase).

Au cours du diabète de type 2, l'insulino-résistance conduit à une production élevée d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques pour compenser l'hyperglycémie chronique. La synthèse continue de pro-insuline finit par dépasser les capacités de conformation du réticulum endoplasmique. L'accumulation de protéines mal conformées entraîne alors un stress du RE et l'activation de la réponse UPR (Unfolded protein response).

La lipotoxicité, observée au cours du diabète de type 2, provoque également un stress du réticulum endoplasmique (pour revue voir Biden et al., 2014; Rabhi et al., 2014). En effet, le palmitate induit une diminution du trafic vésiculaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, entraînant une accumulation de protéines et l'activation de la réponse UPR (Preston et al., 2009).

Lors d'une accumulation importante de protéines dans le RE (Figure 11), la protéine chaperonne BIP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein) se détache de ses récepteurs pour intervenir dans le repliement des protéines. La libération de ces récepteurs transmembranaires permet leur activation et l'induction de la réponse UPR.

Trois protéines sont impliquées dans la réponse UPR : la protéine kinase PERK (Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), le facteur de transcription ATF6 (Activating transcription factor 6) et IRE-1a, une protéine kinase et endoribonucléase (Inositol-requiring element 1a) (Mori, 2000). Deux voies distinctes se mettent alors en place au sein du réticulum (Pour revue, voir Schröder & Kaufman, 2005).



**Figure 11 : Activation de la réponse UPR par accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique.**

Les récepteurs ATF6, IRE1a et PERK sont activés lorsque la protéine BiP se détache pour aider aux repliements des protéines. PERK intervient notamment dans l'inhibition de la traduction alors que les protéines ATF6 et IRE1a activent la transcription de gènes impliqués dans la production de protéines chaperonnes ou d'enzymes de dégradation des protéines. La réponse UPR peut aboutir à l'apoptose de la cellule en cas d'échec des processus mis en place (Biden et al., 2014).

La voie traductionnelle est la première voie qui se met en place et permet de ralentir la synthèse de protéines afin d'éviter une accumulation supplémentaire dans le réticulum endoplasmique. PERK, activée sous forme de dimère, inhibe la synthèse de nouvelles protéines en phosphorylant EIF2 $\alpha$ , un facteur d'initiation de la traduction (Harding et al., 1999).

La traduction de la protéine ATF4 (Activating transcription factor 4) est toutefois augmentée grâce à la présence de séquences uORF (upstream open reading frame) (Harding et al., 2000). Cette protéine active la voie pro-apoptotique en induisant l'expression de la protéine CHOP (CEBP homologous protein).

La voie transcriptionnelle permet l'expression de gènes codant des protéines chaperonnes ou des protéines impliquées dans la voie ERAD (ER-associated degradation), qui dirigent les protéines mal conformées vers des lieux de dégradation dans le cytoplasme (Meusser et al., 2005). Elle fait intervenir IRE-1a et ATF6.

IRE-1a induit l'épissage de l'ARNm de *XBP1* (X-inactive specific transcript) dans le cytoplasme. La forme épissée de l'ARN de *XBP1* (nommée *XBP1s*) active l'expression de gènes impliqués dans la voie de dégradation ERAD en se fixant sur des séquences ERSE (éléments de réponse au stress endoplasmique) (Lee et al., 2003). IRE-1a intervient également dans la dégradation des ARNm dont celui de la pro-insuline, pour réduire sa production (Hollien et al., 2009; Lipson et al., 2008).

ATF6, libéré de BIP, migre vers l'appareil de Golgi pour être clivée par les protéines S1P et S2P (Site 1/2 protease), puis transloque jusqu'au noyau pour se fixer sur les séquences ERSE et activer l'expression de gènes cibles codant des protéines chaperonnes, comme BIP/GRP78 ou GRP94 (Glucose regulated protein 78/94 kDa) (Yoshida et al., 1998).

Si ces processus mis en place par la cellule échouent, ou si l'activation de la voie UPR est maintenue dans le temps, la voie apoptotique est activée et conduit à la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques. La protéine CHOP, dont l'expression est activée par ATF4, inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (B-cell lymphoma 2) et favorise donc l'apoptose des cellules (Zinszner et al., 1998). Les protéines pro-apoptotiques BAX (BCL-2-associated X) et BAK (BCL2 antagonist/killer) sont alors activées et entraînent la libération du calcium endoplasmique dans le cytosol et son entrée dans la mitochondrie. Le calcium mitochondrial provoque la libération du cytochrome C, activant les caspases 3 et 7. En parallèle, le calcium cytosolique active des calpaïnes qui clivent la pro-caspase 12. La caspase 12 active alors des cascades de signalisations induisant l'apoptose (Nakagawa et al., 2000). Enfin, le recrutement de TRAF-2 (TNF receptor associated factor 2) et ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) par IRE-1a permet l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase), conduisant également à l'apoptose des cellules (Urano et al., 2000).

## B. Stress oxydatif et altération de la fonction mitochondriale

La glucolipotoxicité au cours du diabète de type 2 provoque l'augmentation de la production des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et induit un stress oxydatif dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (pour revue, voir Newsholme et al., 2007).

En effet, la métabolisation du glucose génère des radicaux libres, comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) ou le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces radicaux libres sont produits dans le cytoplasme par les réductases NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) (Magnani & Mattevi, 2019) et dans les mitochondries par le complexe I et III de la chaîne respiratoire (Mailloux, 2020) (Figure 12).

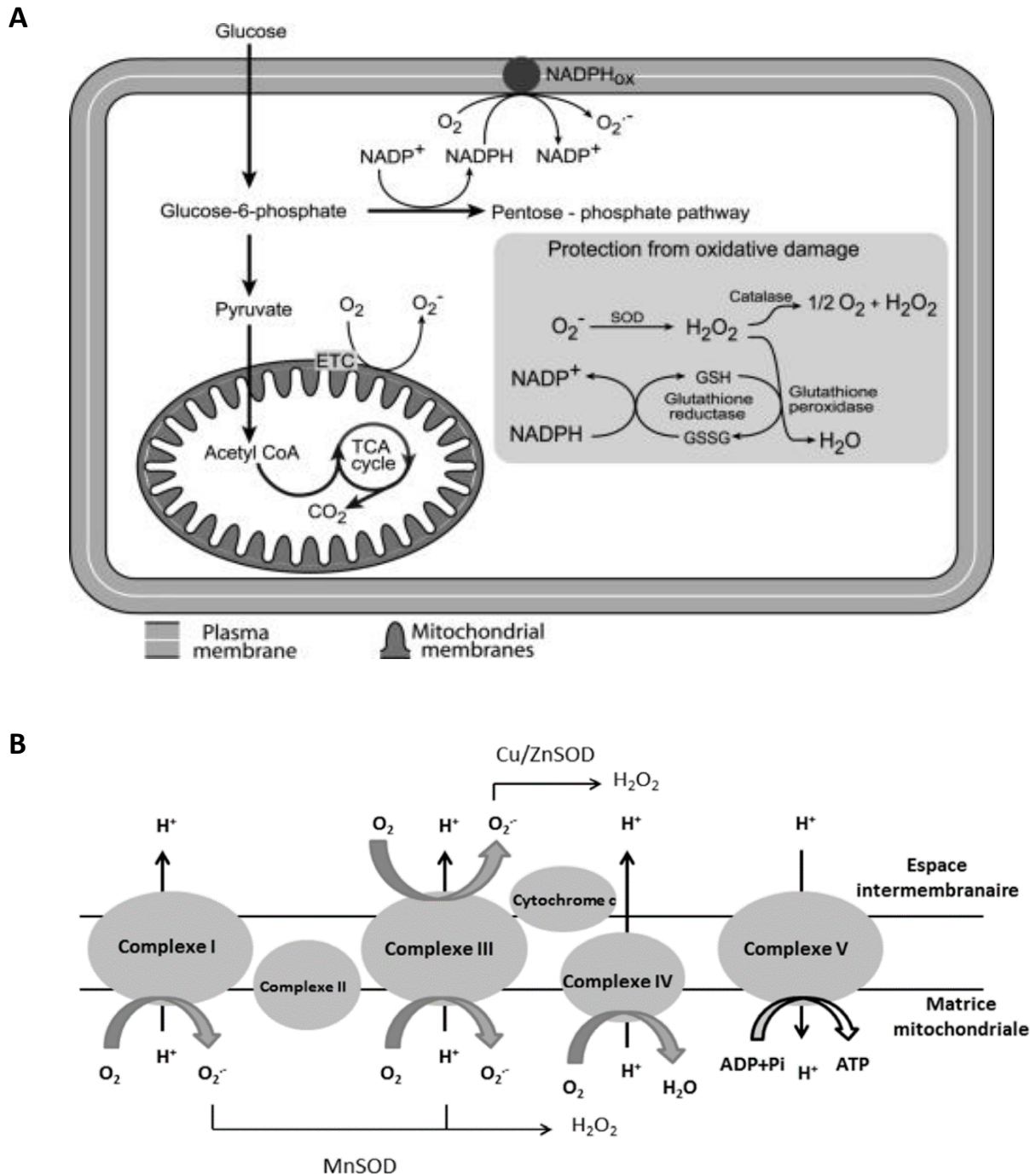
Le réticulum endoplasmique produit également des ROS au cours de son activité de conformation des protéines (Tu & Weissman, 2004), avec une production accrue en cas de stress du réticulum endoplasmique et activation de la réponse UPR.

Dans des conditions physiologiques, les ROS sont normalement éliminés par la cellule grâce à des enzymes antioxydantes comme les catalases, superoxydes dismutases ou la glutathion peroxydase. Dans les cellules  $\beta$ , la génération transitoire de ROS intervient notamment dans la sécrétion d'insuline (Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007). Toutefois, l'expression de certaines enzymes est particulièrement faible (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997) rendant ces cellules plus sensibles à l'augmentation des ROS au cours du diabète de type 2. Ainsi, la cellule  $\beta$  n'est plus capable d'éliminer ces radicaux libres et subit un stress oxydatif.

L'accumulation de ROS cause des dommages au niveau des membranes suite à la peroxydation des lipides, modifiant la perméabilité et la fluidité membranaire (Yadav et al., 2019). Les radicaux libres induisent également des cassures des brins d'ADN et l'oxydation de bases nucléotidiques, provoquant l'apparition de mutation pouvant altérer l'expression des gènes (Poetsch, 2020). Enfin, les protéines peuvent être oxydées, clivées ou agrégées et voir leur structure et activité modifiées par les ROS.

La mitochondrie étant le site principal de production des ROS, elle est particulièrement impactée par les dommages causés par le stress oxydatif (Victor et al., 2011). Le stress oxydatif peut notamment affecter l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire (Cardoso et al., 1999) ou de l'ATP synthase (Rexroth et al., 2012), en altérant l'intégrité des membranes, l'ADN mitochondrial ou plus directement les protéines.

Les ROS, en augmentant la perméabilité des membranes, favorisent également l'entrée de calcium dans la mitochondrie et conduisent à la libération du cytochrome C dans le cytoplasme, déclenchant les voies de signalisation de l'apoptose (Orrenius et al., 2015). Ces événements conduisent à la perte de fonction des mitochondries et l'apoptose des cellules  $\beta$  au cours du diabète de type 2.



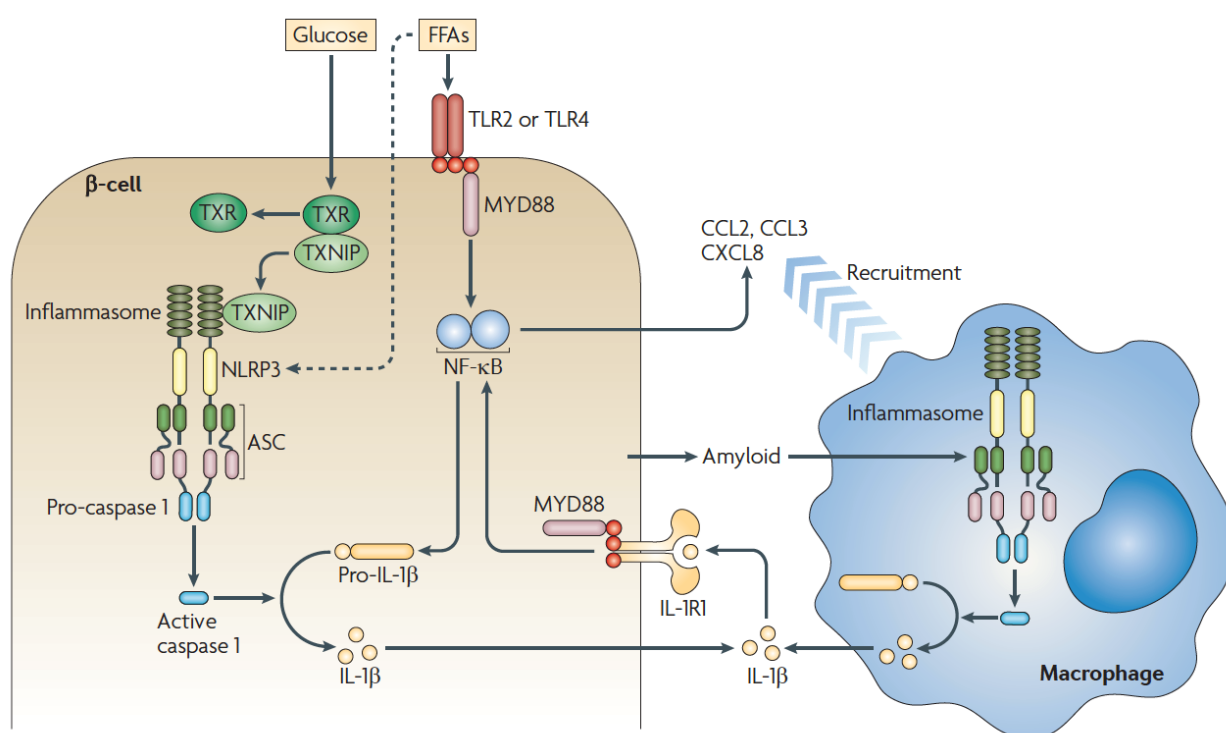
**Figure 12 : Le glucose induit la production d'espèces réactives à l'oxygène dans le cytoplasme et la mitochondrie.** La métabolisation du glucose par la NADPH membranaire (A) et le complexe I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (B) induit la formation de ROS qui seront éliminés par l'intervention d'enzymes antioxydantes par leur conversion en  $H_2O$  (Newsholme et al., 2007).

## C. Inflammation

Un environnement diabétogène, par l'augmentation des concentrations en glucose et acides gras libres, entraîne un état inflammatoire avec une infiltration de cellules immunitaires et production de cytokines qui ont un effet délétère sur les cellules  $\beta$  pancréatiques (Figure 13) (pour revue, voir Berchtold et al., 2016).

Au sein des cellules  $\beta$ , une concentration élevée en glucose provoque la dissociation de la protéine TXNIP (Thioredoxin-interacting protein) de la thioredoxine (TXR). Cette protéine se fixe sur le complexe NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3), également appelé inflammasome, et induit son activation (Zhou et al., 2010). La caspase 1, libérée du complexe, clive la pro-IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ) présente dans le cytoplasme.

La cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  est ensuite sécrétée par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Maedler et al., 2002) et exerce un effet autocrine en se fixant sur le récepteur IL-1R1 (Interleukin 1 receptor type 1) des cellules. IL-1 $\beta$  participe à l'activation de nombreuses voies de signalisation, conduisant à une perte de fonction des cellules  $\beta$  pouvant aboutir à leur apoptose.



**Figure 13 : Activation de l'inflammation dans la cellule  $\beta$  pancréatique, production de cytokines pro-inflammatoires et recrutement des macrophages au cours du diabète de type 2.**

L'inflammasome est activé par des concentrations toxiques en glucose et acides gras libres et induit la production, par la cellule  $\beta$  pancréatique, de chimiokines qui attirent les macrophages dans le pancréas, et de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$  par la cellule  $\beta$  pancréatique. La production anormale d'amyloïde active également l'inflammasome dans les macrophages (Donath & Shoelson, 2011).

Les acides gras libres peuvent également activer l'inflammasome ou induire directement l'activation de NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes inflammatoires, par leur fixation sur les récepteurs membranaires TLR2/6 ou TLR4 (Toll like receptor) (Eguchi et al., 2012).

IL-1 $\beta$  augmente notamment l'expression du récepteur membranaire FAS (Fas Cell Surface Death Receptor), qui intervient dans la voie de signalisation de l'apoptose (Loweth et al., 1998) mais également dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Schumann et al., 2007). L'augmentation de son expression induite par l'IL-1 $\beta$  réduit l'expression de PDX1, conduisant à une diminution de la sécrétion d'insuline dans les cellules  $\beta$  et une perte de leur identité.

En se fixant sur son récepteur, IL-1 $\beta$  permet également l'activation de NF- $\kappa$ B, qui augmente notamment l'expression de PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), une protéine pro-apoptotique activant la translocation de BAX. Cette protéine permet l'entrée de calcium dans la mitochondrie et la libération du cytochrome C dans le cytoplasme, conduisant à l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques (Gurzov et al., 2010).

NF- $\kappa$ B induit également la production d'autres cytokines pro-inflammatoires et chimiokines comme CCL2, CCL3 (C-C motif chemokine ligand 2/3) ou CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8), des chimioattractants attirant, au sein de l'îlot pancréatique, des cellules de l'immunité comme les macrophages (Ehse et al., 2007).

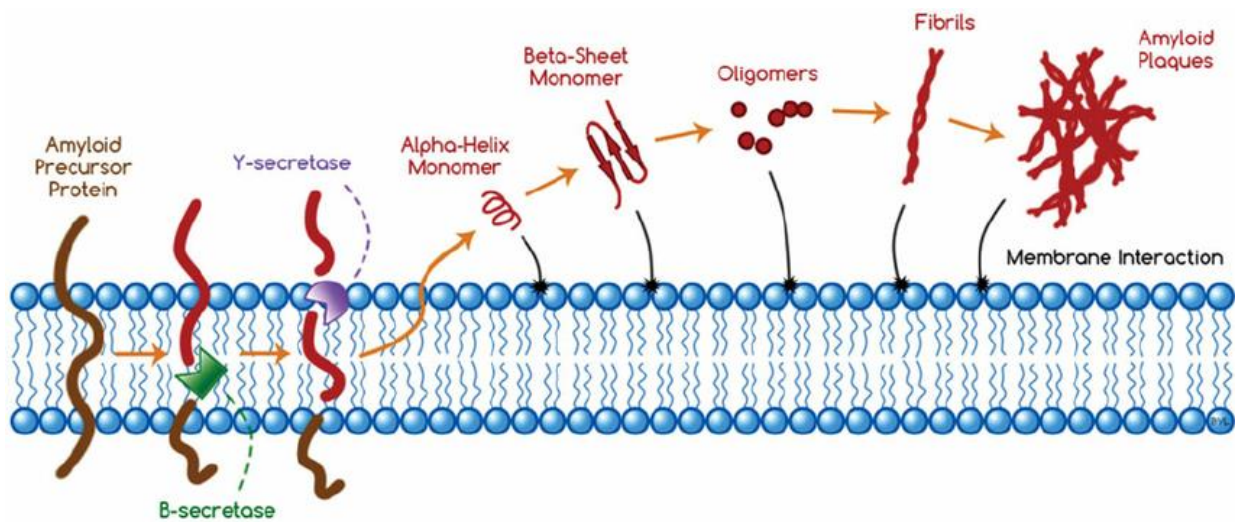
La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, comme IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) ou IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), induit l'expression de iNOS (Inducible nitric oxide synthase), une enzyme impliquée dans la production d'oxyde nitrique (NO $\cdot$ ) (Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 1998).

Cette molécule est capable d'interagir avec de l'O $_2^{\cdot-}$ , une espèce réactive à l'oxygène, pour former du peroxynitrite (ONOO $\cdot$ ), une molécule hautement toxique pour les cellules  $\beta$  et qui augmente davantage le stress oxydatif.

## D. IAPP et plaques amyloïdes

Au cours du diabète de type 2, les molécules d'amylines ou IAPP (islet amyloid polypeptide) co-sécrétées avec l'insuline, s'agrègent à la suite d'un défaut de clivage en partie N-terminale (Figure 14) et forment des plaques amyloïdes dans le pancréas qui augmentent l'inflammation (Cao et al., 2013).





**Figure 14 : Mécanismes conduisant à la formation des plaques amyloïdes au cours du diabète de type 2.**

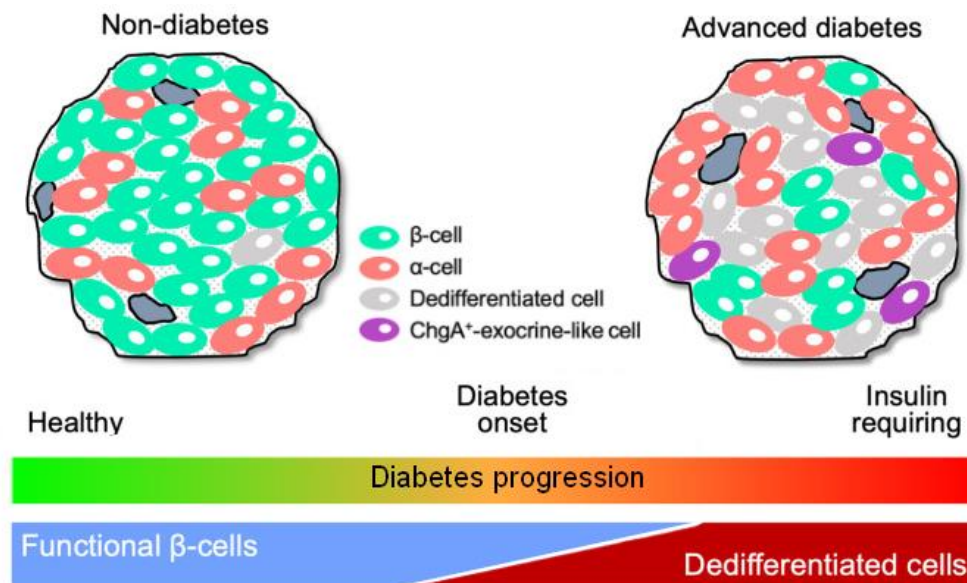
Le clivage du pro-IAPP par la  $\beta$ -sécrétase au lieu de l' $\alpha$ -sécrétase conduit à la libération du peptide A $\beta$  qui s'agrège et forme les plaques amyloïdes au cours du diabète de type 2 (Drolle et al., 2014).

L'IAPP génère également un stress du réticulum endoplasmique lors de son accumulation dans le RE au cours du diabète (Huang et al., 2007). Les petites particules agrégées d'IAPP sont cytotoxiques pour les cellules  $\beta$  et altèrent leur membrane (Janson et al., 1999) en générant des radicaux libres comme l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Schubert et al., 1995) conduisant à la mort des cellules. Les plaques amyloïdes sont également reconnues par les macrophages et vont être phagocytées par ces cellules, activer l'inflammasome et induire la production IL-1 $\beta$  et d'autres cytokines (Masters et al., 2010), aggravant l'inflammation dans le pancréas (Figure 13).

## E. Perte d'identité des cellules $\beta$ pancréatiques

L'apoptose a longtemps été considérée comme la cause principale de la perte de fonction et de masse des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète de type 2. Toutefois, l'augmentation de l'apoptose lors du diabète est insuffisante pour expliquer ces altérations. De récentes études ont récemment montré que les cellules  $\beta$  pouvaient subir une perte d'identité durant le développement du diabète (Cinti et al., 2016; Amo-Shiinoki et al., 2021).

Cette perte d'identité peut avoir comme origine une dédifférenciation des cellules  $\beta$  avec une perte d'expression des gènes spécifiques de la cellule  $\beta$  mature et une activation de gènes réprimés, normalement exprimés dans les cellules progénitrices. La cellule  $\beta$  peut également se transdifférencier, en changeant de type cellulaire suite à l'expression de gènes spécifiques d'autres cellules endocrines (Figure 15).



**Figure 15 : Dédifférenciation et transdifférenciation des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète de type 2.**

Les différents stress au cours du diabète de type 2 peuvent conduire à une perte d'identité et de fonction des cellules  $\beta$  par dédifférenciation, avec un retour à un état peu différencié, ou par transdifférenciation où les cellules  $\beta$  changent de type cellulaire (Adapté de Amo-Shiinoki et al., 2021).

Ces phénomènes peuvent être induit par les différents stress décrits précédemment (Khin et al., 2021). La cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$ , sécrétée dans le pancréas au cours du diabète de type 2, réduit l'expression de gènes clés impliqués dans l'identité de la cellule  $\beta$  comme *INS*, *MAFA*, *PDX1*, *FOXO1* (Forkhead box O1) et *UCN3* (Urocortin 3), et est associée à une augmentation de l'expression de la Neurogenin-3, normalement exprimée dans les progéniteurs endocriniens (Ibarra Urizar et al., 2019; Nordmann et al., 2017).

L'utilisation de ROS sur des lignées cellulaires de cellules  $\beta$  pancréatiques montrent également une inactivation des facteurs de transcription MAFA, PDX1 et NKX6.1, causée par une oxydation de ces protéines. L'expression de ces gènes est également diminuée au cours du diabète de type 2 (Guo et al., 2013). La génération de ROS, en condition glucotoxique, induit chez le rat, une diminution d'expression de *Foxo1* et *MafA*, associée à l'augmentation d'expression de la Neurogenine-3, démontrant ainsi l'induction de la dédifférenciation des cellules  $\beta$  par les ROS et le stress oxydatif (Zhang et al., 2019).

Les cellules  $\beta$  peuvent également se transdifférencier en d'autres types de cellules endocrines suite à un stress. Au cours du diabète de type 2, la présence de plaques amyloïdes qui activent notamment l'inflammation, altère également l'expression des gènes dans la cellule  $\beta$  pancréatique.

Chez l'Homme, la présence des agrégats d'IAPP est positivement corrélée à l'apparition, dans les îlots pancréatiques, de cellules bihormonales exprimant à la fois l'insuline et le glucagon et des cellules exprimant Nkx6.1, un facteur de transcription spécifique des cellules  $\beta$  matures, avec du glucagon, sans expression de l'insuline (Spijker et al., 2015). Le ratio de cellules  $\alpha/\beta$  est également augmenté dans les îlots de patients diabétiques. Ces résultats semblent montrer une conversion des cellules  $\beta$  en cellules  $\alpha$  pancréatiques au cours du diabète de type 2.

Le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydatif, l'inflammation et la perte d'identité sont des voies interconnectées affectant la cellule  $\beta$  pancréatique et conduisant au développement du diabète de type 2. Le stress du réticulum induit notamment une production de ROS plus importante, alors que les radicaux libres, en oxydant les protéines, amplifient le stress du RE. L'inflammation, par la sécrétion de cytokines, génère également la production de ROS et amplifie le stress du réticulum endoplasmique. L'accumulation d'IAPP au cours du stress du RE aboutit à la formation de plaques amyloïdes activant la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire qui altère l'identité des cellules  $\beta$  via l'expression de NF- $\kappa$ B. Un environnement glucolipotoxique provoque donc un ensemble de stress qui aboutit à la perte de l'identité et de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques et leur apoptose, conduisant ainsi au développement du diabète de type 2.

## V. Facteurs de risques et étude génétique/épigénétique du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle résultant d'interactions fortes entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux.

### A. Facteurs génétiques

A ce jour plus de 100 variants génétiques ont été identifiés et associés au développement du diabète de type 2 (Xue et al., 2018). Malgré le nombre élevé de variants identifiés par GWAS, les données génétiques obtenues expliquent seulement 10 à 15 % de l'héritabilité des diabètes. Cela s'explique par la fréquence allélique peu élevée de ces variants avec un effet faible.

Le variant rs7903146 du gène *TCF7L2* (Transcription factor 7 like 2) par exemple, correspond au locus ayant l'effet le plus important. Ce dernier augmente de 1,46 fois le risque de développer un diabète de type 2 (Cauchi et al., 2007) en réduisant la sensibilité des cellules  $\beta$  aux incrétines, comme le GLP-1, entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline (Villareal et al., 2010). D'autres gènes de susceptibilité au diabète de type 2 ont été identifiés, notamment *KCNJ11*, *IGF2BP2* (Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2), *HHEX* (Hematopoietically expressed homeobox) ou *CDKN2A* (Cyclin dependent kinase inhibitor) (Smushkin & Vella, 2010).

### B. Facteurs environnementaux et épigénétiques

L'interaction de facteurs génétiques associés aux facteurs environnementaux, contribue à l'apparition de la maladie. Parmi ces facteurs de risques environnementaux, on retrouve l'âge, le manque d'activité physique, la cigarette et l'alcool, une alimentation riche en graisses et en glucides, ou des variations de microbiote intestinal (Kolb & Martin, 2017). L'obésité est le principal facteur de risque conduisant au développement du diabète de type 2.

Ces facteurs environnementaux peuvent affecter l'expression de gènes au travers des modifications épigénétiques, qui correspondent à des modifications chimiques de l'ADN, par méthylation des cytosines, ou des histones par acétylation, méthylation, phosphorylation ou ubiquitination. Ces modifications réversibles impactent la structure de la chromatine, sans modifier la séquence ADN. Elles peuvent favoriser l'expression des gènes, en induisant l'ouverture de la chromatine (euchromatine), ou au contraire, inhiber l'expression des gènes en maintenant la chromatine fermée (hétérochromatine).

Au niveau épigénétique, l'obésité induit notamment une diminution de la méthylation du gène SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) augmentant son expression dans le sang humain (Wang et al., 2018). Ce gène inhibant la signalisation JAK/STAT, sa surexpression perturbe la voie de signalisation de l'insuline et de la leptine, conduisant à l'apparition d'une résistance à ces 2 hormones (Pedroso et al., 2019).

D'autres études ont également montré l'impact des conditions gluco- et lipotoxiques qui entraînent d'importantes variations de la méthylation de l'ADN (Hall et al., 2014; Hu et al., 2014). Ces variations au niveau des gènes impliqués dans la fonction des cellules  $\beta$  conduisent à une diminution de la sécrétion de l'insuline. On retrouve, par exemple dans la cellule  $\beta$ , une diminution d'expression du gène *ADCY5* (Adenylate cyclase 5), une adénylate cyclase intervenant dans la transduction du signal induit par le glucose, qui est impliquée dans la sécrétion de l'insuline (Hodson et al., 2014; Hu et al., 2014).

Le manque d'activité physique peut également induire des variations de méthylation de l'ADN au niveau des muscles (Alibegovic et al., 2010). Certains gènes, comme *PPARGC1A* (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1), subissent une augmentation de leur méthylation, réduisant leur expression. Ce dernier code un coactivateur transcriptionnel impliqué dans des processus clés de la mitochondrie et régule notamment la sensibilité à l'insuline. Une expression anormale peut donc induire une résistance à l'insuline, conduisant au diabète de type 2 (Russell, 2005).

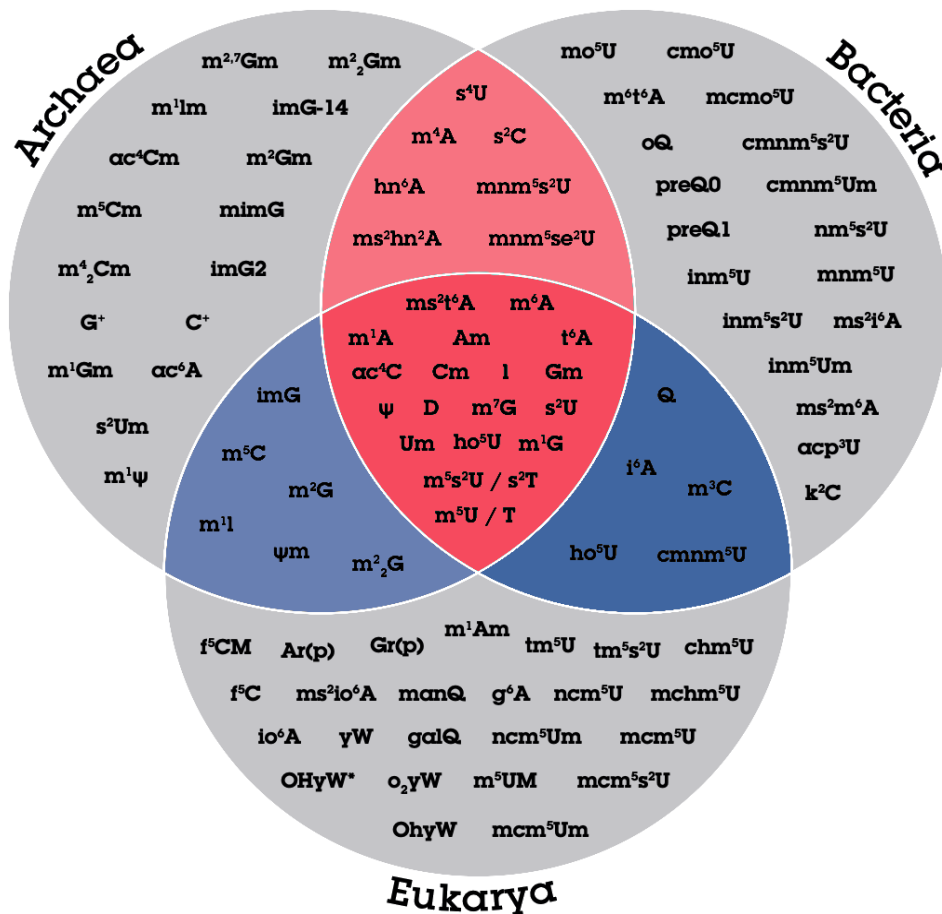
Enfin, l'âge peut également influencer le développement d'un diabète de type 2. En effet, le gène *COX7A1* (Cytochrome C oxidase subunit 7A1) montre une méthylation augmentée avec l'âge, réduisant son expression dans les muscles squelettiques (Rönn et al., 2008). Ce gène code une protéine du complexe IV, une sous-unité de la chaîne respiratoire mitochondriale et intervient donc dans le métabolisme du glucose. La méthylation de ce gène peut altérer la fonction mitochondriale et conduire à une diminution de l'absorption du glucose.

L'environnement peut également impacter l'expression génique à un tout autre niveau. En effet, d'autres modifications chimiques, similaires aux modifications épigénétiques, ont été identifiées sur les ARN. Ces modifications épitranscriptomiques, dont la régulation peut être impactée par des variations environnementales, pourraient également être impliquées dans le développement de maladie métaboliques comme le diabète de type 2.

## VI. L'épitranscriptomique

L'épitranscriptome regroupe l'ensemble des modifications de l'ARN. Bien que les premières modifications épitranscriptomiques aient été découvertes il y a plus de 60 ans, elles ont été très peu étudiées jusqu'à récemment. Plus de 170 modifications ont été identifiées à ce jour, comme la méthylation, l'acétylation ou l'hydroxylation (Boccaletto et al., 2018). Elles sont retrouvées chez tous les êtres vivants allant des archées aux eucaryotes, et peuvent être présentes sur différents types d'ARN (Figure 16).

Contrairement aux modifications épigénétiques, les modifications épitranscriptomiques n'influencent pas uniquement l'expression des gènes, mais permettent de réguler plus finement la fonction et/ou le métabolisme de l'ARN (tel que la stabilité, l'export ou l'épissage des ARN).

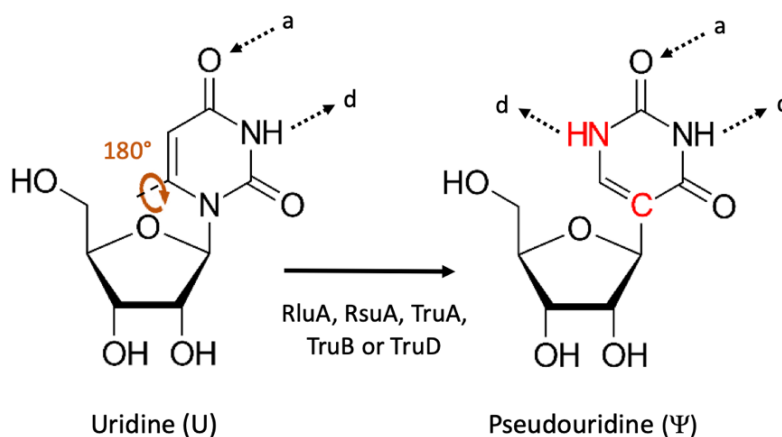


**Figure 16: Exemples de la diversité des modifications épitranscriptomiques chez les archées, bactéries et eucaryotes.** Une centaine de modifications épitranscriptomiques sont représentées ici. Certaines modifications sont retrouvées uniquement dans un seul règne du vivant (parties grises) alors que d'autres peuvent être communes à plusieurs règnes (parties bleues et roses). Ces modifications jouent un rôle essentiel dans le métabolisme et la fonction des ARN (Figure issue du poster abcam « RNA modifications »).

## A. La pseudouridine, première modification de l'ARN identifiée

C'est en 1957 que la première modification de l'ARN est découverte par F.F. Davis et F.W. Allen (Davis & Allen, 1957), quelques années après la découverte de la première modification épigénétique ( $m^5C$ ) de l'ADN en 1950 (Wyatt, 1950). Identifiée dans les ARN de levure, cette « 5<sup>e</sup> base de l'ARN » est un isomère de l'uridine, appelée par la suite pseudouridine, ou  $\Psi$  (Cohn, 1960).

L'isomérisation post-transcriptionnelle de l'uridine est catalysée par des pseudouridines synthases de 5 familles différentes : RluA (Dual-specificity RNA pseudouridine synthase), RsuA (Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A), TruA, TruB et TruD (tRNA pseudouridine synthase A/B/D) (Hamma & Ferré-D'Amaré, 2006). Elle permet notamment d'établir un pont hydrogène supplémentaire suite à la rotation de  $180^\circ$  de l'uracile (Figure 17).



**Figure 17 : Isomérisation de l'uridine par rotation de  $180^\circ$  de l'uracile.**

Cette réaction fait intervenir des pseudouridines synthases. L'uridine possède un pont hydrogène accepteur (a) et un pont hydrogène donneur (d). La pseudouridine permet de former un pont hydrogène donneur (d) supplémentaire.

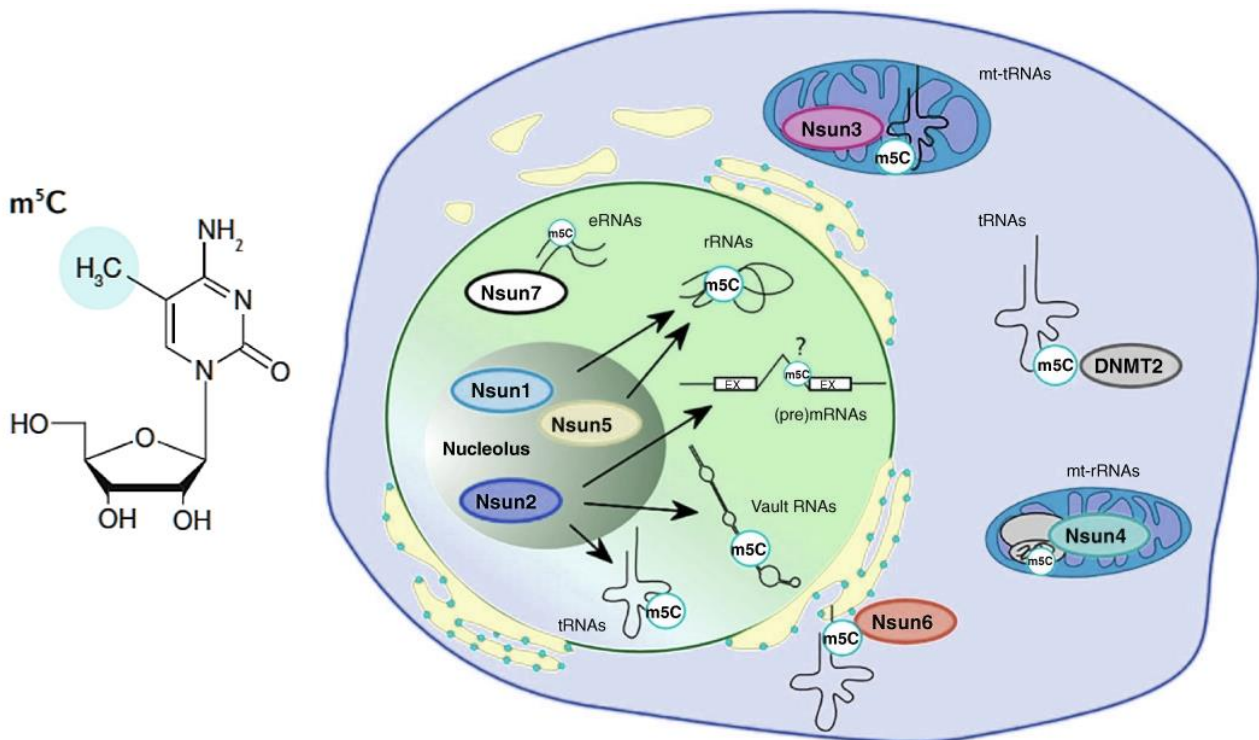
Cette modification est omniprésente chez tous les êtres vivants, dans les ARN de transfert (ARNt) (Pascal & Westhof, 1998), les ARN ribosomiques (ARNr) (King et al., 2003; Penzo & Montanaro, 2018), les petits ARN nucléaires (ARNsn) (Karunatilaka & Rueda, 2014) ainsi que les ARN messagers (ARNm). Elle permet de stabiliser les structures secondaires des ARN et les interactions ARN-protéines ou ARN-ARN lors de l'épissage et la traduction.

Plus rare dans les ARNm (Carlile et al., 2014), la pseudouridine est retrouvée majoritairement dans les régions codantes, mais peut également avoir lieu en région 5' et 3'UTR. Le rôle de la pseudouridine dans l'ARNm est encore peu connu mais des études montrent que la présence de pseudouridines ralentit la traduction des ARN et améliore leur stabilité (Eyler et al., 2019; Karikó et al., 2008).

## B. Exemples de méthylation de l'ARN

Une grande partie des modifications découvertes par la suite correspondent à des méthylations de l'ARN. Parmi les nombreuses marques de méthylations on retrouve la 7-méthylguanosine ( $m^7G$ ), la 5-méthylcytosine ( $m^5C$ ), et la N1-méthyladénosine ( $m^1A$ ), correspondants aux marques les plus courantes

La méthylation  $m^5C$ , découverte en 1958 (Amos & Korn, 1958), est l'une des premières méthylations de l'ARN identifiée. Cette modification est retrouvée sur les ARNr, les ARNt et les ARNm et d'autres types d'ARN non codants. Cette marque peut être retirée par la déméthylase ALKBH1 (AlkB homolog 1) et peut être ajoutée par 8 méthyltransférases : NSUN1 à NSUN7 (NOP2/Sun RNA methyltransferases) et DNMT2 (DNA Methyltransferase 2), chacune ayant des cibles spécifiques (Figure 18).



**Figure 18 : Localisation et cibles des différentes méthyltransférases impliquées dans la méthylation  $m^5C$  de l'ARN.** Schéma de la méthylation  $m^5C$  et localisation des différentes méthyltransférases responsables de l'ajout du groupement méthyle sur la cytosine. Chacune des enzymes possède une localisation et des cibles spécifiques (Adapté de Trixl & Lusser, 2019).

NSUN1 et NSUN5 par exemple (Bourgeois et al., 2015; Schosserer et al., 2015), méthyleront de manière spécifique l'ARNr 28S. Le groupement méthyle en position 5 de la cytosine permet de stabiliser la structure de l'ARN ribosomiques en renforçant les ponts hydrogènes avec la guanosine et améliore ainsi la traduction des ARNm (Gigova et al., 2014; Hong et al., 1997).



NSUN2, NSUN6 et DNMT2 méthylent spécifiquement les cytosines des ARNt (Goll et al., 2006; Haag, Warda, et al., 2015; Tuorto et al., 2012). Ces 3 enzymes, qui ont chacune des localisations différentes, pourraient intervenir dans les différents stades de la biogénèse des ARNt. NSUN2 par exemple, se situe majoritairement dans le noyau et intervient au début de la biogénèse des ARNt (Brzezicha et al., 2006). DNMT2, qui se situe à la fois dans le noyau et le cytoplasme (Schaefer et al., 2008), intervient ensuite. Enfin, l'enzyme cytoplasmique NSUN6, enrichie au niveau de l'appareil de Golgi (Haag, Warda, et al., 2015), intervient en fin de biogénèse. Dans les ARNt, la méthylation m<sup>5</sup>C peut avoir un rôle différent selon le site de méthylation. Au cœur de l'ARNt la méthylation améliore la stabilité des ARNt, et promeut la traduction lorsqu'elle est proche du site de l'anticodon (Tuorto et al., 2012).

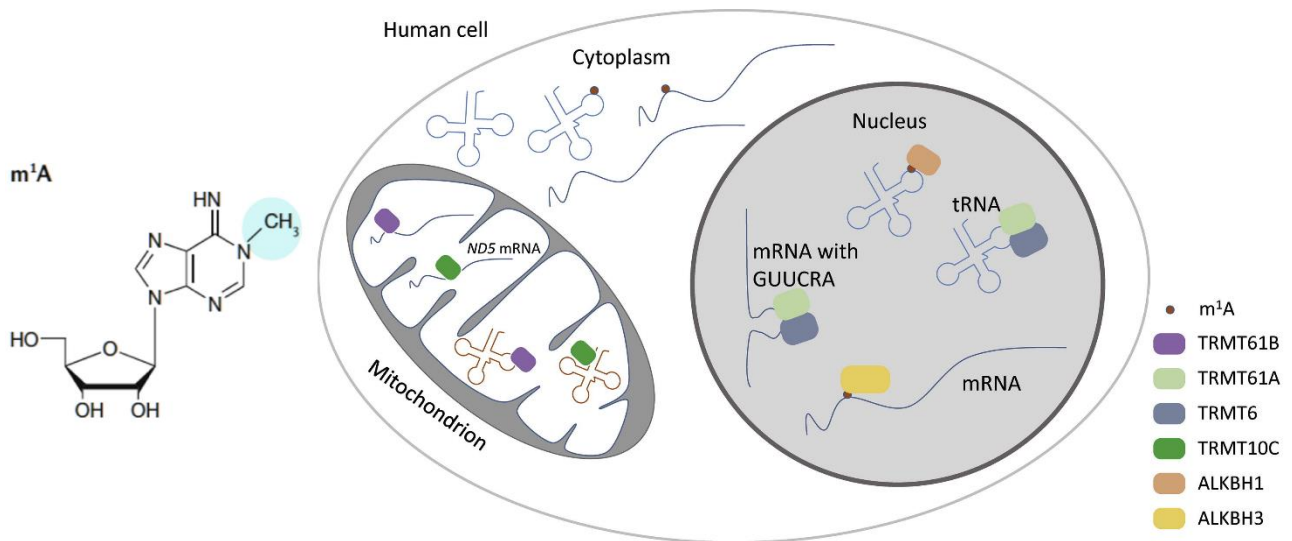
NSUN3 et NSUN4 sont impliquées dans la méthylation m<sup>5</sup>C des ARN mitochondriaux. NSUN4 cible l'ARN ribosomique 12S en formant un hétérodimère avec le facteur de transcription mitochondrial MTERF4 (Mitochondrial transcription termination factor 4) (Cámara et al., 2011). Ce complexe protéique joue un rôle essentiel à l'assemblage des ribosomes mitochondriaux et la traduction (Metodiev et al., 2014). NSUN3 est localisée dans la matrice mitochondriale et méthyle spécifiquement l'ARNt mitochondriale de la méthionine (Nakano et al., 2016). Cet ARNt intervient au moment de l'initiation et l'élongation de la traduction des ARN mitochondriaux. Par l'intervention d'ALKBH1, l'ARN méthylé est oxydé en formylcytosine (f<sup>5</sup>C), ce qui permet d'étendre la reconnaissance des codons non conventionnels de la méthionine (Haag et al., 2016).

NSUN2 et NSUN7 interviennent sur d'autres types d'ARN non codants, respectivement les ARN « vault » (Hussain et al., 2013) et les ARN « enhancer » (Aguilo et al., 2016). Les ARN « vault » (ARNvt) forment, en s'associant à de nombreuses protéines, des pores nucléaires impliqués dans de nombreux processus cellulaires. Les ARN enhancer (ARNe) sont des ARN transcrits à partir des séquences « enhancers » retrouvées en amont des promoteurs et interviennent dans la régulation de l'expression des gènes. La méthylation de ces ARN permet de stabiliser leur structure.

NSUN2 pourrait également être impliqué dans la méthylation m<sup>5</sup>C des ARNm. En effet, NSUN2 est la seule enzyme dont l'inactivation conduit à une diminution de la méthylation des ARNm (Yang et al., 2017). La méthode de séquençage au bisulfite, utilisée pour détecter les sites de méthylation m<sup>5</sup>C sur l'ADN, a également pu mettre en évidence des régions spécifiques de méthylation sur l'ARNm. Ainsi, des études ont pu montrer un enrichissement de la méthylation m<sup>5</sup>C au niveau des régions 5' et 3'UTR des ARNm, plus particulièrement autour du codon start (Tang et al., 2015; Xing et al., 2015).

La méthylation  $m^5C$  des ARNm pourrait donc influencer leur traduction, en intervenant dans les interactions ARN-protéines.

La méthylation  $m^1A$ , découverte en 1961 (Dunn, 1961), est retrouvée sur l'ARNr 28S, les ARNt, les ARNm cytoplasmiques et les ARNm mitochondriaux (Figure 19). Le groupement méthyle en position N1 de l'adénosine altère l'appariement des bases et bloque la rétrotranscription ce qui a permis d'établir un profil de méthylation des ARN par séquençage (Hauenschild et al., 2015; X. Li et al., 2016).



**Figure 19 : Localisation et cibles des différentes méthyltransférases et déméthylases impliquées dans la méthylation  $m^1A$  de l'ARN.**

Méthylation  $m^1A$  et localisation des différentes méthyltransférases responsables de l'ajout du groupement méthyle en position N1 de l'adénosine. Chacune des enzymes possède une localisation et des cibles spécifiques (Adapté de Zhang & Jia, 2018).

Cinq sites de méthylation  $m^1A$  ont été identifiés dans les ARNt cytoplasmiques (Anderson & Droogmans, 2005), dont la méthylation en position 58, qui est présente dans 25% des ARNt. Ce site de méthylation très conservé est essentiel à la structure et la stabilité des ARNt. Cette modification est ajoutée sur les ARNt par la méthyltransférase TRMT6/TRMT61 (tRNA methyltransferase 6/61) (Ozanick et al., 2005). La marque  $m^1A$  en position 58 est retirée par la déméthylase ALKBH1 (Liu et al., 2016), ce qui induit une diminution de la traduction. Les autres sites de méthylation des ARNt peuvent être retirés par ALKBH3 mais cela induit l'effet inverse, avec une amélioration de la traduction (Ueda et al., 2017).

Sur l'ARNr 28S, la méthylation est catalysée par la protéine NML (Nucleométhylase) en position 1322 et contribue à l'assemblage de la sous-unité 60S des ribosomes (Waku et al., 2016).

Sur les ARNm, la méthylation m<sup>1</sup>A est peu abondante. Elle est majoritairement localisée en région 5'UTR où elle est corrélée à l'augmentation de la traduction des ARNm (Dominissini et al., 2016). Les ARNm cytoplasmiques sont méthylés par la méthyltransférase TRMT6/61A (Li et al., 2017). La méthylation m<sup>1</sup>A peut être retirée sur les ARNm par ALKBH3 (AlkB homolog 3) (Li et al., 2016).

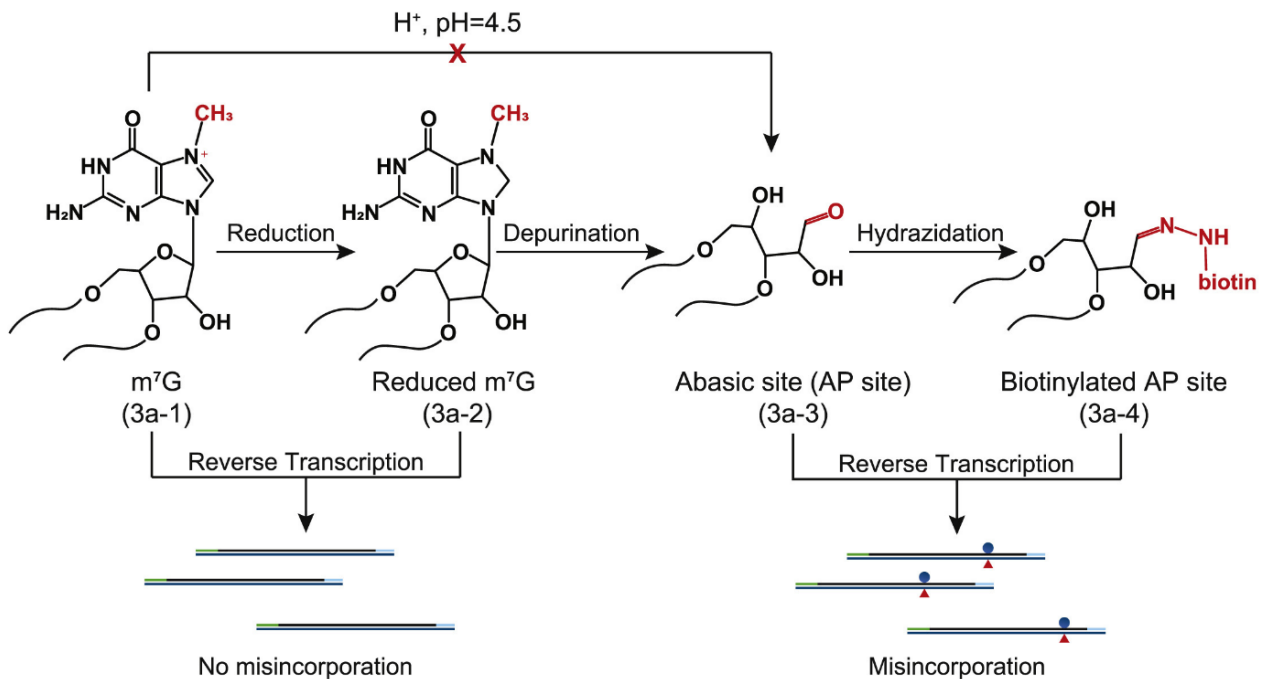
On retrouve également la méthylation m<sup>1</sup>A sur les ARNm et ARNt mitochondriaux. Sur ces ARNt, la méthylation a lieu en position 9 et 58 et est catalysée par les enzymes TRMT10C et TRMT61B respectivement (Chujo & Suzuki, 2012; Vilardo et al., 2012). Sur les ARNm mitochondriaux, elle est principalement localisée dans les régions codantes (CDS) et inhibe leur traduction (Li et al., 2017). Dix transcrits mitochondriaux ont été identifiés, dont 5 sont méthylés par la méthyltransférase TRMT61B (localisée dans la mitochondrie) (Li et al., 2017), et 1 transcrit (l'ARNm ND5) par la méthyltransférase, TRMT10C (Safra et al., 2017). D'autres méthyltransférases, encore inconnues à ce jour, seraient responsables de la méthylation des autres transcrits.

La méthylation m<sup>7</sup>G, a été identifiée dans les années 70 (Furuichi et al., 1975). Elle est présente sur l'ARNr 18S, les ARNt et les ARNm. Sur l'ARNr 18S, l'ajout du groupement méthyle est catalysée par la méthyltransférase WBSR22 (Williams-Beuren syndrome critical region 22). Cette enzyme joue un rôle essentiel dans la biogénèse des ribosomes et permet d'assembler la petite sous-unité 40S (Öunap et al., 2013). Toutefois, son activité catalytique n'est pas nécessaire et sa fonction en tant que méthyltransférase est encore inconnue (Haag et al., 2015).

Sur les ARNt, la méthylation m<sup>7</sup>G est nécessaire au bon déroulement de la traduction des ARNm (Lin et al., 2018). Les groupements méthyles sont ajoutés en position 46 par la méthyltransférase METTL1 (Methyltransferase-like 1) associée à la protéine WDR4 (WD repeat domain 4) qui permet la stabilisation du complexe protéique et la fixation du complexe à l'ARN.

Dans les ARNm, la marque m<sup>7</sup>G a d'abord été identifiée en 5', au niveau de la coiffe. Elle est ajoutée lors de l'initiation de la transcription (Salditt-Georgieff et al., 1980) et permet de protéger les ARNm de la dégradation par les exonucléases (Furuichi et al., 1977). Récemment une nouvelle méthode de détection de la méthylation m<sup>7</sup>G a permis de mettre en évidence des sites de méthylation internes dans les ARNm (Zhang et al., 2019). Cette méthode associe le séquençage des ARN à un ensemble de réactions chimiques qui convertit les bases m<sup>7</sup>G en sites abasiques (Figure 20). La conversion provoque des erreurs dans l'incorporation des bases lors de la rétrotranscription et permet une détection des marques m<sup>7</sup>G avec une résolution d'une seule base.

La méthylation interne des ARNm est catalysée par l'hétérodimère METTL1-WDR4. L'importance de ces méthylations internes des ARNm n'est pas encore clairement identifiée, mais la marque m<sup>7</sup>G permettrait d'améliorer la traduction des ARNm (Zhang et al., 2019).



**Figure 20 : Traitement chimique des ARN méthylés en m<sup>7</sup>G avant séquençage.**

Les ARN méthylés subissent un ensemble de réactions chimiques afin de détecter les sites de méthylation m<sup>7</sup>G par séquençage. Adapté de (Zhang & Jia, 2018). La réduction puis la dépurination de la guanosine permet de former un site abasique induisant des erreurs lors de la rétrotranscription qui pourront être ensuite détectées par séquençage. L'hybridation de la guanosine à la biotine permet de séquencer uniquement les ARN méthylés (Adapté de Zhang et al., 2019).

Parmi ces différentes modifications de l'ARN on retrouve également la méthylation m<sup>6</sup>A. Cette méthylation, qui est la modification des ARNm la plus abondante chez les eucaryotes (Jones et al., 2020) et l'une des plus étudiées, sera décrite dans la partie suivante.

## C. La méthylation m<sup>6</sup>A

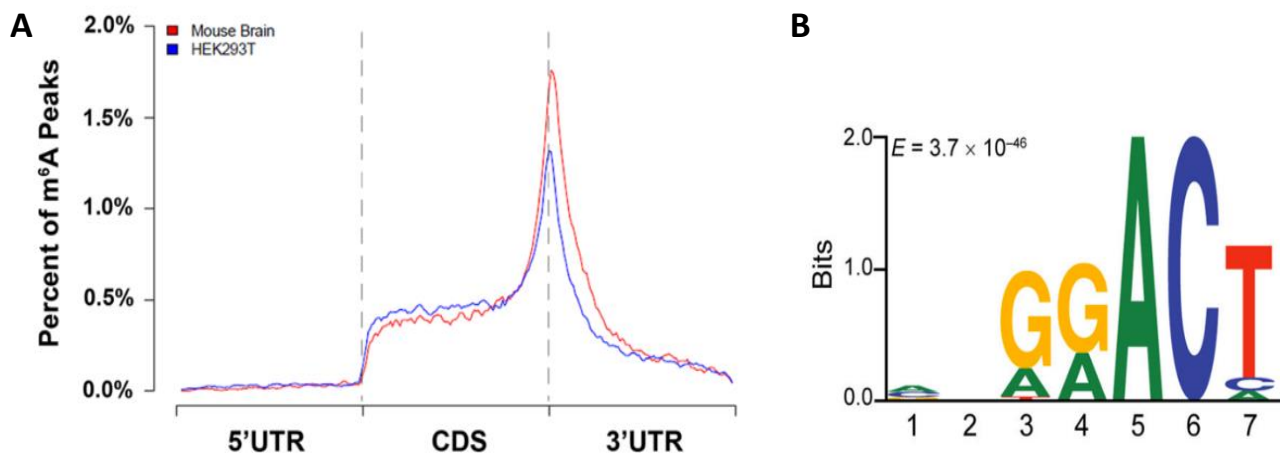
### 1. Généralités

La méthylation en position N6 des adénosines (m<sup>6</sup>A), a été découverte en 1974 (Desrosiers et al., 1974) mais a été très peu étudiée jusqu'à récemment. Le développement récent de techniques d'immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A, associées au séquençage (MeRIP-seq) ont permis de cartographier le méthylome humains et murins (Dominissini et al., 2012) et d'avoir une meilleure compréhension de l'importance de cette modification épitranscriptomique.

On retrouve en moyenne 3 à 5 résidus m<sup>6</sup>A par ARNm, toutefois tous ne sont pas méthylés, suggérant que la méthylation m<sup>6</sup>A n'est pas obligatoirement requise dans les ARNm.

Chez l'Homme, environ 20% des ARN sont méthylés, avec 12 000 sites de méthylation répartis sur 7000 gènes (Dominissini et al., 2012). Une partie de ces sites de méthylation sont conservés chez la souris, avec 49 à 57% des pics de méthylation en commun.

On retrouve une distribution spécifique de la méthylation m<sup>6</sup>A sur l'ARNm (Figure 21A). En effet, la méthylation m<sup>6</sup>A est majoritairement localisée dans les régions codantes (CDS) et la région 3'UTR, principalement autour du codon stop (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012). De manière intéressante, la méthylation m<sup>6</sup>A est enrichie au niveau de séquences cibles de microARN en 3'UTR (Chen et al., 2015). On la retrouve plus particulièrement au niveau des séquences consensus DRACH (D = A,G,T ; R = G,A et H = T,C,A), la séquence prévalente étant GGACU (Figure 21B).



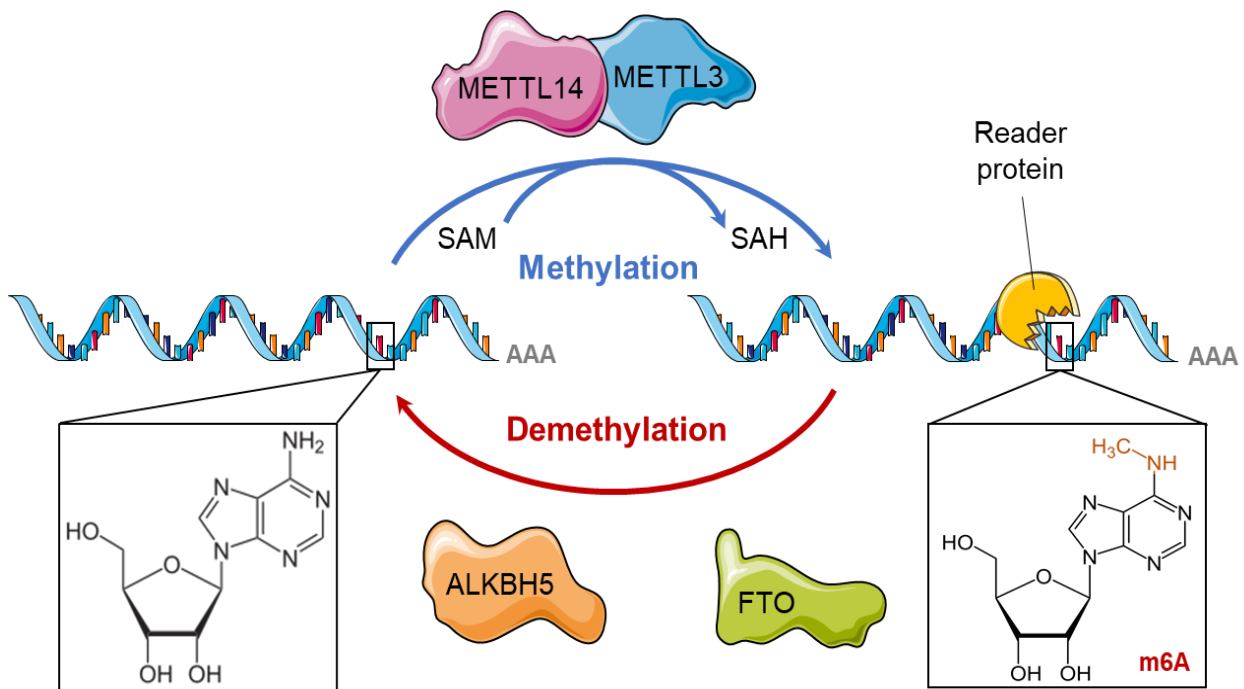
**Figure 21: Localisation de la méthylation m<sup>6</sup>A sur l'ARNm.**

(A) La méthylation m<sup>6</sup>A est majoritairement localisée dans les régions CDS et 3'UTR, autour du codon stop dans les ARNm de cellules HEK293T (en bleu) et de cerveau murin (en rouge) (Meyer et al., 2012). (B) Séquence consensus autour du résidu d'adénosine méthylé en position 5 (Linder et al., 2015).

Les groupements méthyles sont ajoutés sur les adénosines au cours de la transcription (Ke et al., 2017; Slobodin et al., 2017). La méthylation m<sup>6</sup>A de l'ARN se déroule donc principalement dans le noyau, bien qu'une infime partie de la méthylation peut également avoir lieu dans le cytoplasme (Ke et al., 2017). Une étude réalisée par Slobodin et al. (Slobodin et al., 2017) montre que l'ajout des groupements méthyle dépend de la vitesse de transcription de l'ARN polymérase II et influence la traduction des ARNm. Une vitesse de transcription élevée réduit l'ajout de groupements méthyles sur les adénosines et améliore l'efficacité de traduction.

La méthylation  $m^6A$  est une modification réversible régulée par 2 groupes de protéines : les méthyltransférases (ou  $m^6A$  « writers ») METTL3 et METTL14, qui ajoutent les groupements méthyle sur l'ARN, et les déméthylases ( $m^6A$  « erasers ») FTO et ALKBH5, qui les retirent (Figure 22).

Cette modification peut être reconnue par différentes protéines « readers » qui vont impacter différemment le devenir de l'ARN.



**Figure 22: Méthylation  $m^6A$  et déméthylation de l'ARNm.**

L'ARNm est méthylyé en position N6 de l'adénosine par un complexe de méthyltransférases composés notamment de METTL3 et METTL14. La S-adenosylméthionine (SAM) est utilisée par METTL3 comme donneur de méthyle. La méthylation  $m^6A$  de l'ARN est reconnue par des protéines « readers » qui régule le métabolisme et/ou la fonction de l'ARN. Cette modification est réversible et peut être retirée par les déméthylases ALKBH5 et FTO.

La méthylation  $m^6A$  peut être également présentes sur les autres types d'ARN. On la retrouve notamment sur les ARNr (Ma et al., 2019; van Tran et al., 2019) où elle intervient dans la formation des ribosomes.

Les microARN sont également la cible de la méthylation  $m^6A$ . La méthylation des microARN primaires permet notamment la reconnaissance et la fixation de DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), une protéine impliquée dans leur maturation (Alarcón et al., 2015a) grâce à l'intervention d'une protéine « reader » (Alarcón et al., 2015b). A l'inverse, la méthylation  $m^6A$  peut également être régulée par des microARN en modulant notamment la localisation de la méthyltransférase METTL3 au niveau des « speckles » nucléaires (Chen et al., 2015).

Les petits ARN nucléaires (ARNsn) peuvent aussi être méthylés, comme par exemple l'ARNsn U6, impliqué dans l'épissage et méthylé sur le résidu A43 dans une région impliquée dans l'interaction avec les pré-ARNm (Warda et al., 2017).

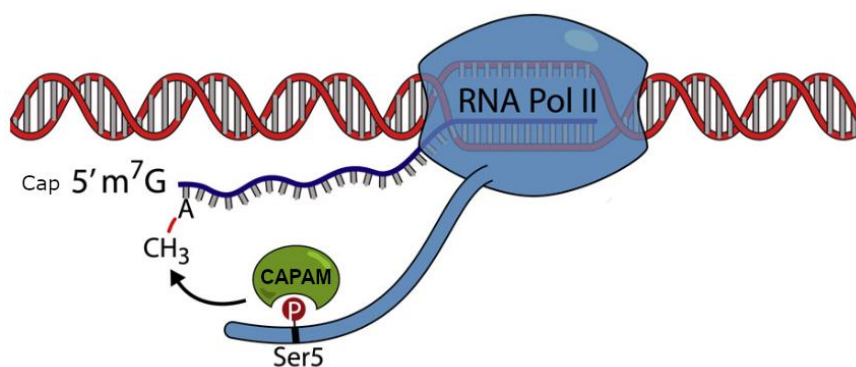
Les long ARN non codants (ARNlnc) subissent également la méthylation  $m^6A$ , tel que *MALAT1* (Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) qui régule la transcription, l'épissage alternatif et piège les microARN. Le résidu méthylé permet notamment de modifier la structure de l'ARN, donnant accès au site de liaison (Liu et al., 2017) pour des protéines impliquées dans l'épissage des ARNm.

Enfin, les ARNt sont méthylés en position N6 des adénosines chez les archées et bactéries mais le rôle de la méthylation  $m^6A$  n'est pas encore déterminé.

## 2. La méthylation $m^6Am$

Un autre type de méthylation, très proche de la méthylation  $m^6A$  est également retrouvée sur les ARN. La méthylation  $m^6Am$  de l'ARN (2'-O-méthyladénosine) est découverte en 1975, peu de temps après la méthylation  $m^6A$  (Wei et al., 1975). Elle est retrouvée sur les ARNm en 5'UTR, adjacent à la coiffe (Keith et al., 1978), et sur les petits ARN nucléaires (ARNsn) (Goh et al., 2020).

METTL4 est impliquée dans la méthylation de l'ARNsn U2 en position A30 (chez l'Homme) (Chen et al., 2020 ; Goh et al., 2020). La méthylation de ce composant majeur du spliceosome améliore l'épissage des pré-ARNm. La protéine CAPAM (Cap specific adenosine methyltransferase), récemment identifiée comme méthyltransférase, est impliquée dans la méthylation  $m^6Am$  des ARNm (Akichika et al., 2019; Sendinc et al., 2019), sur la première adénosine suivant la coiffe. Cette enzyme est localisée dans le noyau et interagit avec la polymérase II (Fan et al., 2003) pour déposer les groupements méthyles de manière co-transcriptionnelle.



**Figure 23: Méthylation  $m^6Am$  de l'ARNm en 5'UTR par la méthyltransférase CAPAM.**

La méthyltransférase CAPAM interagit avec la polymérase II afin de méthylater l'ARNm de manière co-transcriptionnelle sur l'adénosine adjacente à la coiffe (Adapté de Pandey et al., 2020).

La méthylation m<sup>6</sup>Am est une marque réversible, qui peut être retirée par la déméthylase FTO (Mauer et al., 2017). Cette enzyme est également capable de retirer d'autres marques de méthylation comme la marque m<sup>6</sup>A et m<sup>1</sup>A, toutefois l'affinité de FTO pour son substrat dépend du contexte cellulaire. Dans le noyau, la principale cible de la déméthylase est la méthylation m<sup>6</sup>A, avec peu de déméthylation pour la marque m<sup>6</sup>Am. A l'inverse, dans le cytoplasme, l'activité de FTO pour la marque m<sup>6</sup>Am est beaucoup plus importante (Wei et al., 2018).

La fonction biologique de la méthylation m<sup>6</sup>Am est peu claire, plusieurs études ayant obtenues des résultats divergents. Cette modification permettrait d'améliorer (Akichika et al., 2019) ou réduire la traduction des ARN méthylés (Sendinc et al., 2019) et diminuerait ou augmenterait leur stabilité en les protégeant de la dégradation (Boulias et al., 2019; Mauer et al., 2017).

### 3. Les méthyltransférases m<sup>6</sup>A

La méthylation des adénosines, formant la N6-méthyladénosine, est catalysée par un complexe protéique, chacune des protéines jouant un rôle spécifique dans la méthylation de l'ARN.

La première sous unité du complexe identifiée est la protéine METTL3 (Methyltransferase-like 3), découverte en 1997 chez l'Homme (Bokar et al., 1997). Cette enzyme d'environ 64 kDa possède un domaine méthyltransférase (MTD) catalysant l'ajout de groupement méthyle sur l'adénosine, par interaction avec la S-adénosylméthionine (SAM) (Figure 22), un donneur de méthyle des méthyltransférases (Bokar et al., 1997). Une séquence NLS (nuclear localization signal) entre le domaine MTD et la partie N-terminale permet une localisation nucléaire de la protéine (Schöller et al., 2018). Enfin, cette méthyltransférase possède également un domaine à doigt de zinc (ZFD) responsable de la spécificité du complexe méthyltransférase pour la séquence consensus DRACH.

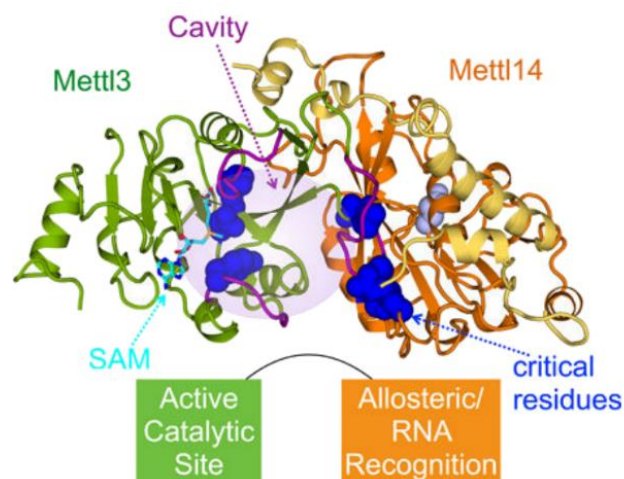
METTL3 peut être sumoylée par SUMO1 (Small Ubiquitin Like Modifier 1) sur les résidus lysine K177, K211 et K215. Cette modification réduit l'activité méthyltransférase de METTL3 et affecte la méthylation m<sup>6</sup>A de l'ARN. METTL3 possède également plusieurs sites de phosphorylation sur les résidus sérine en S43, S50 et S525. Ces modifications post-traductionnelles permettent de stabiliser la méthyltransférase en recrutant le facteur de désubiquitination USP5 (Ubiquitin Specific Peptidase 5) qui retire l'ubiquitine de la protéine et empêche sa dégradation (Sun et al., 2020).

Il a été montré par la suite que la méthyltransférase METTL3 était associée à une autre méthyltransférase au sein du complexe. La méthyltransférase METTL14 (Methyltransferase-like 14), appartenant à la même famille, partage une homologie de 43% avec METTL3 (Liu et al., 2014).



Cette protéine de 52 kDa possède une faible activité méthyltransférase due à un domaine catalytique dégénéré, empêchant notamment l'interaction avec la S-adenosyl méthionine (Wang et al., 2016). METTL14 sert de support structural à METTL3 par interactions allostériques des domaines MTD (Figure 24). Elle permet également la liaison du complexe à l'ARN avec son domaine méthyltransférase (MTD) mais aussi grâce aux répétitions RGG (Arginine-Glycine-Glycine) dans sa séquence d'acides aminés en partie C-terminale (Schöller et al., 2018). Contrairement à METTL3, METTL14 ne possède pas de séquence NLS, la protéine est importée jusqu'au noyau sous forme de dimère avec la seconde méthyltransférase. Cette méthyltransférase possède un unique site de phosphorylation dont la fonction n'a pas encore été identifiée.

Ces 2 protéines, majoritairement localisées dans le noyau, forment ensemble un hétérodimère correspondant à la partie catalytique du complexe méthyltransférase. METTL3 peut toutefois méthyler l'ARN de manière indépendante mais avec une activité méthyltransférase réduite (Lin et al., 2016).



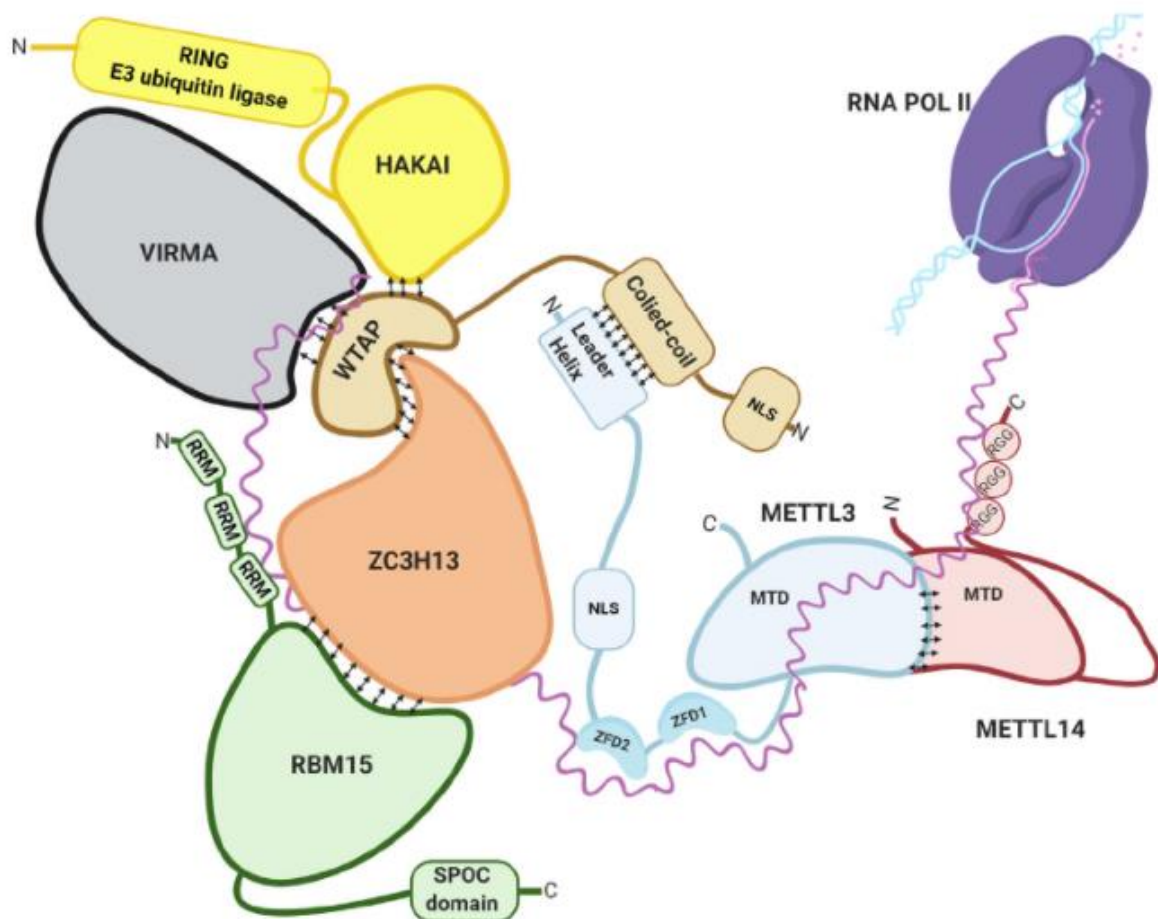
**Figure 24 : Structure des domaines méthyltransférases (MTD) de METTL3 et METTL14.**

Le domaine méthyltransférase de METTL3 (en vert) est capable de se lier à la S-adenosyl méthionine (SAM) grâce à une poche dans son site catalytique, les sphères bleues représentant les acides aminés critiques pour le maintien de son activité. La méthyltransférase METTL14 interagit avec METTL3 et stabilise sa structure. Elle possède également un domaine méthyltransférase dégénéré (en orange) intervenant dans la fixation aux ARNm cibles (Wang et al., 2016).

Récemment une équipe a identifié *in silico* une molécule capable d'améliorer l'activité de l'hétérodimère METTL3/METTL14 (Selberg et al., 2019). Cette molécule, un dérivé de la pipérazine, se lie de manière combinée à la S-adenosyl méthionine dans la poche catalytique de METTL3. Elle permet d'améliorer l'affinité de SAM avec la méthyltransférase et réduit la quantité d'énergie nécessaire à la méthylation des ARN. Plusieurs inhibiteurs spécifiques de la méthyltransférase METTL3 ont également été caractérisés, se fixant en partie au site de liaison de SAM (Moroz-Omori et al., 2021; Yankova et al., 2021).

D'autres protéines, n'appartenant pas à la famille des méthyltransférases, ont été identifiées au sein du complexe (Figure 25). La protéine WTAP (Wilms' tumor 1-associating protein) par exemple, joue un rôle crucial au sein du complexe. En se liant à METTL3, elle aide à stabiliser les interactions protéiques au sein du complexe et permet la co-localisation des 2 méthyltransférases au niveau des « speckles » nucléaires (Ping et al., 2014; Schöller et al., 2018).

VIRMA (Vir-like m<sup>6</sup>A methyltransferase associated), qui interagit avec WTAP et stabilise aussi le complexe (Yue et al., 2018), est nécessaire à la méthylation m<sup>6</sup>A en région 3'UTR des ARN. Elle est également impliquée dans le processus de polyadénylation alternative des ARNm en 3'UTR. En effet, la protéine peut interagir avec les facteurs de clivage et polyadénylation CPSF5 et CPSF6. De manière intéressante, des sites de méthylation m<sup>6</sup>A sont souvent retrouvés à proximité des sites de polyadénylation (PAS), indiquant que la méthylation m<sup>6</sup>A est impliquée dans la régulation de ce processus (Yue et al., 2018).



**Figure 25 : Composition du complexe méthyltransférase.**

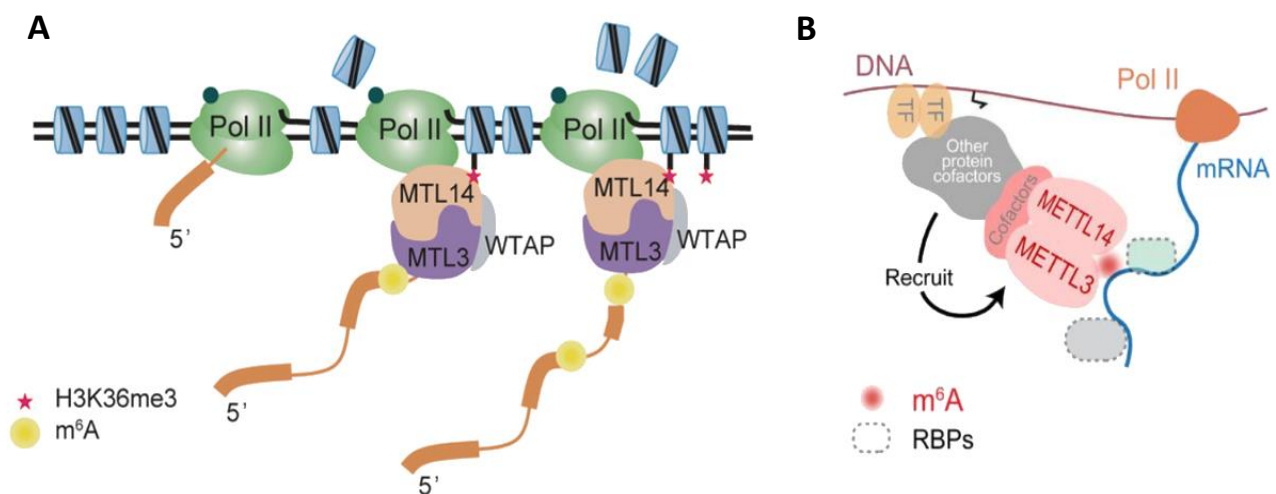
L'hétérodimère METTL3/METTL14 forment la partie catalytique du complexe. Les autres protéines interviennent dans la stabilité, la localisation spécifique de la méthylation m<sup>6</sup>A et le recrutement des autres protéines au sein du complexe (Garcias Morales & Reyes, 2021).

La protéine RBM15 (RNA-Binding Motif-protein 15), appartenant aussi au complexe méthyltransférase, est impliquée dans le recrutement du complexe sur l'ARN dans les régions riches en uraciles, proches des sites de méthylation m<sup>6</sup>A (Patil et al., 2016).

Les protéines HAKAI (E3-ubiquitin protein ligase) et ZC3H13 (Zinc finger CCCH-type containing 13) font également partie du complexe méthyltransférase (Yue et al., 2018). HAKAI est une ubiquitine protéine ligase E3 qui interagit avec WTAP. Son rôle au sein du complexe est encore inconnu chez l'Homme, mais elle est impliquée dans la distribution de la méthylation m<sup>6</sup>A en région 5'UTR et autour du codon stop chez la drosophile (Wang et al., 2021).

La protéine ZC3H13 est impliquée dans le maintien du complexe dans le compartiment nucléaire et le recrutement de RBM15 au sein du complexe (Knuckles et al., 2018).

De récentes études ont montré que le complexe méthyltransférase pourrait être recruté selon deux modèles au cours de la transcription (Huang et al., 2019; Zhang et al., 2020). METTL14 serait capable de reconnaître et de se fixer directement par sa partie N-terminale à la marque d'histone H3K36me<sub>3</sub>, une marque active de la transcription. La présence de cette modification épigénétique faciliterait le recrutement du complexe méthyltransférase au niveau de l'ARN polymérase et la méthylation m<sup>6</sup>A sur l'ARN naissant (Figure 26A) (Huang et al., 2019). Cet article démontre une co-régulation entre l'épigénétique et l'épitranscriptome, qui interviennent tous les deux dans la régulation de l'expression génique.



**Figure 26 : Modèle de recrutement du complexe méthyltransférase au cours de la transcription.**

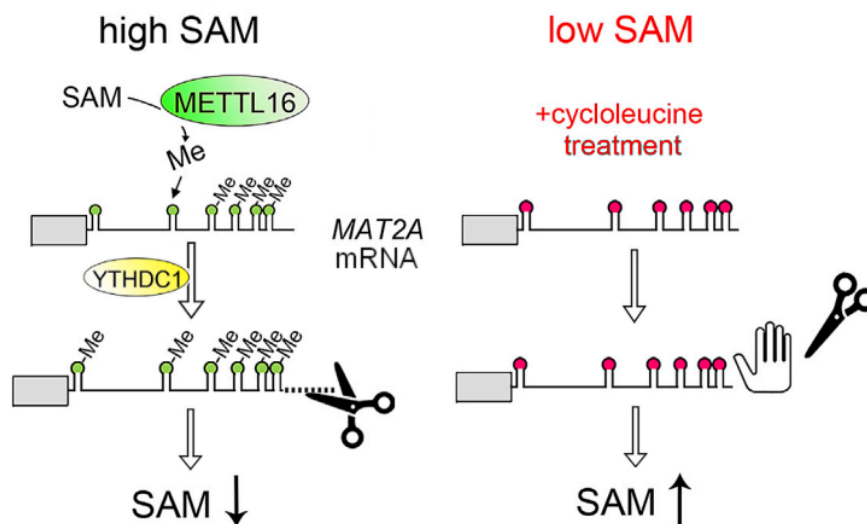
(A) Recrutement du complexe méthyltransférase grâce à la liaison directe de Mettl14 avec la marque d'histone H3K36me<sub>3</sub> (Huang et al., 2019). (B) Recrutement du complexe méthyltransférase au site de transcription par l'intermédiaire de facteurs de transcriptions (Zhang et al., 2020).

Des facteurs de transcription pourraient également être impliqués dans le recrutement du complexe méthyltransférase (Figure 26B) (Zhang et al., 2020) comme RBBP5 (Retinoblastoma-binding protein 5), une protéine appartenant à un complexe lysine méthyltransférase d'histones ou BACH1 (BTB domain and CNC homolog 1), un régulateur du stress oxydatif.

D'autres enzymes responsables de la méthylation m<sup>6</sup>A ont été identifiées ayant des cibles différentes du complexe méthyltransférase METTL3/METTL14.

La méthyltransférase METTL16 (Methyltransferase-like 16) peut également intervenir dans la méthylation des adénosines, notamment sur les petits ARN nucléaires, longs ARN non codants (Warda et al., 2017), et aussi sur les ARNm. Cette enzyme agit de manière indépendante, avec des sites de méthylation différents du complexe METTL3/METTL14.

METTL16 régule notamment l'expression de l'ARNm de *MAT2A* (Méthionine adenosyltransférase 2A) dont la protéine est impliquée dans la synthèse de la S-adenosyl méthionine (Figure 27). Plus la concentration en donneur de méthyle est élevée, plus l'ARNm de *MAT2A* est méthylé par METTL16. Cet ARN méthylé sera reconnu par YTHDC1 (YTH domain containing 1), une protéine « reader » qui accélère la dégradation du transcrite de *MAT2A* et ainsi réduit la synthèse de SAM. A l'inverse, avec de faibles concentrations en SAM, la méthylation de l'ARNm de *MAT2A* est réduite, ce qui améliore sa stabilité et sa traduction dans le temps, augmentant la synthèse de SAM (Shima et al., 2017).



**Figure 27 : Régulation de l'expression de *MAT2A* et de la production de SAM par la méthyltransférase METTL16.** Une concentration importante en SAM induit une hyperméthylation de l'ARNm de *MAT2A*, conduisant à la dégradation de l'ARNm et à la diminution de la production de SAM (à gauche). Une diminution de la concentration en SAM (ici suite à un traitement par la cycloleucine), entraîne une hypométhylation de l'ARNm de *MAT2A* et permet d'empêcher sa dégradation, la synthèse de SAM est alors augmentée (à droite) (Adapté de Shima et al., 2017).

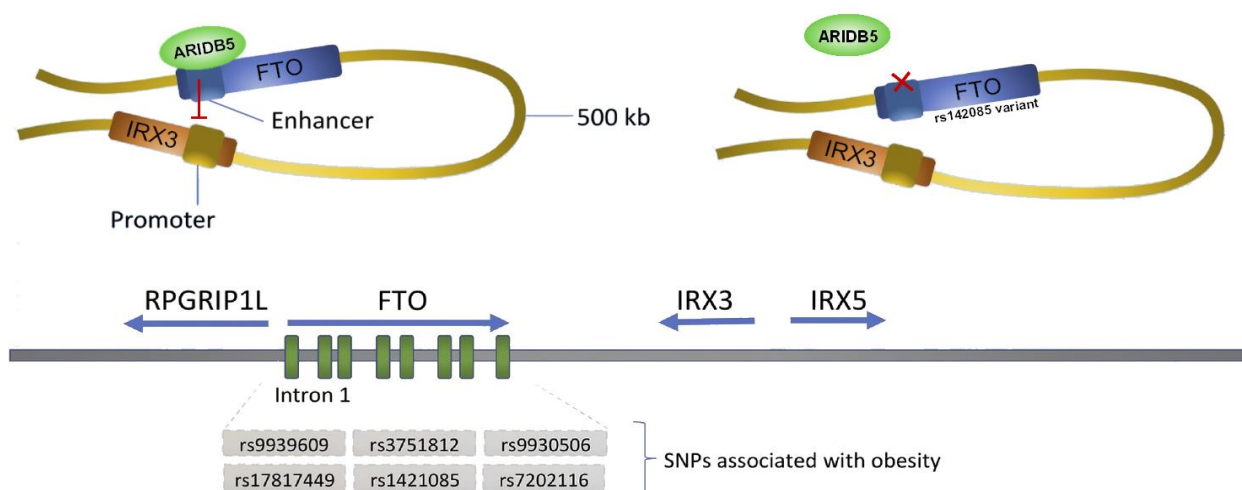
La protéine ZCCHC4 (Zinc finger CCHC-type containing 4) intervient dans la méthylation de l'ARNr 28S (Ma et al., 2019; Van Tran et al., 2019). Chez l'Homme, la méthylation du résidu A4220 affecte la structure du ribosome et facilite son assemblage. L'inactivation de *Zcchc4* entraîne une réduction de la traduction et une inhibition de la prolifération cellulaire chez la souris. Plus récemment, la protéine METTL5 a également été identifiée comme méthyltransférase responsable de la méthylation m<sup>6</sup>A de l'ARNr 18S sur le résidu A1832 chez l'Homme (Van Tran et al., 2019). Cette enzyme forme un complexe hétérodimérique avec TRMT112 (RNA methyltransferase activator subunit 11-2) qui stabilise le complexe méthyltransférase, tout comme METTL14 avec METTL3.

Par la suite, nous nous intéresserons uniquement à la méthylation des ARNm par le complexe méthyltransférase METTL3/METTL14.

#### 4. Les déméthylases m<sup>6</sup>A

À l'inverse des méthyltransférases, il existe des protéines capables de retirer la méthylation m<sup>6</sup>A sur l'ARN. À ce jour, seules 2 déméthylases ont été identifiées, FTO (Fat mass and obesity-associated protein) et ALKBH5 (Alkylation repair homolog protein 5). Elles appartiennent à la famille des dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG), et catalysent la réaction de déméthylation par l'utilisation du Fe(II) et de molécules d'eau avec l' $\alpha$ -KG comme cofacteur (Figure 29).

Le gène codant la déméthylase FTO, est fortement associé à l'indice de masse corporelle (IMC). Différents variants du gène *Fto* ont été identifiés (Claussnitzer et al., 2015; Frayling et al., 2007).



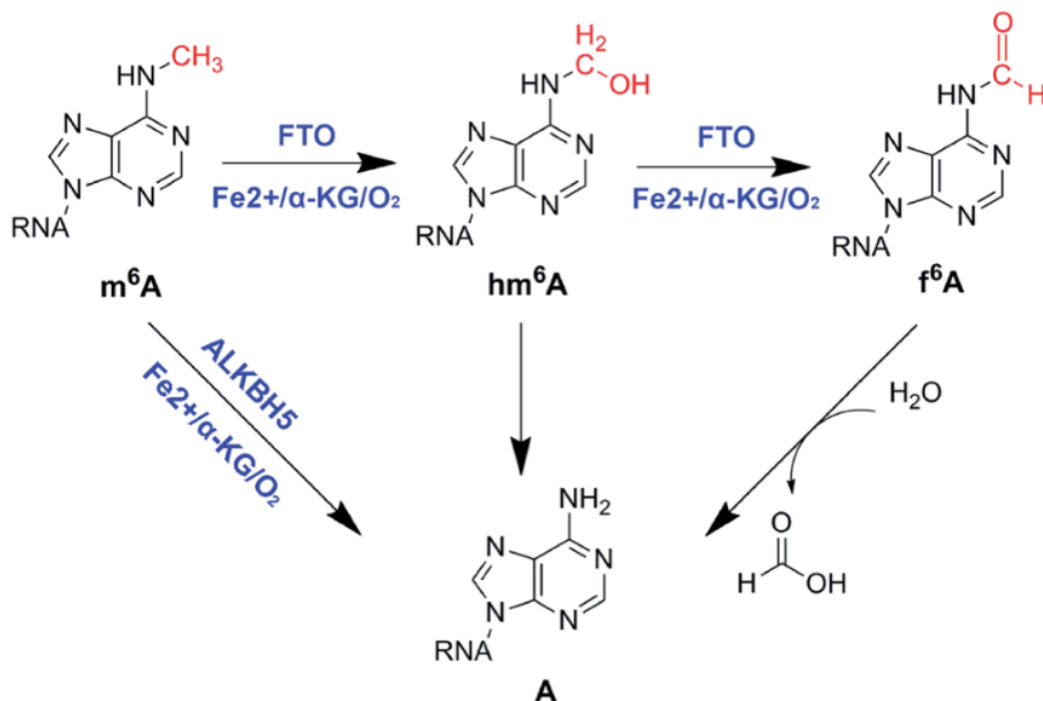
**Figure 28 : Le locus *Fto* régule l'expression de *IRX3* et *IRX5* de manière m<sup>6</sup>A-indépendante.**

Le locus *Fto* permet la fixation de ARIDB5 (AT-rich interactive domain 5B), une protéine impliquée dans la régulation de l'expression génique de *IRX3* et *IRX5*. Les variants de *Fto* peuvent modifier l'expression génique à proximité : le variant *rs142085*, par exemple (ici à droite), empêche la fixation de la protéine ARIDB5 permettant l'expression de *IRX3* (Adapté de Araújo & Velloso, 2020).

Par exemple le variant rs1421085, avec une substitution d'une thymine par une cytidine, empêche la fixation du répresseur ARID5B sur le gène (Claussnitzer et al., 2015) (Figure 28). Cela entraîne une augmentation d'expression des gènes IRX3 et IRX5 (Iroquois homeobox 3/5) à proximité. Ces derniers inhibent la thermogénèse et augmentent le stockage des lipides dans les adipocytes, augmentant les risques d'obésité.

La protéine FTO a été identifiée comme déméthylase  $m^6A$  en 2011 (Jia et al., 2011). Elle oxyde l'adénosine méthylée en deux étapes (Figure 29) : un premier intermédiaire, une N6-hydroxyméthyladénosine ( $hm^6A$ ) puis un second, une N6-formyladénosine ( $f^6A$ ), tous deux ayant une courte demi-vie d'environ 3h (Fu et al., 2013).

FTO peut également déméthyliser *in vitro* les modifications de l'ADN simple brin comme la N3-méthylthymine (3-meT) (Gerken et al., 2007) et la N3-méthyluridine (3-meU) (G. Jia et al., 2008). Elle intervient aussi dans la déméthylation de la N6,2'-O-diméthyladénosine ( $m^6Am$ ), une modification retrouvée dans la coiffe 5' des ARN (Mauer et al., 2017) et la méthylation  $m^1A$  des ARNt (J. Wei et al., 2018). Elle possède toutefois une affinité plus importante pour la méthylation  $m^6A$ . Cette protéine interviendrait notamment dans l'épissage alternatif, en libérant l'accès aux sites d'épissages via la déméthylation des ARN (Zhao et al., 2014).



**Figure 29 : Les déméthylases impliquées dans le retrait de la méthylation  $m^6A$ .**

ALKBH5 retire le groupe méthyle de l'adénosine sans intermédiaire contrairement à FTO qui oxyde la modification de l'ARN en 2 étapes : la N6-méthyladénosine est oxydée en N6-hydroxyméthyladénosine ( $hm^6A$ ) puis en N6-formyladénosine ( $f^6A$ ) (Ye et al., 2014).

De nombreux inhibiteurs pharmacologiques de la déméthylase FTO ont été identifiés. L'acide méclofénamique, par exemple, qui est normalement utilisé comme anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), se lie au site intervenant notamment dans l'interaction FTO-ARN et inhibe son activité déméthylase, induisant une augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A (Huang et al., 2015). Un autre inhibiteur, dérivé de la fluorescéine, se fixe dans la même région et permet à la fois d'inhiber et de marquer la protéine FTO (Wang et al., 2015). Enfin, le bisantrene, avec une efficacité plus élevée, se fixe à la poche catalytique de FTO empêchant également les interactions avec les ARN méthylés (Su et al., 2020).

Une seconde déméthylase, la protéine ALKBH5, a été identifiée en 2013. Contrairement à FTO, ALKBH5 retire la marque m<sup>6</sup>A sans produire d'intermédiaires (Figure 29) et est spécifique de la méthylation m<sup>6</sup>A (Zheng et al., 2013). Elle empêcherait l'export des ARNm vers le cytoplasme et induirait leur dégradation. Cette protéine peut être sumoylée, notamment lors d'un stress oxydatif, ce qui entraîne une inhibition de son activité (Yu et al., 2021). Chez la souris, l'inactivation globale du gène *Alkbh5* entraîne un défaut de spermatogénèse et augmente l'apoptose des cellules germinales (Zheng et al., 2013).

Récemment, plusieurs équipes ont identifiés différents inhibiteurs spécifiques de la déméthylase ALKBH5 (N. Li et al., 2020; Selberg et al., 2021). Ces molécules se fixent au niveau du site actif de l'enzyme pour empêcher la déméthylation des ARN. Elles sont notamment utilisées en traitements pour certains cancers comme les leucémies myéloïdes aiguës, les mélanomes ou les glioblastomes. L'inhibiteur ALK-04, par exemple, peut augmenter l'efficacité d'une immunothérapie pour le traitement des mélanomes chez la souris.

Une autre équipe a montré que la flavine mononucléotide, une molécule photosensible, pouvait également induire une déméthylation de l'ARN par stimulation à la lumière bleue (470 nm) (Xie et al., 2019). Cette réaction est spécifique de la méthylation m<sup>6</sup>A et produit le même intermédiaire que la déméthylase FTO, la N6-formyladénosine.

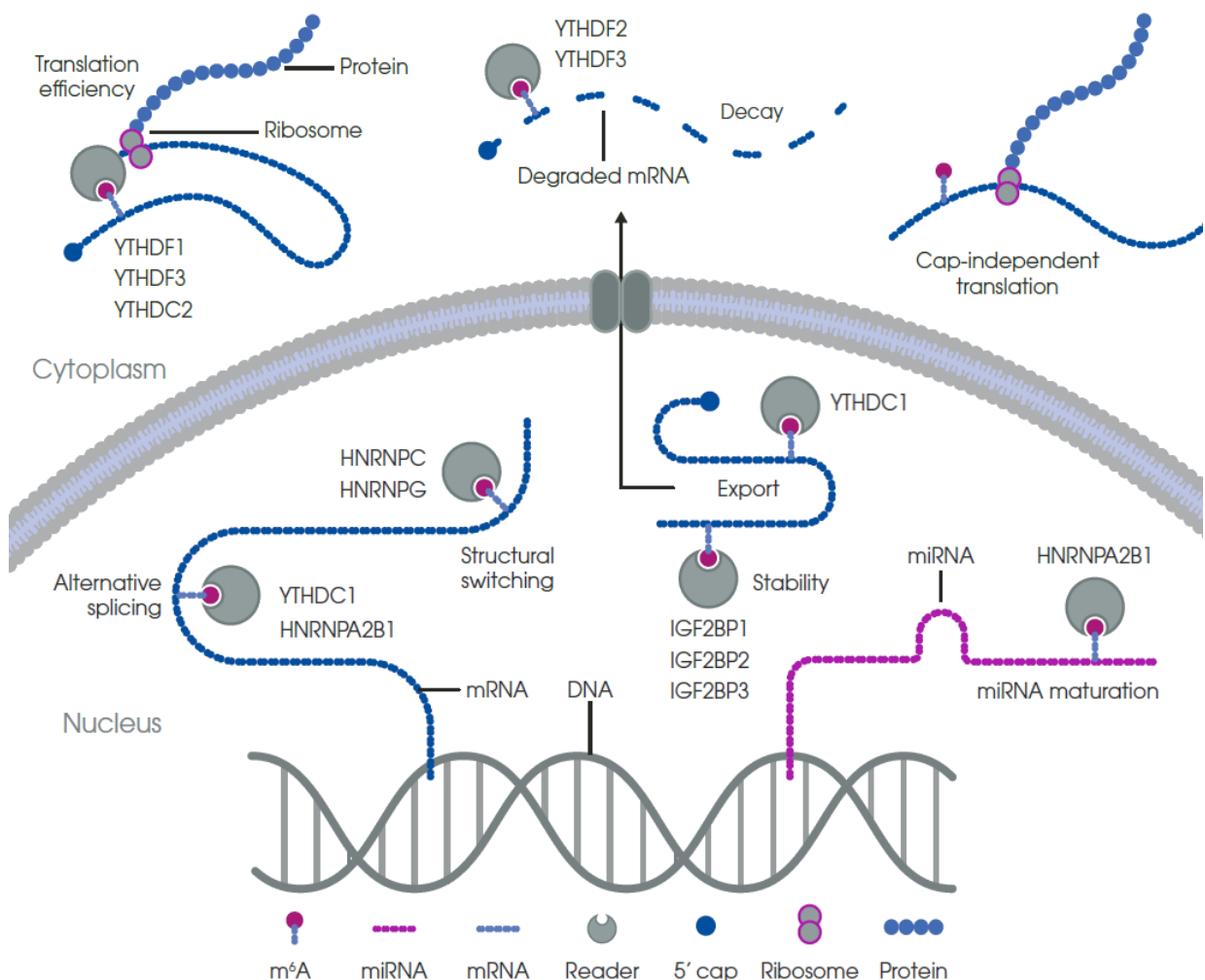
## 5. Les protéines « readers »

La marque m<sup>6</sup>A peut être reconnue par de nombreuses protéines au niveau cytoplasmique mais aussi nucléaire. Chacune peut impacter différemment le métabolisme des ARNm (Figure 30).

Parmi les protéines « readers » on retrouve les protéines à domaine YTH (YT521-B Homology), première famille identifiée. Ces protéines reconnaissent la méthylation m<sup>6</sup>A grâce au domaine YTH et accélèrent le métabolisme des ARN.

YTHDF1 (YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 1) par exemple, améliore la traduction des ARNm en interagissant notamment avec le facteur d'initiation de la traduction EIF3 (Wang et al., 2015). La protéine YTHDF2 reconnaît la méthylation m<sup>6</sup>A et conduit les ARN vers des sites de dégradation appelés corps P (Wang et al., 2014). Elle recrute également le complexe CCR4-NOT (Carbon catabolite repression 4 negative on TATA-less) qui induit une déadénylation des ARNm cibles et accélère leur dégradation (Du et al., 2016). YTHDF3 va coopérer avec YTHDF1 et YTHDF2 pour améliorer leurs effets respectifs (Shi et al., 2017).

YTHDC2 (YTH domain containing 2), de la même manière que YTHDF1, améliore la traduction des ARNm par interaction avec les protéines impliquées dans la production des protéines (Hsu et al., 2017). Enfin, la protéine YTHDC1, située dans le noyau, interagit avec les facteurs d'épissage des pré-ARNm et facilite leur maturation (Xiao et al., 2016). Après épissage, l'interaction de YTHDC1 avec SRSF3 (Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3) permet d'adresser l'ARNm aux protéines impliquées dans l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme notamment NXF1 (Nuclear RNA export factor 1) (Roundtree et al., 2017), SRSF3 étant à la fois un facteur d'épissage et une protéine adaptatrice pour l'export nucléaire.





**Figure 30 : Fonction des différentes protéines « readers » impliquées dans la reconnaissance de la méthylation m<sup>6</sup>A.**  
(Adapté du poster abcam « m<sup>6</sup>A pathway and function »).

Récemment, une autre famille de protéines reconnaissant la marque m<sup>6</sup>A dans le compartiment nucléaire a été identifiée (Huang et al., 2018). Les protéines de la famille des IGF2BP (Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2), comprenant IGF2BP1, 2 et 3, améliorent la stabilité des ARNm et interviennent également dans leur stockage.

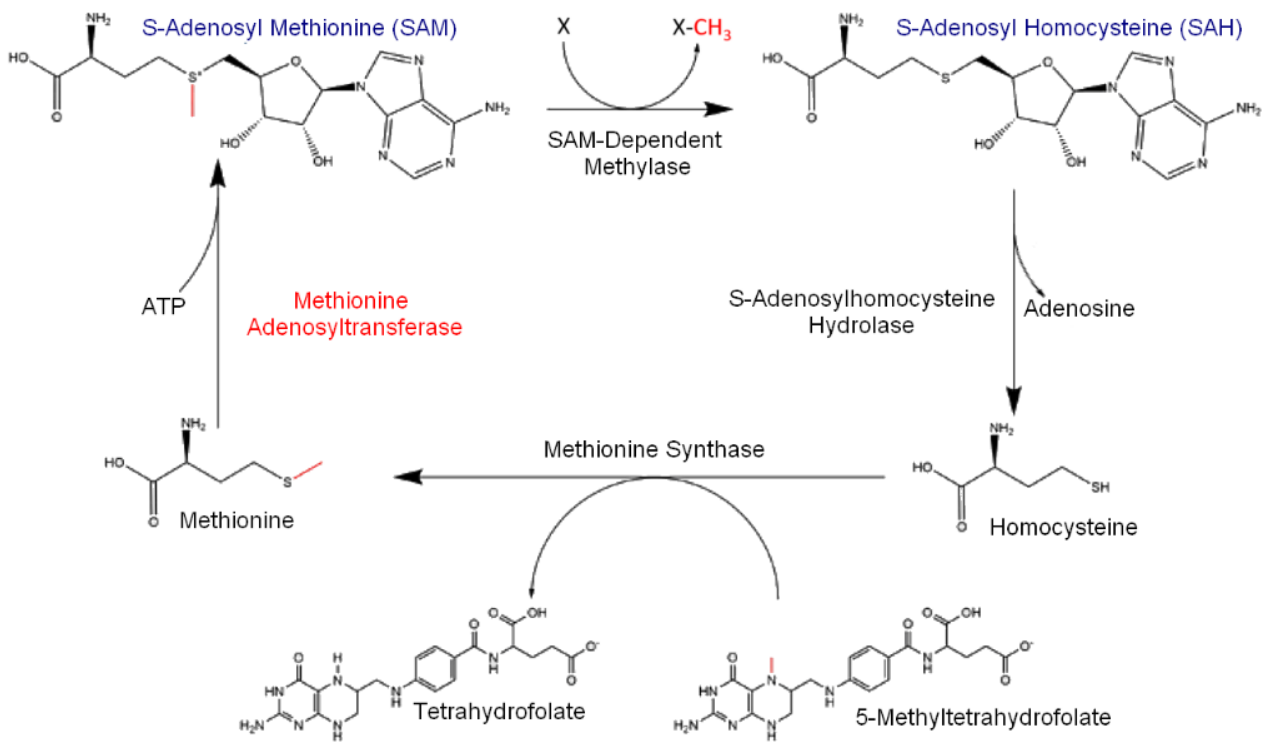
Les protéines de la famille hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins), localisées dans le noyau, sont des ribonucléoprotéines dont certaines peuvent reconnaître la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN. hnRNPA2B1, régulatrice de l'épissage des ARN, agit également sur les miRNA en reconnaissant leurs précurseurs méthylés et en induisant leur maturation par interaction avec DGCR8, une protéine du complexe de maturation des microARN primaires (Alarcón et al., 2015). Enfin, les protéines hnRNPC et hnRNPG fixent la marque m<sup>6</sup>A pour induire un changement de structure des ARN et faciliter l'accès à d'autres protéines intervenant dans l'épissage des ARN (Liu et al., 2015, 2017).

La méthyltransférase METTL3 peut également intervenir en tant que protéine « reader », indépendamment du complexe méthyltransférase et de son activité catalytique (Lin et al., 2016). METTL3 améliore la traduction des ARNm méthylés par recrutement du facteur d'initiation eIF3.

## 6. Lien entre le métabolisme et co-facteurs des méthyltransférases et déméthylases

La S-adénosyl méthionine (SAM) est un métabolite essentiel à de nombreuses réactions de méthylation dans l'organisme (Mato et al., 1997). Elle est produite par la méthionine adénosyltransférase à partir de la méthionine et de l'ATP (Figure 31). Une fois la réaction de méthylation catalysée par les méthyltransférases, ce cofacteur devient la S-adénosyl homocystéine (SAH) qui deviendra de l'homocystéine par l'intervention d'une hydrolase. Enfin, cette molécule sera convertie en méthionine par la méthionine synthase ce qui permettra de former à nouveau de la S-adénosyl méthionine.

L'enzyme qui catalyse la production de S-adénosyl méthionine est codée par 3 gènes différents (Shafqat et al., 2013) : *MAT1A* (Méthionine adénosyltransférase 1A), qui est exprimé au niveau du foie et dont l'enzyme associée est un homotétramère, *MAT2A* qui est exprimé dans tous les tissus et forme un homodimère, et *MAT2B* dont les protéines s'associent aux protéines codées par le gène *MAT2A* pour former un hétérotétramère.

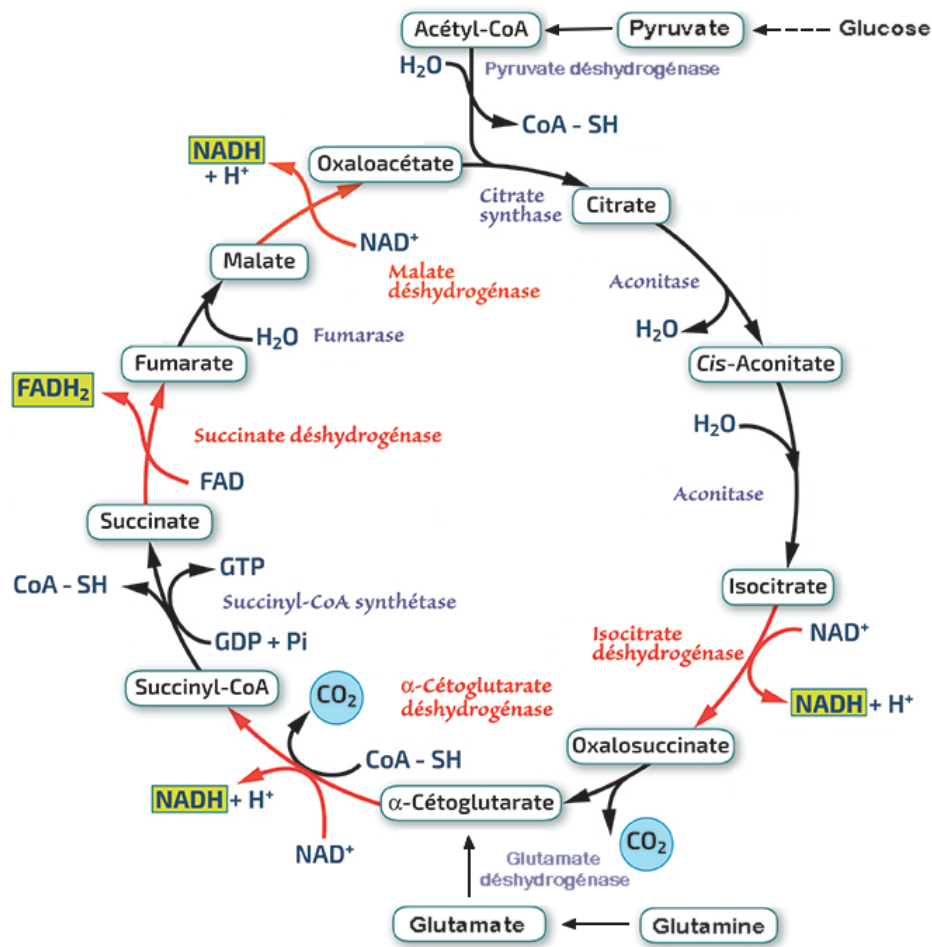


**Figure 31 : Cycle de régénération de la S-adenosyl methionine.**

La S-adenosyl méthionine est produite à partir de méthionine et d'ATP grâce à la méthionine adenosyltransférase. Après méthylation par les méthyltransférases, SAM est transformée en S-adenosyl homocystéine (SAH). Elle est ensuite convertie en homocystéine par une hydrolase puis en méthionine par une méthionine synthase afin de permettre à nouveau la production de SAM (Adapté de Wikimedia commons).

De manière intéressante, la S-adenosylméthionine, nécessaire à l'activité des méthyltransférase, peut être régulée par le métabolisme énergétique (Chiang et al., 2009). En effet, une étude menée sur une lignée cellulaire d'hépatocytes humain (HepG2) montre qu'une exposition à l'insuline, et/ou des concentrations élevées en glucose augmentent la concentration cellulaire en homocystéine et l'activité de la méthionine adenosyltransférase. Cela permet de former davantage de SAM et d'augmenter l'activité des méthyltransférases.

De la même manière, l' $\alpha$ -cétoglutarate, utilisé comme co-facteur par les déméthylases, est également régulée par le métabolisme énergétique (He et al., 2015). Ce métabolite est essentiel au métabolisme cellulaire, elle intervient notamment dans l'oxydation des acide gras et des acides aminés ainsi qu'au cours du métabolisme du glucose. En effet ce métabolite est produit au cours du cycle de Krebs, qui permet notamment de produire des molécules d'ATP après conversion du glucose lors de la glycolyse. L' $\alpha$ -cétoglutarate est produit à partir de l'isocitrate grâce à l'intervention de deux isocitrate déshydrogénase IDH1 et IDH2 (Wu et al., 2016). Celui-ci peut être également synthétisée à partir du glutamate par la glutamate déshydrogénase.



**Figure 32 : Production de l'alpha cétoglutarate au cours du cycle de Krebs.**

La S-adénosyl méthionine est produite à partir de méthionine et d'ATP grâce à la méthionine adénosyltransférase. Après méthylation par les méthyltransférases, SAM est transformée en S-adénosyl homocystéine (SAH). Elle est ensuite convertie en homocystéine par une hydrolase puis en méthionine par une méthionine synthase afin de permettre à nouveau la production de SAM (Adapté de RNBIO).

Une étude datant de 2004 a notamment mise en évidence l'importance du métabolisme dans la régulation de la production de ce métabolite (Hagopian et al., 2004). En effet, ces résultats montrent qu'une restriction calorifique chez les souris entraîne une diminution de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase associé une augmentation de l'activité de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, qui convertit l' $\alpha$ -cétoglutarate en succinyl-CoA. Ainsi la restriction calorifique conduit à une diminution de l' $\alpha$ -cétoglutarate produit.

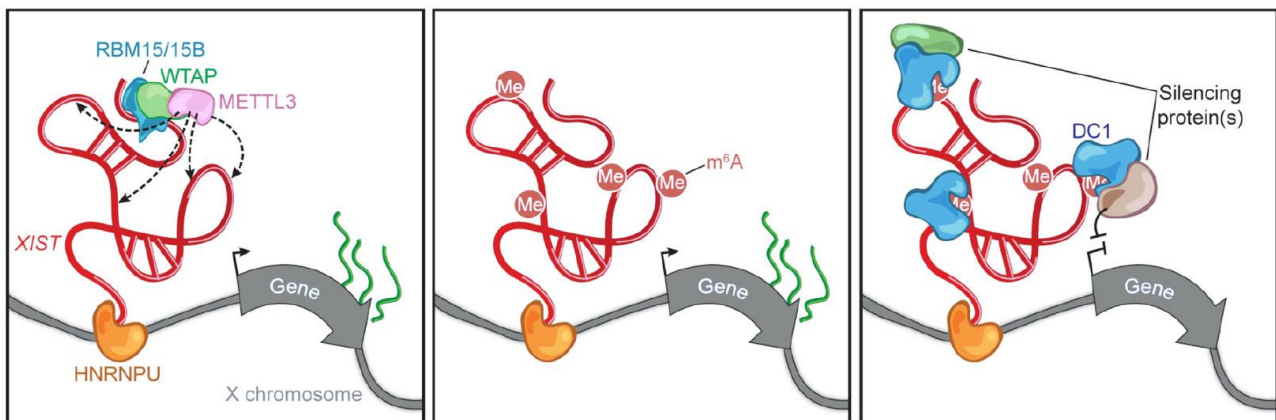
Les méthyltransférases et déméthylases impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A dépendent de cofacteurs tous deux régulés par le métabolisme énergétique. Ainsi il est possible que l'activité de ces enzymes et donc la méthylation m<sup>6</sup>A soit impactée par des changements métaboliques comme par exemple lors du développement d'un diabète de type 2.

## 7. Rôle physiologique de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN

La marque m<sup>6</sup>A, via la méthylation ou déméthylation des ARN, jouerait un rôle important dans de nombreux processus biologiques.

Au cours du développement embryonnaire, le complexe méthyltransférase intervient par exemple dans l'inactivation du chromosome X via la méthylation du long ARN non codant *XIST* (X-inactive specific transcript) (Patil et al., 2016) (Figure 33). Cet ARN est impliqué dans la répression transcriptionnelle d'un des deux chromosomes X par le recrutement de diverses protéines dont PRC2, qui ajoute des marques épigénétiques répressives sur la chromatine.

Ciblé par la protéine RBM15 du complexe méthyltransférase, *XIST* est fortement méthylé avec au moins 78 résidus m<sup>6</sup>A sur sa séquence de 19,3 kb. Les adénosines méthylées sont reconnues par YTHDC1 dans le noyau qui active la répression des gènes du chromosome X par le long ARN non codant *XIST*.



**Figure 33: Inactivation du chromosome X par l'intervention du complexe méthyltransférase.**

La méthylation du long ARN non codant *Xist* par le complexe méthyltransférase permet d'induire l'inactivation du chromosome X par recrutement de protéines inhibant l'expression génique (Patil et al., 2016).

La méthylation m<sup>6</sup>A est également impliquée dans la différenciation des cellules souches pluripotentes embryonnaires (Geula et al., 2015). En effet, METTL3 empêche le maintien de l'état souche des cellules en inhibant les gènes de pluripotence et permet l'expression des gènes impliqués dans la différenciation. La méthylation des ARN impliqués dans la pluripotence comme *Nanog* induit leur dégradation, une fois reconnus par la protéine YTHDF2. Chez les souris, l'inactivation globale de *Mettl3* est létale au stade embryonnaire E8,5, soulignant l'importance physiologique de la méthyltransférase et de la méthylation m<sup>6</sup>A dans le développement.

METTL3 intervient également dans la régulation du cycle cellulaire par méthylation de l'ARNm de la cycline D1. L'ARN méthylé est reconnu par YTHDF2 qui le conduit au site de dégradation, réduisant l'expression de la cycline D1 et inhibant la progression dans le cycle cellulaire (Liu et al., 2019).

Un autre rôle de la méthylation m<sup>6</sup>A est de réguler l'horloge circadienne (Fustin et al., 2013, 2018). L'inhibition de la méthylation provoque la perte de la marque m<sup>6</sup>A sur les ARN des gènes de l'horloge et induit un allongement de la période circadienne. On retrouve notamment une diminution de la méthylation de l'ARNm de *Ck1δ* (Casein kinase 1 isoform  $\delta$ ), entraînant une augmentation d'expression du gène qui code pour une kinase régulant les protéines de l'horloge (Fustin et al., 2018).

Les déméthylases jouent également un rôle essentiel dans divers processus physiologiques. L'invalidation de la déméthylase ALKBH5 chez la souris entraîne notamment un défaut de maturation des spermatozoïdes et une infertilité (Zheng et al., 2013). La spermatogenèse est altérée au stade spermatocyte, avec une apoptose massive des cellules germinales. L'absence d'ALKBH5 provoque une augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A en 3'UTR des transcrits longs, conduisant à un épissage aberrants de ces ARNm (Tang et al., 2018). Ces transcrits longs sont notamment impliqués dans la progression de la méiose et sont dégradés après le stade spermatocyte, suite à la déméthylation par ALKBH5. Ces événements conduisent à des anomalies structurales importantes et une quantité très réduite de spermatozoïdes. ALKBH5 est donc indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse et à la fertilité des souris mâles.

D'autres articles montrent que la méthylation m<sup>6</sup>A interviendrait également dans la régulation du métabolisme.

La déméthylase FTO est notamment impliquée dans la régulation du métabolisme du glucose dans une lignée cellulaire d'hépatocytes (Y. Yang et al., 2019). Elle déméthyle les ARNm de *Foxo1* et *G6pc* (Glucose-6-phosphatase), augmente leur expression et induit la gluconéogenèse et la glycogénolyse. Elle affecte également le métabolisme des lipides en augmentant l'expression de *Fasn* et *Dgat2* (Diacylglycerol acyltransferase 2) impliqués dans la synthèse d'acide gras et de triglycérides (Y. Yang et al., 2019).

Dans les tissus adipeux, la déméthylase FTO est impliquée dans la différenciation des pré-adipocytes et induit l'adipogenèse (Zhao et al., 2014). Elle régule notamment l'épissage alternatif en empêchant le recrutement du facteur d'épissage SRSF2 par déméthylation de l'ARNm de *Runx1t1* (Runt-related transcription factor 1), qui module la différenciation adipocytaire.

Les souris invalidées pour *Fto* montrent un retard de développement post-natal, des tissus adipeux réduits et sont protégées contre l'obésité induite par le régime alimentaire (Fischer et al., 2009).

## 8. Implication physiopathologique de la méthylation m<sup>6</sup>A

Cette méthylation peut également jouer un rôle pathologique (Zhou et al., 2020). Des variations d'expression des déméthylases ou méthyltransférases peuvent conduire au développement de nombreuses maladies, suite à un profil de méthylation des ARN anormal. Les protéines « readers » peuvent également être impliquées dans le développement de maladies.

La méthylation m<sup>6</sup>A des ARN intervient notamment au cours d'infections virales (Gokhale et al., 2016; Kennedy et al., 2016). Elle est, par exemple, indispensable à l'infection du cytomégalo virus humain (hCMV) (Winkler et al., 2019). Le virus augmente l'expression des deux méthyltransférases et de la protéine « reader » YTHDF2. La surexpression de ces différentes protéines permet d'inhiber l'expression de *IFN-β* (interferon β), codant pour une cytokine impliquée dans la réponse antivirale. En effet, l'augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A causée par les méthyltransférases diminue la stabilité de l'ARNm de *IFN-β* suite à la reconnaissance par YTHDF2. Le virus réduit ainsi l'activation du système immunitaire facilitant sa propagation.

La méthylation m<sup>6</sup>A est également modifiée au cours de la maladie d'Alzheimer. En effet, la méthylation m<sup>6</sup>A est augmentée dans le cerveau des patients atteints de la maladie associée à une augmentation d'expression de *METTL3* et une diminution de *FTO* chez les modèles murins de la maladie d'Alzheimer (Han et al., 2020). Les gènes différentiellement méthylés sont notamment liés aux membranes pré- et post-synaptiques et à la croissance des connexions synaptiques.

Dans le contexte de maladies cardiovasculaires, la méthylation m<sup>6</sup>A est augmentée dans les cardiomyocytes. On retrouve notamment une augmentation de la méthylation des ARNm de gènes codant des protéines kinases comme *MAP3K6* (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6), dont l'expression protéique est augmentée avec une surexpression de la méthyltransférase *METTL3* (Dorn et al., 2019). Cette surexpression induit également une hypertrophie des cardiomyocytes, conduisant à une hypertrophie cardiaque chez la souris.

A l'inverse l'inhibition de l'expression de *Mettl3* dans les cardiomyocytes stimulés par du sérum empêche l'hypertrophie des cardiomyocytes. L'inactivation de la méthyltransférase n'affecte pas le développement cardiaque chez les souris âgées de 3 mois. Toutefois, pour les souris plus âgées (8 mois), une réduction à long terme de la méthylation m<sup>6</sup>A par délétion de *Mettl3* conduit à une structure anormale et une dysfonction du cœur (Dorn et al., 2019). Une dérégulation des

modifications m<sup>6</sup>A pourrait donc être impliquée dans le développement de maladies cardiovasculaires liées à l'âge ou au stress métabolique.

La méthylation m<sup>6</sup>A pourrait également intervenir au cours du diabète de type 1. En effet, les malades présentent une méthylation m<sup>6</sup>A et une expression de *METTL3* réduite dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Des expérimentations sur des cellules EndoC- $\beta$ H1 et îlots pancréatiques obtenus de donneurs humains montrent qu'un traitement avec les cytokines IL-1 $\beta$  et IFN- $\alpha$  (interferon  $\alpha$ ), utilisées pour mimer le développement de la maladie, affectent la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN des gènes impliqués dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire et de l'apoptose (De Jesus et al., 2021).

La méthylation m<sup>6</sup>A jouerait un rôle clé dans de nombreux cancers comme la leucémie myéloïde aiguë (Niu et al., 2019), les mélanomes (Shen et al., 2019), les cancers des poumons (Lin et al., 2016) ou du foie (Chen et al., 2018).

L'expression de *METTL3* est augmentée au cours de nombreux cancers. Une surexpression de la méthyltransférase *METTL3* induit notamment l'expression d'oncogènes à l'origine de nombreux cancers. Dans le cancer du poumon, *METTL3* promeut, en tant que protéine « reader », la traduction d'oncogènes dont EGFR (Epidermal growth factor receptor) et TAZ (Tafazzin), qui améliorent la croissance, la survie et l'invasion des cellules cancéreuses (Lin et al., 2016). L'augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A peut également inhiber l'expression de certains gènes. La surexpression de *METTL3* entraîne par exemple dans le cancer du foie la dégradation de l'ARNm de *SOCS2* (Suppressor of cytokine signaling 2) un gène suppresseur de tumeur suite à la reconnaissance de la méthylation m<sup>6</sup>A en 3'UTR par YTHDF2 (Chen et al., 2018).

Les déméthylases sont également impliquées dans le développement de cancers. Leur surexpression induit par exemple une déméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs et réduit ainsi leur expression. C'est le cas de FTO qui inhibe l'expression de BNIP3 (BCL-2 interacting protein 3) par déméthylation de son ARNm lors d'une leucémie, favorisant la croissance tumorale et le développement de métastases (Niu et al., 2019).

Dans le cancer du pancréas, la perte d'expression d'*ALKBH5* induit une augmentation de la méthylation des ARN et facilite le développement de métastases. En effet *ALKBH5*, par la déméthylation du long ARN non codant *KCNK15-AS1* permet d'augmenter son expression. Cet ARN inhibe la migration cellulaire et l'invasion, la réduction d'*ALKBH5* et donc de *KCNK15-AS1* promeut ainsi le développement de métastases au cours du cancer du pancréas (Y. He et al., 2018).

De par leur rôle important dans de nombreux cancers, ces enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A de l'ARN, sont utilisées comme biomarqueurs dans la détection et le pronostic d'évolution des cancers. C'est le cas de la déméthylase ALKBH5 qui est un bon biomarqueur dans le pronostic du cancer du pancréas (Cho et al., 2018).

De nombreux points communs ont été mis en évidence entre le développement de tumeurs cancéreuses et les maladies métaboliques notamment le diabète de type 2 (Hua et al., 2016). Le diabète de type 2 est notamment un facteur de risque de développement de nombreux cancers (Grote et al., 2010). La méthylation m<sup>6</sup>A étant impliquée dans le développement de cancers, il est donc très probable qu'elle soit également impliquée dans le développement de maladies métaboliques comme le diabète de type 2.

## 9. Méthylation m<sup>6</sup>A et diabète de type 2

Il existe, à l'heure actuelle, peu de publications concernant la méthylation m<sup>6</sup>A et son rôle au sein de l'îlot pancréatique et lors du diabète de type 2. Néanmoins, des études montrent que la méthylation m<sup>6</sup>A est diminuée dans le sang de patients atteints du diabète de type 2 (F. Shen et al., 2015; Y. Yang et al., 2019). Cette diminution de la méthylation est associée à une augmentation de l'expression de FTO, qui corrèle de manière positive avec la concentration en glucose dans le sang.

Dans les îlots humains issus de patients diabétiques, une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A est également observée, liée à une diminution de l'expression de METTL3 et METTL14 (De Jesus et al., 2019; Wang et al., 2020).

Des analyses bioinformatiques de différentes données de la littérature montrent également que les ARN cibles différenciellement méthylés et exprimés au cours du diabète de type 2 sont impliqués dans les voies de signalisation de l'insuline, dont le gène *INS*, *MAFA* et *HK2* (Hexokinase 2) (Lei et al., 2021).

Au niveau physiologique, la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN serait impliquée dans la maturation des cellules  $\beta$  pancréatiques lors du développement (Wang et al., 2020). En effet, l'inactivation des méthyltransférases METTL3 et METTL14 chez la souris entraîne une perte d'expression des gènes impliqués dans l'identité de la cellule  $\beta$ , comme *Pdx1*, *MafA* ou *Nkx6.1*, qui conduit à une dédifférenciation des cellules  $\beta$  pancréatique mise en évidence par l'augmentation du marqueur de dédifférenciation ALDH1A3 (Aldehyde dehydrogenase 1 family). Cela provoque une perte en masse des cellules  $\beta$ , associée à une réduction de leur prolifération et une augmentation de l'apoptose. Toutes ces altérations conduisent à une hyperglycémie et une perte de sécrétion d'insuline



quelques semaines après la naissance des souris invalidées. D'autres études, se focalisant uniquement sur METTL14, ont montré des résultats similaires (De Jesus et al., 2019; J. Liu et al., 2019; Men et al., 2019).

Dans le foie, on observe au contraire une hyperméthylation des ARN, avec une réduction de l'expression de *FTO* associée à une expression de *METTL3* augmentée chez les patients diabétiques (Xie et al., 2019). L'expression de *METTL3* dans le foie est positivement corrélée à la résistance à l'insuline et négativement corrélée à la fonction sécrétrice des cellules  $\beta$ .

Chez les souris nourries avec un régime riche en graisse (régime HFD : high fat diet), une augmentation d'expression de *Mettl3* est observée dans le foie par rapport aux souris nourries avec un régime standard (régime CD : chow diet). L'inactivation de *Mettl3* dans les hépatocytes de souris nourries avec un HFD permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose et réduit la synthèse d'acides gras empêchant les complications liées à ce régime alimentaire (Xie et al., 2019). La diminution de la synthèse d'acides gras est notamment induite par une hypométhylation de l'ARNm de *Fasn* qui réduit son niveau d'expression inhibant le métabolisme des acides gras. La réexpression de *Mettl3* chez ses souris par virus adéno-associé (AAV) abolit les effets positifs de l'inactivation sur la sensibilité à l'insuline. La méthyltransférase METTL3 est donc impliquée dans la régulation du métabolisme des acides gras dans le foie et pourrait être impliquée dans l'insulinorésistance hépatique au cours du diabète de type 2.

# Données préliminaires

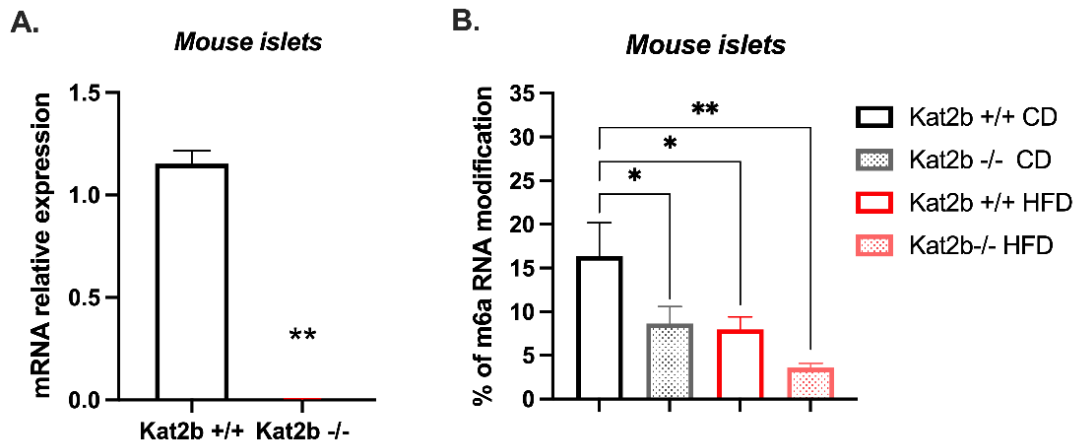
Ce projet de thèse est issu de la poursuite d'une étude publiée dans Cell Reports où le laboratoire a montré que KAT2B (Lysine acetyltransferase 2B), une histone acétyltransférase, est impliquée dans l'adaptation au stress métabolique, la réponse UPR et la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (Rabhi et al., 2016). Son expression est notamment diminuée au cours du diabète de type 2. Cette enzyme épigénétique ajoute des groupements acétyles sur les résidus de lysine des histones et permet l'ouverture de la chromatine et l'activation de l'expression des gènes (Ogryzko et al., 1996).

L'étude de l'interactome de KAT2B, par analyse protéomique, a pu montrer l'interaction de l'enzyme avec une méthyltransférase de l'ARN (données non publiées). Les modifications épigénétiques pouvant moduler l'épitranscriptome en recrutant le complexe méthyltransférase à proximité de l'ARN naissant (Huang et al., 2019), il est possible que l'acétyltransférase KAT2B, via l'acétylation des histones, puisse également intervenir dans la régulation de la méthylation  $m^6A$ , la modification épitranscriptomique la plus abondante sur les ARNm.

Le laboratoire a étudié le rôle de l'acétyltransférase KAT2B dans la régulation de la méthylation  $m^6A$  grâce à l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés et d'îlots pancréatiques isolés de donneurs sains et diabétiques. Ces données ont été présentées au cours de la thèse du Dr. Nabil Rabhi mais n'ont pas encore été publiées.

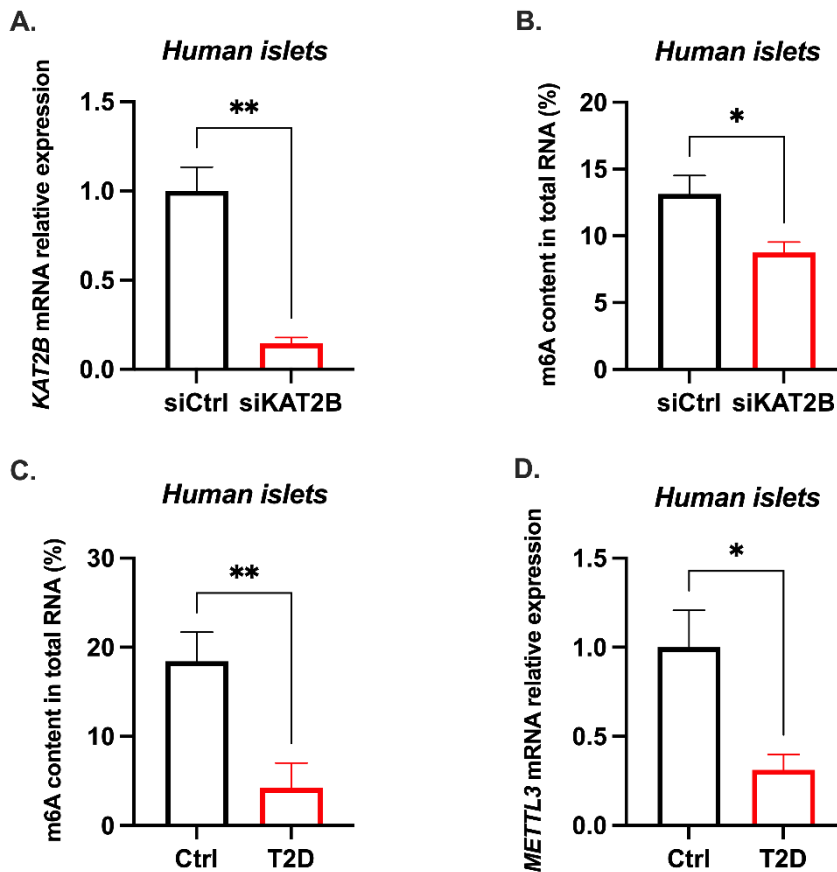
Ces résultats démontrent que l'inactivation de *Kat2b* dans les cellules  $\beta$  d'îlots pancréatiques murins (Figure 34A) induit une diminution significative de la méthylation  $m^6A$  (Figure 34B, en gris) comparée aux souris sauvages (Figure 34B, en noir). Cet effet est exacerbé après un stress métabolique induit par un régime riche en graisse (HFD : High fat diet) où l'on observe une réduction accrue de la méthylation  $m^6A$  dans les îlots pancréatiques (Figure 34B, en rose). Il est intéressant de noter que le régime HFD seul réduit également la méthylation  $m^6A$  chez la souris de manière similaire à l'inactivation de *Kat2b* (Figure 34B, en rouge) (Rabhi et al., 2016).

Chez l'Homme, l'inhibition de l'expression de KAT2B dans les îlots pancréatiques par l'utilisation de siRNA (Figure 35A) entraîne également une réduction de la méthylation  $m^6A$  comparée aux îlots traités avec un siRNA contrôle (Figure 35B). Le régime diabétogène affectant la méthylation  $m^6A$  dans les îlots de souris, nous avons également étudié la méthylation  $m^6A$  dans les îlots pancréatiques humains issus de patients diabétiques.



**Figure 34 : Impact de l'inactivation de *Kat2b* sur la méthylation  $m^6A$  des ARN dans les îlots pancréatiques murins.**

(A) Expression de l'ARNm de *Kat2b* dans les îlots pancréatiques de souris sauvages (n=4) ou invalidées pour *Kat2b* (n=6). (B) Quantification de la méthylation  $m^6A$  par dosage ELISA dans les ARN d'îlots de souris invalidées ou non pour *KAT2B*, nourries avec un régime standard (Chow diet) ou riche en graisse (High fat diet) pendant 12 semaines (n≥5). Les données sont exprimées selon la moyenne ± SEM. \*, p>0.05 ; \*\*, p>0.01.



**Figure 35 : Effets de l'inhibition de *KAT2B* par utilisation de siRNA sur la méthylation  $m^6A$  de l'ARN dans les îlots pancréatiques humains.**

(A) Expression de l'ARNm de *KAT2B* dans les îlots humains traités avec un siRNA contrôle ou un siKAT2B (n=6). (B) Quantification de la méthylation  $m^6A$  par ELISA après traitement avec les différents siRNA (n=6). (C) Dosage par ELISA de la méthylation  $m^6A$  des ARN totaux des îlots pancréatiques humains diabétiques (n=5) ou non diabétiques (n=10). (D) Expression de l'ARNm de la méthyltransférase *METTL3* dans les îlots pancréatiques de patients diabétiques (n=5) ou non diabétiques (n=8). Les données sont exprimées selon la moyenne ± SEM. \*, p>0.05 ; \*\*, p>0.01.

Dans les îlots pancréatiques issus de donneurs diabétiques, nous observons que la méthylation m<sup>6</sup>A est également réduite (Figure 35C) et associée à une réduction d'expression de la méthyltransférase METTL3 (Figure 35D).

Ces résultats montrent que l'épigénétique, de par l'activité acétyltransférase de KAT2B, semble réguler la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les îlots pancréatiques humains et murins. De même, un phénotype diabétique chez des patients atteints du diabète de type 2 ou chez des souris nourries avec un régime HFD impacte également la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les îlots pancréatiques.

# Objectifs

L'environnement joue un rôle majeur dans le dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques. Nous avons donc émis l'hypothèse que la méthylation  $m^6A$  de l'ARN pourrait intervenir en tant qu'intermédiaire dans les différents stress induit par la glucolipotoxicité observée au cours du diabète de type 2 et contribuer ainsi au développement de cette maladie.

Les résultats obtenus dans notre laboratoire et dans d'autres équipes semblent aller dans ce sens, avec une méthylation  $m^6A$  des ARN réduite dans les îlots pancréatiques murins ou humains diabétiques, associée à des variations d'expression des gènes impliqués dans la fonction ou l'identité de la cellules  $\beta$  (Lei et al., 2021).

Le premier objectif de ma thèse était d'identifier les variations environnementales responsables de la perte de la méthylation  $m^6A$  observée au cours du diabète de type 2 et de comprendre les mécanismes de régulation de la méthylation  $m^6A$  dans un environnement gluco- et lipotoxique.

Le second objectif était de déterminer le rôle des différentes enzymes de la méthylation  $m^6A$  au sein de la cellule  $\beta$  et l'îlot pancréatique.

Enfin, le dernier objectif était d'identifier les ARNm cibles de la méthylation  $m^6A$  au cours de ce stress gluco- et lipotoxique et lors du diabète de type 2.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons mis en place différents modèles *in vitro* et *ex vivo* de traitements à court ou long terme avec des variations de concentrations en glucose et palmitate. L'utilisation de siRNA et d'inhibiteurs nous permet également d'étudier le rôle des enzymes impliquées dans la méthylation  $m^6A$ . Le développement d'un modèle de souris d'invalidation spécifique de *Fto* dans la cellule  $\beta$  pancréatique a également été mis en place. Enfin, un protocole d'immunoprécipitation de la marque  $m^6A$  pour le séquençage des ARNm méthylés a été développé au cours de cette thèse afin d'identifier les cibles de la méthylation  $m^6A$  dans des conditions physiologiques ou physiopathologiques.

Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre les interactions entre l'environnement et l'expression génique au travers de la méthylation  $m^6A$  des ARNm. Ils permettent également une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la glucolipotoxicité qui affecte les cellules  $\beta$  pancréatiques au cours de diabète de type 2.

# Matériels et Méthodes

## 1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire Min-6 est issue d'un insulinome de souris exprimant l'antigène large T du virus SV40 dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Cet inhibiteur de gènes suppresseurs de tumeurs (pRb, p53, etc) permet d'immortaliser les cellules  $\beta$ . Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM-Glutamax à 4,5 g/L de glucose (31966-021 Gibco), supplémenté avec 15 % de sérum de veaux foetal (SVF), 100 pg/ml de pénicilline-streptomycine et 55 pM de  $\beta$ -mercaptoéthanol.

La lignée cellulaire  $\alpha$ -TC1 est issue d'un adénome pancréatique de souris et correspond aux cellules  $\alpha$  de l'îlot. Ces cellules expriment également l'antigène large T du virus SV40 qui permet d'immortaliser la lignée. Le milieu de culture se compose de DMEM à 1 g/L de glucose (11885-084, Gibco), supplémenté avec 10% de SVF, 100 nM acides aminés non essentiels, 15 mM d'HEPES et 0,02% d'albumine de sérum bovin (BSA).

Ces lignées sont incubées en étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Entre chaque passage, les cellules sont détachées de leur support avec 2 mL de trypsine (25300-054, Gibco) à 37°C pendant environ 3 minutes. La trypsine est ensuite inactivée avec 8 mL de milieu de culture.

### 1.1 Traitements

Les cellules  $\alpha$ -TC ont été incubées avec 5,6 mM ou 15 mM de glucose et 0,5 mM de palmitate pendant 72 heures. Les cellules sont ensuite lysées pour extraction d'ARN.

Les cellules Min6 sont traitées pendant 3h avec 2,8 ou 20 mM de glucose dans un milieu Min6 complet sans glucose (DMEM 11966-025, Gibco) supplémenté en sodium pyruvate 1 mM (11360-070, Gibco). Pour le traitement palmitate, les cellules Min6 ont été incubées avec 5,6 mM ou 20 mM de glucose et 1 mM de palmitate pendant 72 heures (avec un changement quotidien de milieu).

Pour le traitement au bisantrène, les cellules Min6 ont été incubées avec 100 nM de bisantrène (B4563, Sigma) dans du milieu Min6 complet. Une heure avant la fin du traitement, les cellules Min6 sont privées de glucose dans du tampon bicarbonate Krebs-Ringer (KRB) additionné de 0,5% de BSA et 100 nM de bisantrène pour effectuer ensuite des tests de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

## **1.2 Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) et dosage de l'insuline par ELISA**

Les cellules Min6 sont privées de glucose pendant 1 heure avec du tampon KRB supplémenté avec 0,5% d'albumine de sérum bovin (KRB-BSA). Les cellules sont ensuite stimulées avec du glucose 2,8 ou 20 mM pendant 1 heure dans le même tampon. La sécrétion d'insuline et le contenu cellulaire en insuline, obtenus par lyse des cellules avec 180 mM d'HCl et 75% d'éthanol, puis neutralisés par 1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sont dosés par ELISA (mouse insulin kit 10-1247-01, Merck) après dilution au 1/20<sup>e</sup> pour l'insuline sécrétée et 1/100<sup>e</sup> pour l'insuline intracellulaire. L'insuline est quantifiée à l'aide d'une gamme étalon selon les instructions du fabricant. La sécrétion d'insuline est normalisée par le contenu cellulaire en insuline

## **1.3 Transfection siRNA**

Avant transfection, les antibiotiques sont éliminés du milieu par 2 rinçages au DMEM (31966-021, Gibco). Les cellules ont été transfectées du Dharmafect 1 (T-2001, Horizon Discovery) et 25 nM de siRNA (Smartpool ON-TARGETplus siRNA, Horizon Discovery) dans un milieu Min6 complet sans antibiotiques selon les instructions du fabricant (voir tableau S2 en annexe pour informations supplémentaires sur les siRNA utilisés). Les cellules ont été lysées 48 heures après le début du traitement pour extraction d'ARN, de protéines ou dosage de la sécrétion d'insuline après stimulation au glucose.

## **1.4 Extraction d'ARN et RT-qPCR**

L'ARN total est extrait des cellules en utilisant le kit Nucleospin RNA (740955, Macherey Nagel) selon les instructions du fabricant. L'ARN est rétrotranscrit avec les réactifs du kit SuperScript III (18080044, Invitrogen), des hexamères aléatoires (10609275, Invitrogen) et des dNTP (10520651, Thermo scientific). L'expression de l'ARNm est quantifiée par qPCR en temps réel à l'aide d'oligonucléotides spécifiques des gènes d'intérêts (voir tableau S3 en annexe pour informations sur les oligonucléotides utilisés) et le FastStart SYBR Green Master Mix (4913914001, Roche). Les résultats des cellules Min6 sont normalisés par l'expression de l'ARNm de la cyclophiline murine.

## **1.5 Immunoprécipitation des ARN méthylés**

Les ARNm sont purifiés avec le Dynabeads mRNA direct Kit (61012, Invitrogen) à partir de 50 µg d'ARN total. 1,5 µg d'ARN dilués dans du tampon TE (Tris-Edta) sont ensuite fragmentés par ultrason au Bioruptor (Diagenode) avec 30 cycles de 30s on/off (high position). Les ARN fragmentés sont ensuite immunoprécipités avec l'Epimark N6-methyladenosine enrichment kit.

Les ARN méthylés sont ensuite rétrotranscrits et amplifiés par PCR pour identifier les régions méthylées (voir tableau S5 en annexe pour informations sur les oligonucléotides utilisés).

### **1.6 Immunofluorescence et quantification**

Après traitements, les cellules Min6 sont fixées au paraformaldéhyde 4% dilué dans du PBS (Phosphate-buffered saline) pendant 15 minutes à température ambiante et lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS-Triton 1 % dans les mêmes conditions. Les cellules sont bloquées dans du PBS-BSA 1 % pendant 30 minutes à température ambiante et incubées avec des anticorps primaires pendant une nuit à 4°C (voir tableau S4 en annexe pour la liste des anticorps utilisés). Des anticorps secondaires conjugués à des fluorophores (anticorps secondaires AlexaFluor, Thermofisher) ont été utilisés pour révéler par immunofluorescence les protéines cibles. Le DAPI est utilisé pour colorer les noyaux. Les images ont été traitées et quantifiées à l'aide de Macro sur le logiciel ImageJ.

## **2. Expérimentations animales**

Les souris sont maintenues conformément aux directives de l'Union européenne pour l'utilisation d'animaux de laboratoire. Les expérimentations *in vivo* ont été réalisées dans le respect du référentiel éthique français pour les études sur animaux de laboratoire (accord animalerie n°59-350294, Autorisation d'expérimentation animale, approbation du projet par notre comité d'éthique local n°APAFIS#2915-201511300923025v4).

Toutes les souris sont hébergées en animalerie EOPS (exempt d'organismes pathogènes spécifiques) avec un cycle jour/nuit de 12 heures à une température constante de 23°C. L'ensemble des expérimentations sont réalisées sur des souris mâles du fond génétique C57BL/6J âgées d'au moins 5 semaines. Les souris sont nourries *ad libitum* avec un régime standard (régime RM1 Special Diet Services).

### **2.1 Régime alimentaire spécifique**

Pour induire un phénotype diabétique, les souris sont nourries *ad libitum* avec un régime riche en graisse à 60% (D12492i, Research Diet) pendant 12 semaines. Afin d'évaluer l'efficacité du régime, les souris sont pesées chaque semaine et des tests métaboliques (IPGTT) sont mis en place avec au moins 1 semaine d'intervalle entre chaque expérimentation.



## 2.2 Test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale (IPGTT)

Les tests de tolérance au glucose sont réalisés, après mise à jeun de 16h, par injection intrapéritonéale de glucose à raison de 2g/kg. Le glucose (G8769, Sigma) est préalablement dilué à 200 mg/mL dans du NaCl 0,09%. La glycémie est mesurée à l'aide du glucomètre Accucheck Performa à T0, T15, T30, T45, T60, T90 et T120 (en minutes). Du sang est également prélevé à la base de la queue à T0, T15 et T30 afin de récupérer le sérum après centrifugation à 4500 rpm pendant 20 min à 4°C. Le sérum est conservé à -80°C jusqu'à utilisation pour doser la sécrétion d'insuline par ELISA (Mouse Insulin Kit Merckodia). Le dosage de l'insuline par ELISA est réalisé comme décrit dans la partie 3.2.

## 2.3 Lignées génétiquement modifiées

Les souris génétiquement modifiées proviennent des laboratoires Jackson. Les souris invalidées pour la méthylase *Fto* proviennent de croisements de souris *Fto*-Flox et des souris MipCreERT. Les souris MipCreERT (B6.Cg-Tg(Ins1-cre/ERT)1Lphi/J, JAX 024709) ont été décrites par Tamarina et al., en 2014. Dans cette lignée, la Cre recombinase est sous le contrôle du promoteur de l'insuline fusionné au domaine de fixation du récepteur aux œstrogènes. La Cre recombinase est exprimée dans le cytoplasme des cellules  $\beta$  pancréatique et l'injection de tamoxifène permet sa translocation dans le noyau pour induire la recombinaison des sites loxP.

Les souris *Fto*-Flox (B6.129-*Fto*<sup>tm1.1Pzg</sup>/YxtJ, JAX 024709) ont été décrites par Gao et al., en 2010. Elles sont issues d'un fond génétique C57BL/6J dont l'exon 3 du gène *Fto* a été floxé par 2 sites loxP sensibles à la Cre recombinase. La délétion de cet exon induit un décalage du cadre de lecture qui provoque une altération de la traduction de l'ARNm en protéine.

Pour une invalidation inductible du gène *Fto*, les souris MipCreERT *Fto*-Flox sont injectées tous les jours pendant 5 jours avec une solution contenant du tamoxifène à raison de 50 mg/kg (T5648, Sigma). Le tamoxifène est préalablement solubilisé dans de l'éthanol pure à 65°C pendant 1h pour une solution à 80 mg/mL puis dilué dans de l'huile de maïs (C8267, Sigma) pour une solution à 40 mg/mL. Juste avant injection la solution est diluée dans du PBS 1X pour une solution finale à 10 mg/mL.

## 2.4 Géotypage des lignées de souris

L'ADN des souris est extrait d'échantillons de queues digérés sous agitation à 55°C sur la nuit avec 100  $\mu$ L de tampon de lyse Direct PCR (102-T, Viagen) supplémentés avec 1  $\mu$ L de protéinase K (A4392, PanReac). La réaction est stoppée par une incubation à 85°C pendant 40 min.

La PCR est réalisée avec 1 µL d'ADN, 10 µL de Hot Start Phire Green 2X (F126, Thermo Scientific) et les différents primers (voir tableaux), la réaction est complétée avec de l'eau pure jusqu'à 20 µL.

Génotypage	Primer (5' – 3')	Concentration	Volume par réaction
Fto Flox	AGGAGAGCAGCAGTTGTTGG GGAAGCCAAGAACAAGTCCA	10 µM	1 µL
Cre	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC GTGAAACAGCATTGCTGCTCACTT	20 µM	0,25 µL 0,25 µL 1 µL 1 µL

## 2.5 Isolement d'îlots pancréatiques murins

Les souris sont mises à jeun sur la nuit pour l'isolement des îlots pancréatiques. Après mise à mort par dislocation cervicale et incision ventrale de l'animal, le canal cholédoque est clampé juste en amont de l'ampoule de Vater. Le pancréas est ensuite injecté avec une solution de 1,5 mg/mL de collagénase V (C9263, Sigma), disséqué et digéré à 37°C pendant 10 minutes. Après filtration du lysat au tamis, les îlots sont purifiés avec un gradient de densité de polysucrose (issu de l'histopaque 1119, Sigma Aldrich) de 1119, 1100, 1080 et 1060 g/mL et centrifugation de 2000 rpm pendant 45min, avec une accélération et décélération réduite au minimum. Enfin, les îlots sont prélevés entre les gradients 1100 et 1080 puis triés à la main sous microscope binoculaire pour une meilleure pureté. Avant utilisation, les îlots sont maintenus au moins 24h en étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu îlots composés de RPMI 1640 + Glutamax (61870010, Gibco) supplémenté avec 10% de Sérum de Veaux Fœtal (SVF) et 100 pg/ml de pénicilline-streptomycine. Les îlots pancréatiques de souris sont ensuite soumis à une GSIS de manière similaire aux cellules Min6 (voir partie 1.2) ou lysés pour extraction d'ARN avec le Rneasy Micro Kit (74034, Qiagen). La RT-qPCR est réalisée comme décrite dans la partie 1.4. Les résultats des îlots pancréatiques sont normalisés par l'expression de l'ARNm de la cyclophiline murine.

## 3. Études des îlots pancréatiques humains

Les îlots pancréatiques humains ont été fournis par le Pr. François Pattou (UMR1190) d'après Kerr-Conte et al., 2010. Les îlots ont été récoltés sur des donneurs humains adultes en mort cérébrale, non diabétiques et diabétiques de type 2 (Voir Tableau S1 en annexe pour informations). Pour le traitement au palmitate et au glucose, les îlots ont été incubés avec 5,6 ou 20 mM de glucose et 0,5 mM de palmitate pendant 72 heures, avec changement quotidien de milieu.

Les îlots humains sont ensuite soumis à une GSIS de manière similaire aux cellules Min6 (voir partie 1.2) ou lysés pour l'extraction d'ARN avec le tampon de lyse du kit Nucleospin RNA (740955, Macherey Nagel). La RT-qPCR est réalisée comme décrite dans la partie 1.4. Les résultats des îlots pancréatiques sont normalisés par l'expression de l'ARNm de la cyclophiline humaine.

#### **4. Quantification m<sup>6</sup>A par Dot Blot**

500 ng d'ARN sont utilisés pour la quantification de la méthylation m<sup>6</sup>A par Dot Blot. Les ARN sont transférés sur une membrane en nylon à l'aide d'un Dot Blotter avec aspiration pendant 15 minutes puis sont fixés par UV à 130 J/cm<sup>2</sup> (254 nm). La membrane est incubée avec 0,04 % de bleu de méthylène et 0,5 M d'acétate de sodium pour marquer l'ARN total. Avant l'incubation de l'anticorps, la membrane est lavée avec du TBS-Tween 0,1 % (TRIS-buffered saline) et bloquée une heure à température ambiante avec 5 % de lait dans du TBS-Tween 0,1 %. Un anticorps primaire anti-m<sup>6</sup>A est utilisé pour marquer la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN avec une incubation d'une nuit à 4°C (voir tableau S4 en annexe pour la liste des anticorps utilisés). Après 3 lavages de 10 minutes dans 0,1% de TBS-Tween, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire conjugué à de la peroxydase de raifort. Les ARN méthylés m<sup>6</sup>A sont ensuite visualisés avec un substrat ECL (32106, Pierce) et l'appareil Gel Doc XR+ de Biorad. Le signal obtenu est quantifié à l'aide du logiciel ImageJ. Le marquage de l'ARN m<sup>6</sup>A-méthylé est normalisé par l'ARN total obtenu par marquage au bleu de méthylène.

#### **5. Quantification m<sup>6</sup>A par ELISA**

La quantification de la méthylation m<sup>6</sup>A est réalisée avec le kit EpiQuik m<sup>6</sup>A RNA methylation (Colorimétrique P-9005-96, Epigentek) selon les instructions du fabricant avec 200 ng d'ARN total et 2 µL d'anticorps primaires anti-m<sup>6</sup>A du kit. La méthylation m<sup>6</sup>A est quantifiée à l'aide d'une gamme étalon.

#### **6. Analyses statistiques**

Toutes les données sont exprimées en moyenne ± SEM. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0. Les différences ont été considérées statistiquement significatives à une valeur P < 0,05 (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005, \*\*\*\* p < 0,001).

# Résultats

## I. Importance du glucose dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A

### A. Quantification de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN

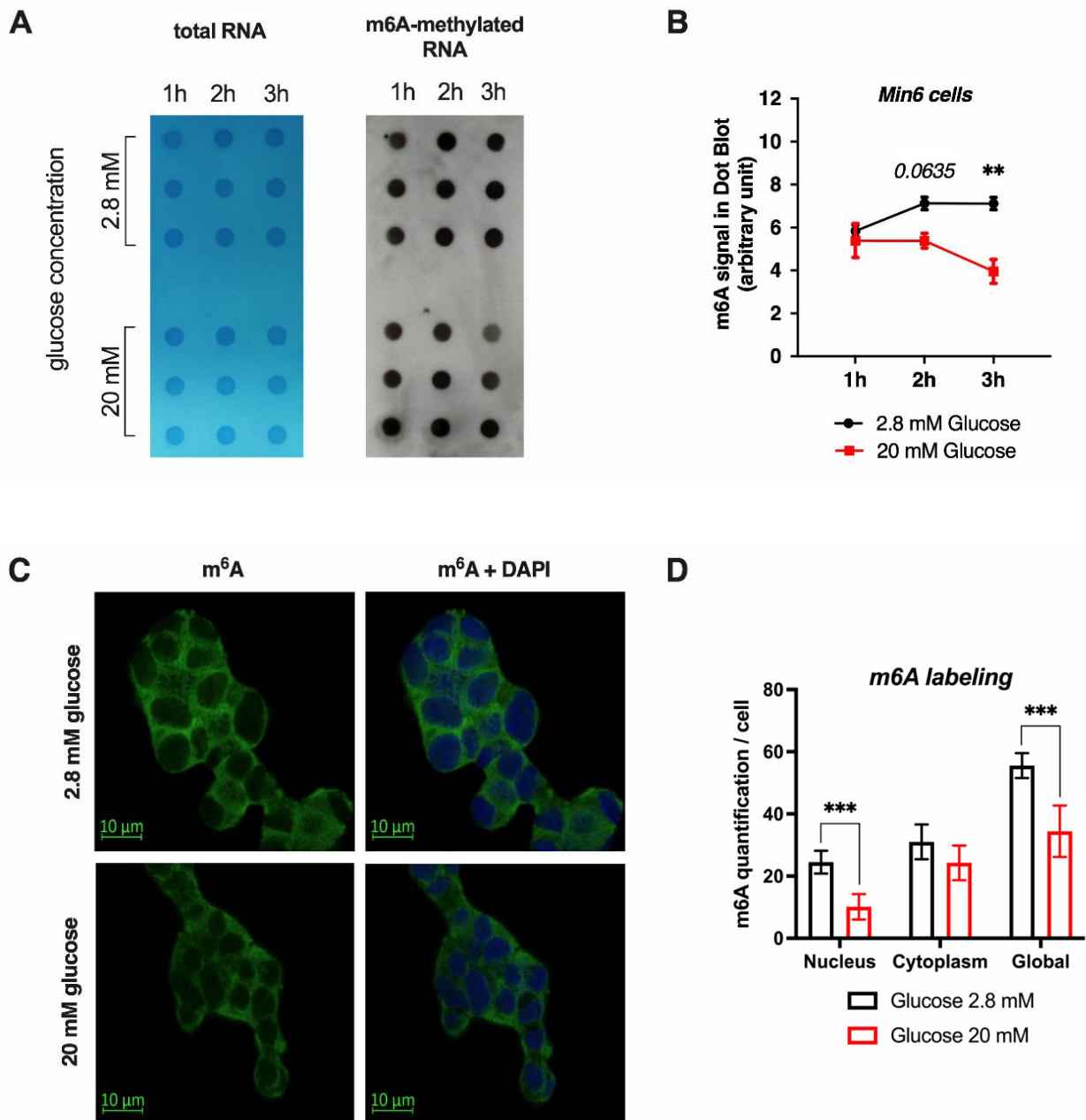
L'insulinorésistance et l'hyperglycémie retrouvées au cours du diabète de type 2 provoquent un environnement glucolipotoxique pour les cellules. Cet environnement diabétogène conduit notamment à une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les îlots pancréatiques de patients atteints du diabète de type 2 (De Jesus et al., 2019)

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux effets de l'environnement, à travers l'analyse de l'effet de variations de la concentration en glucose, sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique.

Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire Min6, un modèle de cellules  $\beta$  pancréatiques murines. Ces cellules ont été incubées pendant 1, 2 et 3h avec des concentrations en glucose de 2,8 mM ou 20 mM afin d'étudier les variations de méthylation m<sup>6</sup>A des ARN. La méthylation m<sup>6</sup>A est ensuite quantifiée par Dot Blot et utilisation d'anticorps spécifiques de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN (Figure 36A et B).

Nous observons une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A de 20 à 40% dans la lignée cellulaire Min6 après 2 et 3h d'incubation à une concentration en glucose de 20 mM, lorsqu'on les compare aux données obtenues pour une concentration de 2,8 mM (Figure 36B).

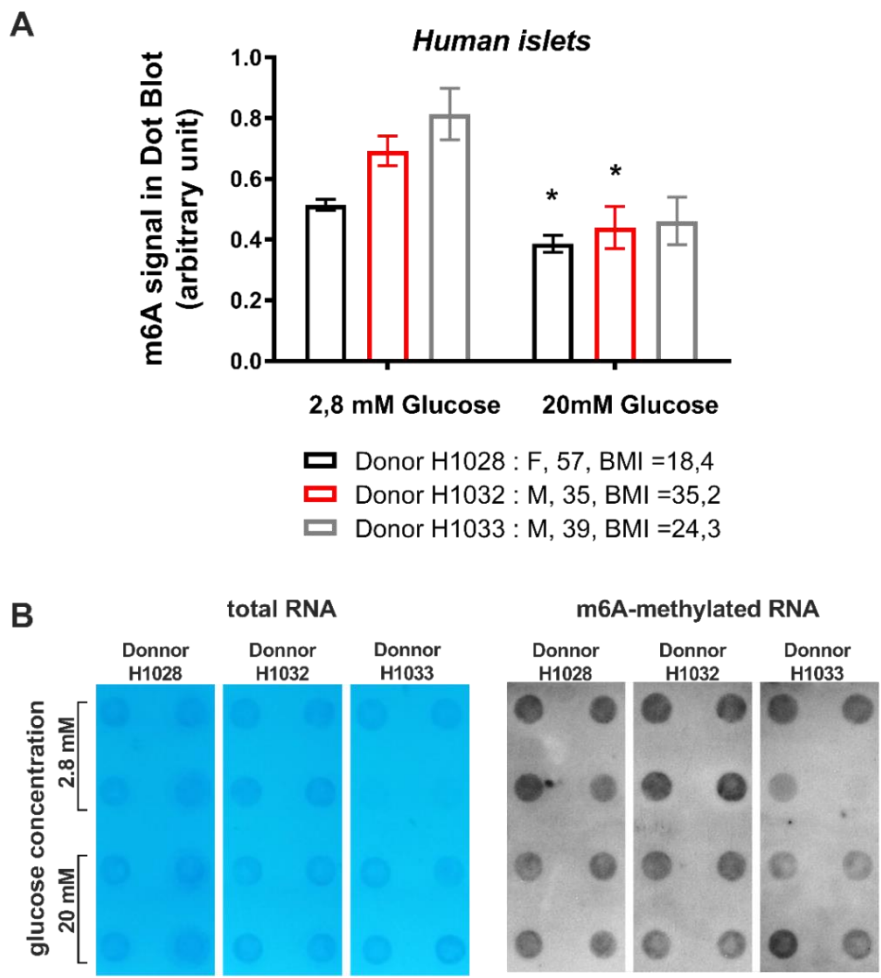
L'expérience a été réalisée une nouvelle fois sur des cellules Min6 pour étudier la localisation et les variations de la méthylation m<sup>6</sup>A par immunofluorescence dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Figure 36C). Une incubation de 3h avec une concentration en glucose de 20 mM induit également une diminution globale de la méthylation m<sup>6</sup>A comparée à une incubation avec 2,8 mM de glucose (Figure 36D). De manière intéressante, la perte de méthylation m<sup>6</sup>A est particulièrement localisée dans le noyau, site principal de la méthylation des ARN (Ke et al., 2017).



**Figure 36 : Effets du glucose sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les cellules Min6.**

(A, B) La méthylation m<sup>6</sup>A des ARN totaux est quantifiée par Dot Blot après 1, 2 et 3h d'incubation avec 2,8 ou 20 mM de glucose (n=3). La quantification de la méthylation m<sup>6</sup>A est obtenue à partir de l'analyse des membranes (en A) par le logiciel ImageJ suite au marquage de la méthylation m<sup>6</sup>A (en gris, à droite) normalisé par le marquage des ARN totaux (en bleu, à gauche). (C) Immunofluorescence de la méthylation m<sup>6</sup>A dans des cellules Min6 traitées pendant 3h avec 2,8 et 20 mM de glucose et (D) quantification par utilisation de macro ImageJ (n=5). Les données sont analysées par 2way ANOVA (A) et Multiple t-test (D). \*\* p<0.01 ; \*\*\* p<0.005.

Afin de mieux comprendre l'importance du glucose dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A chez l'Homme, une expérience similaire a été réalisée sur des îlots pancréatiques humains non diabétiques avec une incubation d'une heure à 2,8 ou 20 mM de glucose (Figure 37A et B). Les résultats obtenus par Dot Blot montrent qu'une concentration en glucose de 20 mM induit une diminution de 20 à 30 % de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les îlots pancréatiques humains comparée à une incubation avec une concentration en glucose de 2,8 mM (Figure 37A).



**Figure 37 : Effets du glucose sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les îlots pancréatiques humains non diabétiques.** (A, B) La méthylation m<sup>6</sup>A des ARN totaux est quantifiée par Dot Blot après 1h d'incubation avec 2,8 ou 20 mM de glucose (n=4). La quantification de la méthylation m<sup>6</sup>A est obtenue à partir de l'analyse des membranes (en B) par le logiciel ImageJ suite au marquage de la méthylation m<sup>6</sup>A (en gris, à droite) normalisé par le marquage des ARN totaux (en bleu, à gauche). Les données sont analysées par un test Mann-Whitney. \* p<0.05.

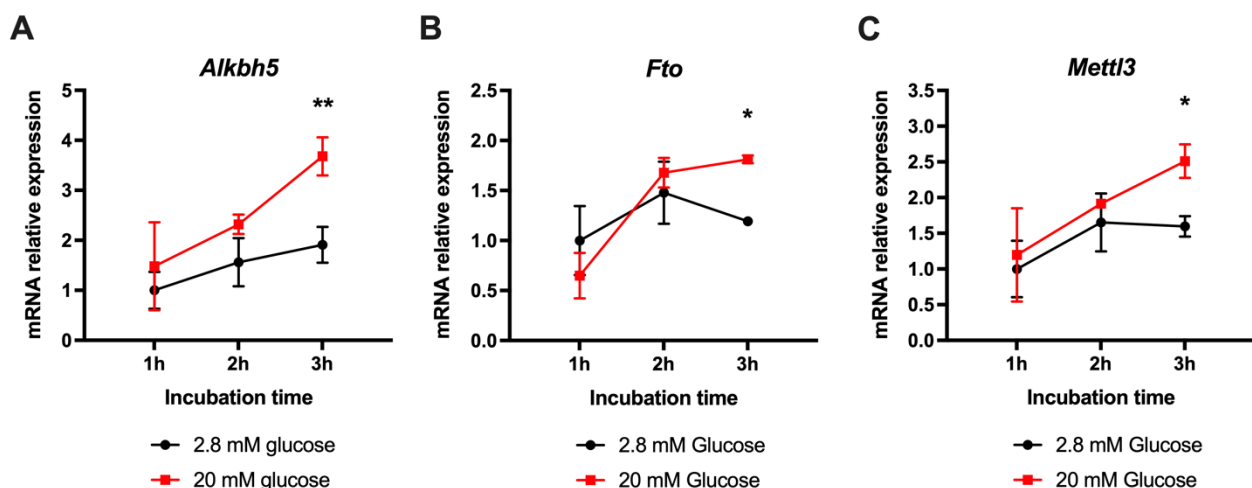
Ces données suggèrent que le glucose, à une concentration élevée, induit une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules  $\beta$  murines et les îlots pancréatiques humains, de manière similaire à ce qui est observé au cours du diabète de type 2. Le glucose pourrait donc être impliqué dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans la cellule  $\beta$  et l'îlot pancréatique.

## B. Étude des variations d'expression et de localisation cellulaire des méthyltransférases et déméthylases

La perte de la méthylation m<sup>6</sup>A, médiée par le glucose, pourrait être le résultat d'une diminution de l'expression de la méthyltransférase METTL3 ou une augmentation d'expression des déméthylases ALKBH5 et/ou FTO. Nous avons donc étudié, dans les cellules Min6, l'expression de ces enzymes dans des conditions identiques à l'expérimentation précédente (Figure 38).

Nos résultats montrent, pour une concentration de 20 mM de glucose et 3h d'incubation, une augmentation de l'expression des ARNm de chacune des enzymes lorsque les résultats sont comparés à une incubation à 2,8 mM de glucose. *Alkbh5* présente une expression presque 2 fois plus importante à 20 mM qu'à 2,8 mM de glucose (Figure 38A). L'expression de *Fto* est environ 1,5 fois plus élevée pour une concentration de 20 mM (Figure 38B). Enfin, l'expression de *Mettl3* est aussi augmentée d'environ 1,6 fois (Figure 38C).

Ces données suggèrent que le glucose pourrait diminuer la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN en induisant une augmentation d'expression des déméthylases ALKBH5 et FTO. De manière intéressante, l'expression de la méthyltransférase METTL3 est également augmentée dans les mêmes conditions. Cette augmentation pourrait être due à un phénomène compensatoire afin d'éviter une déméthylation trop importante des ARN.



**Figure 38 : Effets du glucose sur l'expression des ARNm *Alkbh5*, *Fto* et *Mettl3*.**

Quantification de l'expression des ARNm de *Alkbh5* (A), *Fto* (B) et *Mettl3* (C) par RT-qPCR après 1, 2 et 3 heures de traitement glucose à 2,8 ou 20 mM (n=3). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.01.

L'activité méthyltransférase et déméthylase se déroulant principalement dans le noyau (Ke et al., 2017), nous avons également étudié les variations de localisation des enzymes m<sup>6</sup>A après 3h de traitements à 2,8 ou 20 mM de glucose (Figure 39).

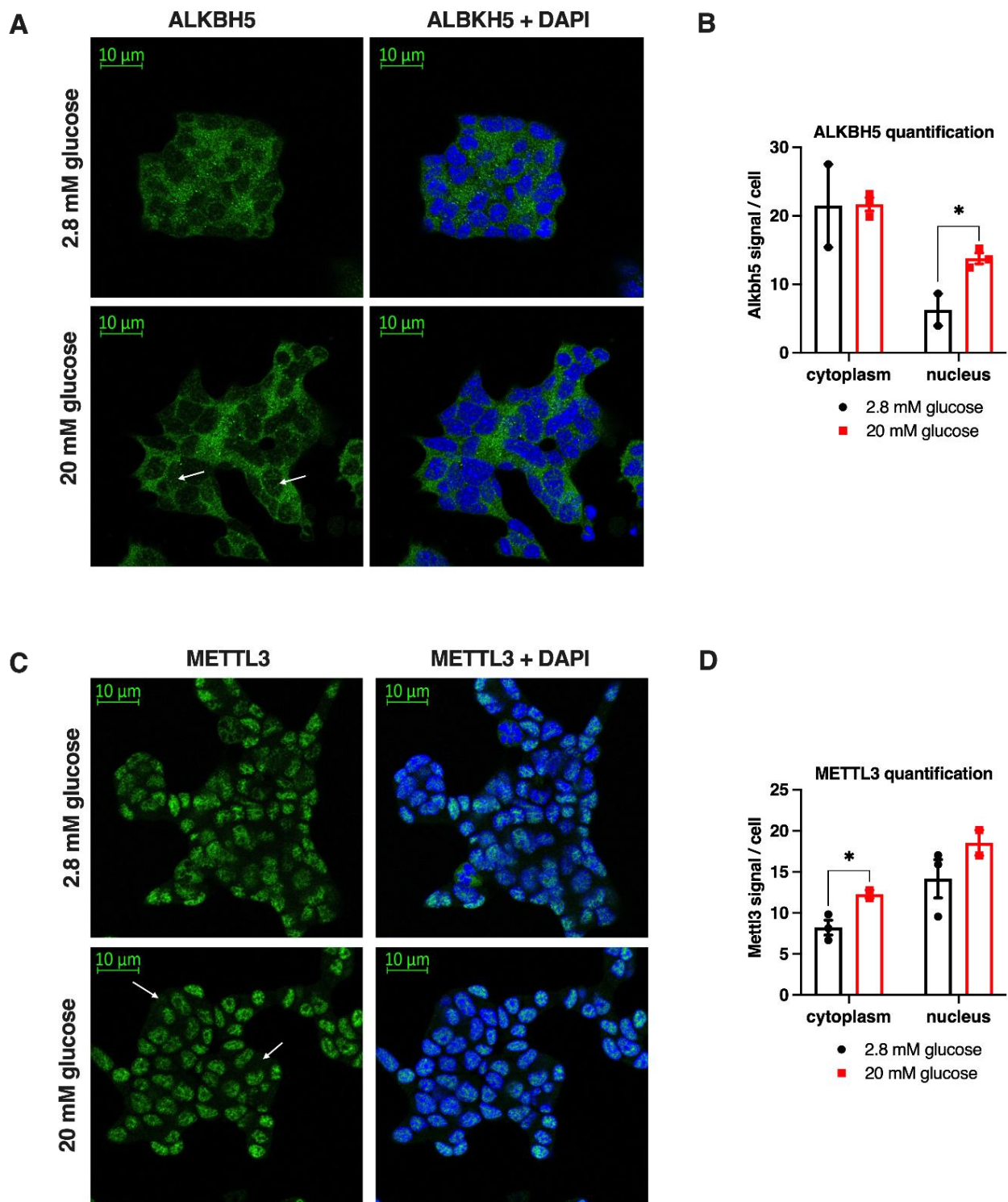
Nos résultats obtenus précédemment, qui montrent une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A observée dans le noyau en présence d'une concentration élevée en glucose, corrélient avec les variations de localisation des enzymes observées ici.

La quantification des données obtenues par immunofluorescence montre que le glucose modifie à la fois l'expression et la localisation de ces enzymes. En effet, la protéine ALKBH5, qui est plutôt cytoplasmique (Figure 39A et B), est augmentée dans le noyau alors que la méthyltransférase METTL3 qui est normalement nucléaire est augmentée dans le cytoplasme avec une concentration en glucose de 20 mM comparée à une concentration de 2,8 mM (Figure 39C et D).

Ces données suggèrent que le glucose conduit au recrutement de la déméthylase ALKBH5 dans le noyau, ce qui permettrait de réduire la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN, observée précédemment. À l'inverse, la méthyltransférase METTL3 est recrutée dans le cytoplasme afin d'éviter la méthylation des ARN dans le noyau en présence d'une concentration élevée de glucose.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats, comme, par exemple, une expérience de fractionnement cellulaire associée à un Western Blot. De plus, des données concernant la déméthylase FTO sont manquantes, l'analyse d'expression de l'enzyme par immunofluorescence n'ayant pu être réalisée par manque d'anticorps compatibles et spécifiques.





**Figure 39 : Effets du glucose sur la localisation de la méthyltransférase METTL3 et de la déméthylase ALKBH5.** Immunofluorescence des enzymes ALKBH5 (A) et METTL3 (C) dans les cellules Min6 traitées pendant 3h avec 2,8 et 20 mM de glucose et quantification (n=3) (B, D) par utilisation de macro ImageJ. Les données sont analysées par multiple t-test. \* p<0.05.

## // Effet du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A des cellules β

### A. Effet du traitement glucolipotoxique sur le stress du réticulum endoplasmique et la sécrétion d'insuline

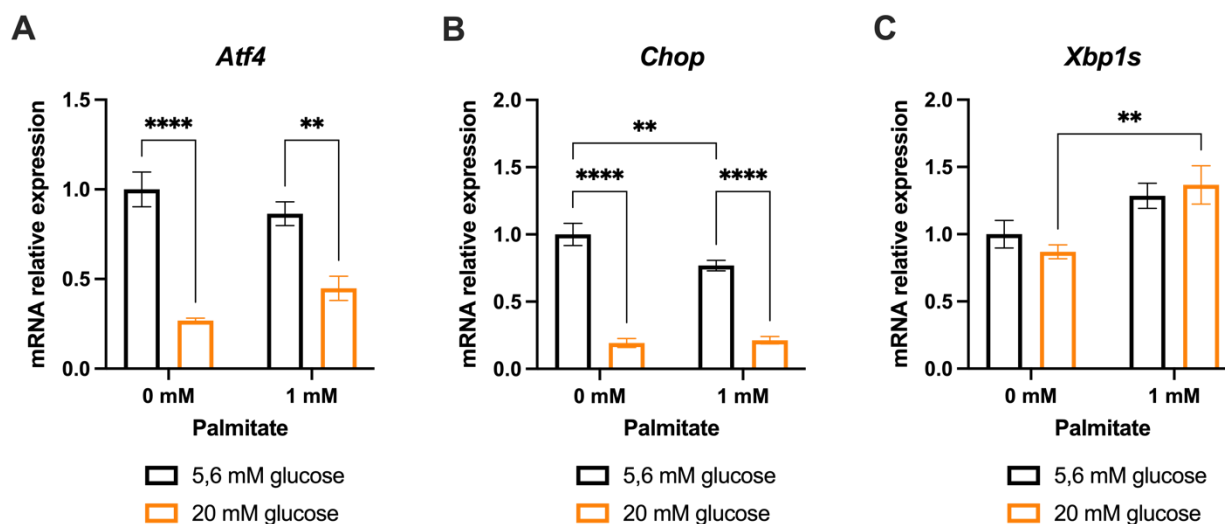
Au cours du diabète de type 2, une dyslipidémie est également retrouvée, associée à l'hyperglycémie chronique (Chehade et al., 2013). En effet, la résistance à l'insuline induit également une augmentation des acides gras libres dans le sang, avec un effet lipotoxique contribuant, tout comme la glucotoxicité, au dysfonctionnement des cellules β pancréatiques et l'altération de la sécrétion d'insuline (Oh et al., 2018; Watson et al., 2011a).

Pour mimer des conditions physiologiques ou physiopathologiques, nous avons co-traité les cellules Min6 avec des concentrations en glucose de 5,6 mM ou 20 mM, avec ou sans 1 mM de palmitate, pendant 72h. Cette expérience nous permet d'étudier les effets à plus long terme d'une exposition à des concentrations élevées en glucose et acides gras sur la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules β pancréatiques.

L'efficacité du traitement a d'abord été validée sur notre lignée cellulaire Min6. Pour cela, nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique, connus pour être activé notamment par la glucolipotoxocité (Cunha et al., 2008; Karaskov et al., 2006) (Figure 40). En présence de glucose seul, nous observons une diminution d'expression de *Atf4* et *Chop*, des protéines de la voie PERK, lorsque la concentration en glucose est de 20 mM comparée à une concentration de 5,6 mM (Figure 40A et B). Ces résultats sont également observés en présence de palmitate avec une diminution de l'expression de *Chop* et *Atf4* entre les deux concentrations en glucose. Enfin, une incubation avec 1 mM de palmitate réduit l'expression de *Chop* pour un traitement avec 5,6 mM. Les variations de concentrations en glucose n'ont pas d'effet sur l'expression de la forme épissée de *Xbp1* (*Xbp1s*), marqueur de l'activation de la voie IRE-1a (Figure 40C). Toutefois, en présence de 1 mM de palmitate, on observe une augmentation de *Xbp1s* pour une concentration de 20 mM de glucose.

Ces résultats suggèrent que la lignée cellulaire Min6 nécessite un apport important de glucose puisque la concentration de 5,6 mM induit un stress du réticulum endoplasmique plus important qu'en présence d'une concentration en glucose de 20 mM, supposée induire une glucotoxicité.

De plus, l'apport de palmitate semble réduire le stress du réticulum endoplasmique induit par des concentrations faibles en glucose. Toutefois, associé à une concentration élevée en glucose, le palmitate augmente le stress du réticulum endoplasmique par l'activation de la voie IRE-1a dans les cellules Min6.



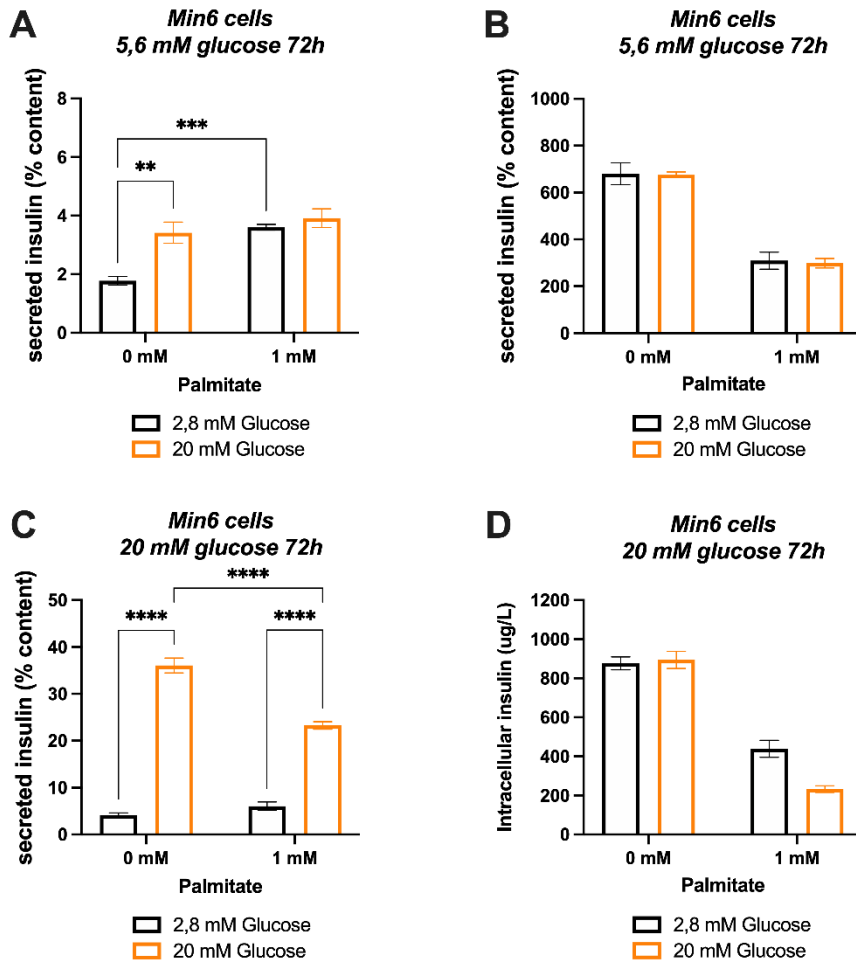
**Figure 40 : Étude de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique.**

Quantification de l'expression des ARNm de *Atf4* (A), *Chop* (B) et *Xbp1s* (C) par RT-qPCR après 72h heures de traitement glucose à 5,6 ou 20 mM, avec ou sans palmitate (1 mM) (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

En parallèle, pour valider l'effet lipotoxique du palmitate sur nos cellules, des tests fonctionnels consistant à mesurer la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose ont été réalisés. En effet, il a été montré que l'utilisation d'acide gras libres, comme le palmitate, induisait une diminution de la sécrétion d'insuline (Oh et al., 2018; Watson et al., 2011b). De la même manière, les cellules Min6 ont été incubées pendant 72h avec 5,6 mM ou 20 mM de glucose et 1 mM de palmitate. Après une déplétion en glucose d'une heure, les cellules ont été stimulées avec des concentrations en glucose de 2,8 mM et 20 mM afin d'étudier la sécrétion d'insuline après traitement.

Une incubation de 72h à 5,6 mM de glucose sans palmitate (Figure 41A), multiplie par environ 2 fois la sécrétion d'insuline dans les cellules Min6 pour une stimulation à 20 mM comparée à une stimulation de 2,8 mM. En présence de 1 mM de palmitate, la sécrétion d'insuline est augmentée après une stimulation avec 2,8 mM de glucose. Cependant, la sécrétion d'insuline n'augmente plus après une stimulation à 20 mM, avec une valeur équivalente à une stimulation de 2,8 mM.

Les résultats obtenus dans ces conditions démontrent que le palmitate semble altérer la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, avec une sécrétion d'insuline équivalente quelles que soit la stimulation en glucose. De plus, le palmitate provoque également une réduction de la production d'insuline avec une diminution du contenu intracellulaire en insuline comparée à une condition sans palmitate (Figure 41B).



**Figure 41 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose après un traitement palmitate et glucose de 72h des cellules  $\beta$  pancréatiques.**

(A) Test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (2,8 vs 20 mM glucose) après incubation des cellules Min6 pendant 72h avec 5,6 mM et contenu intracellulaire en insuline (B) (n=4). (C) Test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (2,8 vs 20 mM glucose) après incubation des cellules Min6 pendant 72h avec 20 mM et contenu intracellulaire en insuline (D) (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.005$  ; \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

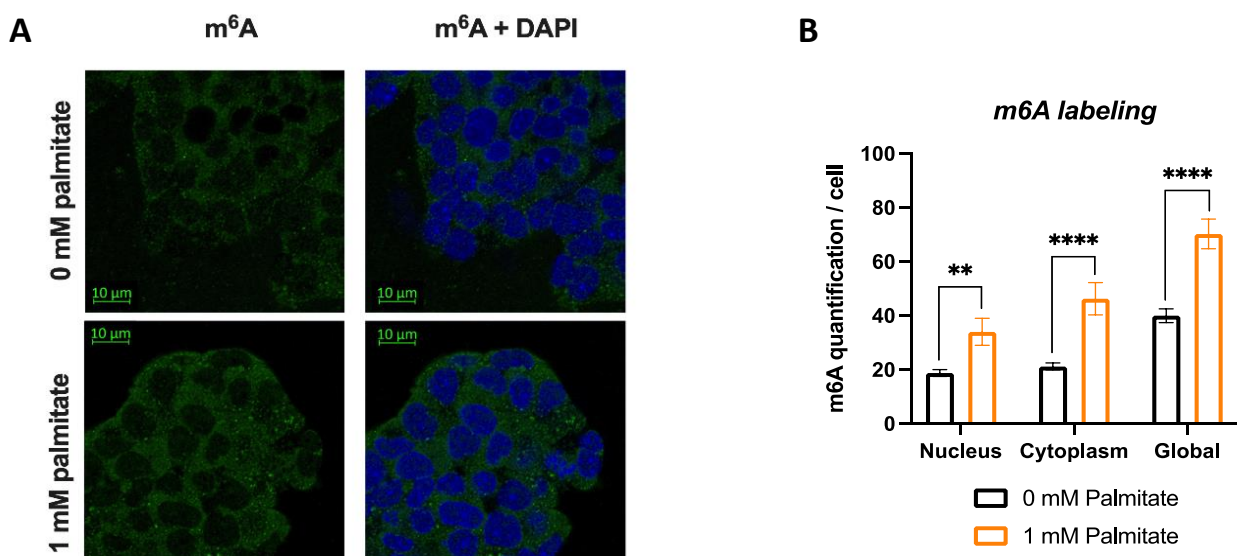
Lorsque les cellules Min6 sont incubées pendant 72h avec des concentrations en glucose plus importantes (Figure 41C), la sécrétion d'insuline, stimulée par une concentration en glucose de 20 mM, est 7 fois plus importante comparée à une stimulation de 2,8 mM.

En présence de palmitate, la stimulation de la sécrétion d'insuline par 20 mM de glucose est réduite avec une sécrétion 5 fois plus importante comparée à une stimulation de 2,8 mM. On observe également, en présence de palmitate, comme dans les résultats précédents, une diminution du contenu intracellulaire en insuline, qui est encore plus importante pour une stimulation à 20 mM de glucose (Figure 41D). Dans ces conditions, l'incubation de 72h avec des concentrations élevées de glucose permet une stimulation de la sécrétion plus importante. Toutefois, la présence de palmitate dans le milieu induit une perte de sécrétion et une diminution de la production d'insuline dans les cellules Min6.

Dans des conditions glucotoxiques, le palmitate provoque un stress du réticulum endoplasmique par l'activation de la voie IRE-1a, qui augmente l'expression de la forme épissée de *Xbp1s*. Il altère également la production et la sécrétion d'insuline dans notre modèle de lignée cellulaire  $\beta$  pancréatique.

## B. Effets du palmitate sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN et l'expression des enzymes

Par la suite, nous avons étudié, dans les cellules Min6, l'effet du palmitate sur la méthylation m<sup>6</sup>A par immunofluorescence (Figure 42A). Nos résultats montrent que le palmitate induit une augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, avec une augmentation globale de la méthylation m<sup>6</sup>A d'environ 70% (Figure 42B).

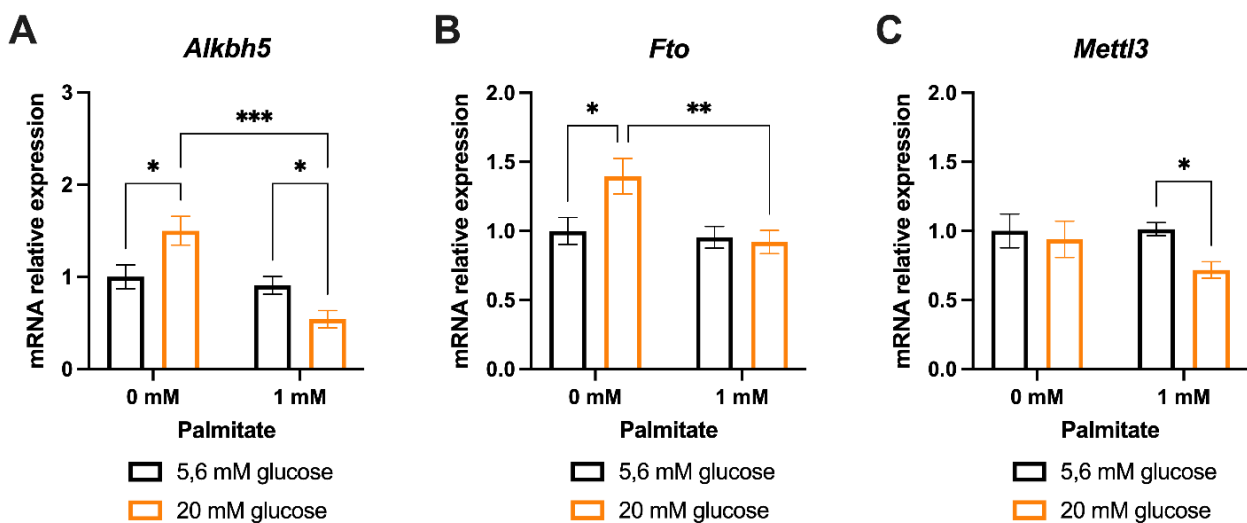


**Figure 42 : Effets du palmitate sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les cellules Min6.**

(A) Immunofluorescence de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules Min6 traitées pendant 72h avec 20 mM de glucose, avec (n=5) ou sans palmitate (n=7) pour une concentration de 1 mM. (B) Quantification de la fluorescence par utilisation de macro ImageJ. Les données sont analysées par multiple t-test. \*\* p<0.01 ; \*\*\*\* p<0.001.

Toutefois, d'autres expériences restent à réaliser pour quantifier plus précisément les effets du palmitate sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN.

Nous avons également étudié, dans les cellules Min6, l'expression des différentes enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN (Figure 43) après un traitement de 72h à 5,6 ou 20 mM de glucose, avec ou sans palmitate (à 1 mM). Dans notre modèle, une exposition de 72h à une concentration en glucose de 20 mM induit une augmentation d'expression des ARNm de *Alkbh5* et *Fto* comparée à une incubation à 5,6 mM (Figure 43A et B). Aucun effet n'est observé sur l'expression de *Mettl3* (Figure 43C). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment après une incubation de 3h à 20 mM de glucose, avec une augmentation des déméthylases qui induit une perte de méthylation m<sup>6</sup>A des ARN. Le palmitate n'a pas d'effet sur l'expression des différentes enzymes pour une concentration en glucose de 5,6 mM. En revanche, pour une concentration de 20 mM en glucose et 1 mM de palmitate, on observe une diminution d'expression de *Alkbh5* et *Fto* par rapport à la condition sans palmitate (Figure 43A et B). L'expression de *Mettl3* est également réduite en présence de palmitate entre une concentration en glucose de 5,6 mM et 20 mM.



**Figure 43 : Effets du palmitate associé au glucose sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les cellules  $\beta$  pancréatiques.**

Quantification de l'expression des ARNm de *Alkbh5* (A), *Fto* (B) et *Mettl3* (C) dans les cellules Min6 par RT-qPCR après 72h heures de traitement glucose à 5,6 ou 20 mM, avec ou sans palmitate (1 mM) (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.01.

D'après ces résultats, le palmitate, en présence d'une concentration élevée en glucose, induit une perte d'expression des déméthylases, ce qui pourrait conduire à l'augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les cellules  $\beta$  pancréatiques.

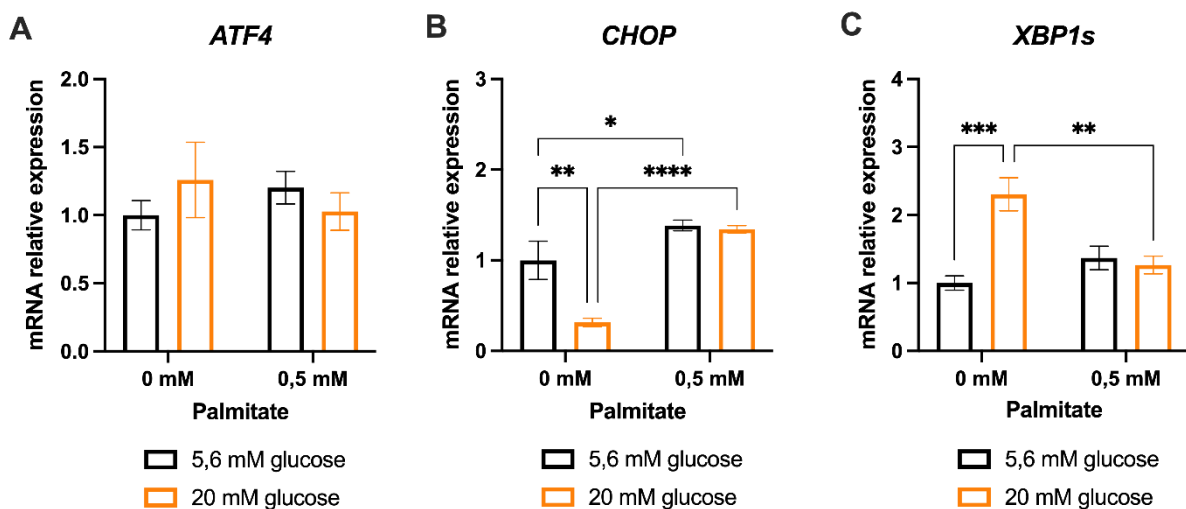
### III. Rôle du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A des îlots pancréatiques humains

#### A. Effet du traitement glucolipotoxique sur le stress du réticulum endoplasmique

Nous avons ensuite effectué le même type d'expérience sur des îlots humains issus de patients non diabétiques afin de mieux comprendre, chez l'Homme, les effets du palmitate associé au glucose. De la même manière que dans les cellules Min6, nous avons étudié l'expression des gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique afin de vérifier l'efficacité du palmitate (Figure 44).

Dans ce modèle, la présence de palmitate et les différentes concentrations en glucose n'induisent pas d'effets significatifs sur l'expression d'*ATF4* (Figure 44A). Toutefois, pour l'ARNm de *CHOP*, un traitement de 72h à 20 mM de glucose induit une diminution d'expression comparé à un traitement de 5,6 mM. On observe également une augmentation de l'expression de *CHOP* en présence de 0,5 mM de palmitate quelle que soit la concentration en glucose utilisée (Figure 44B).

A l'inverse, pour la forme épissée de *XBP1s*, une concentration de 20 mM augmente l'expression de l'ARNm comparée à une concentration de 5,6 mM. De plus, le palmitate induit une réduction d'expression de *XBP1s* pour une concentration en glucose de 20 mM.



**Figure 44 : Étude de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique.**

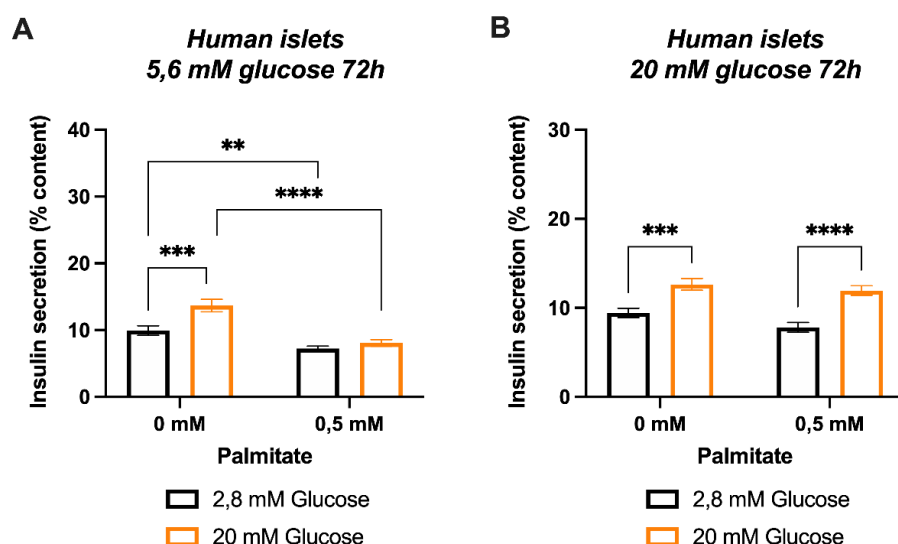
Quantification de l'expression des ARNm de *ATF4* (A), *CHOP* (B) et *XBP1s* (C) par RT-qPCR après 72h heures de traitement glucose à 5,6 ou 20 mM, avec ou sans palmitate (0,5 mM) dans les îlots pancréatiques humains issus de patients non diabétiques (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ .

Dans les îlots pancréatiques humains, le palmitate semble donc induire un stress du réticulum endoplasmique via l'activation de la protéine CHOP, sans avoir toutefois d'effet significatif sur l'expression de *ATF4*. Une concentration élevée en glucose semble plutôt induire un stress du réticulum endoplasmique via la voie IRE-1a.

Nous avons également étudié la sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques humains après un traitement de 72h avec 5,6 ou 20 mM de glucose associé ou non avec du palmitate à 0,5 mM (Figure 45).

Après une incubation de 5,6 mM de glucose pendant 72h, la sécrétion d'insuline après stimulation au glucose est augmentée pour une concentration de 20 mM comparée à une stimulation à 2,8 mM (Figure 45A). En présence de palmitate, la sécrétion d'insuline est altérée après une incubation à 5,6 mM quelle que soit la stimulation. Pour une incubation de 72h à 20 mM glucose (Figure 45B), la sécrétion d'insuline est également augmentée pour une stimulation à 20 mM glucose. Toutefois, la présence de palmitate n'induit pas d'altération de la sécrétion d'insuline après stimulation pour les îlots pancréatiques.

Ainsi, à l'inverse de notre lignée cellulaire Min6, la sécrétion d'insuline semble particulièrement être affectée par le palmitate à des concentrations physiologiques en glucose, alors que le palmitate n'a aucun effet sur la sécrétion en présence de concentration plus importante en glucose.



**Figure 45 : Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose après un traitement palmitate et glucose de 72h des îlots pancréatiques humains.**

Test de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (2,8 vs 20 mM glucose) après incubation des îlots pancréatiques humains pendant 72h avec 5,6 mM (A) ou 20 mM de glucose (B) (n=7). Îlots pancréatiques issus du donneur H1099. Les données sont analysées par 2way ANOVA. \*\*  $p < 0.01$  ; \*\*\*  $p < 0.005$  ; \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

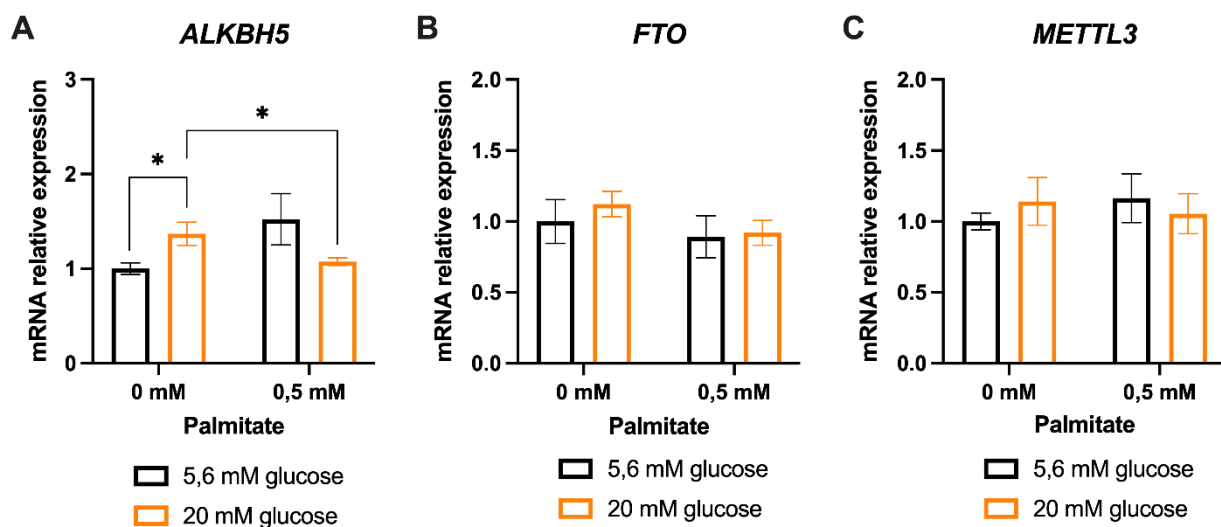


## B. Effets du palmitate sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN

L'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A a ensuite été quantifiée dans les îlots pancréatiques pour les mêmes conditions expérimentales, afin d'étudier *in vivo* les effets du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN (Figure 46).

De la même manière à ce qui a été observé précédemment dans les cellules Min6, une incubation avec 20 mM pendant 72h induit une augmentation d'expression d'*ALKBH5* comparée à une incubation avec 5,6 mM de glucose (Figure 46A). Avec le palmitate, l'expression d'*ALKBH5* est diminuée dans les îlots humains, tout comme dans les cellules Min6 pour une incubation de 72h avec 20 mM de glucose. En revanche pour les deux autres enzymes, aucun effet n'est observé quelles que soient les conditions (Figure 46B et C).

Les effets observés à long terme sur la méthylation m<sup>6</sup>A en présence de palmitate seraient médiés à la fois dans les cellules  $\beta$  et l'îlot pancréatique par une diminution d'expression de la déméthylase *ALKBH5*. De même, la diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A pourrait être induite par une exposition prolongée à des concentrations élevées en glucose, qui induiraient une augmentation d'expression de la déméthylase *ALKBH5*.



**Figure 46 : Effets du palmitate associé au glucose sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les îlots pancréatiques humains.**

Quantification de l'expression des ARNm de *ALKBH5* (A), *FTO* (B) et *METTL3* (C) dans les îlots pancréatiques humains issus de patients non diabétiques par RT-qPCR après 72h heures de traitement glucose à 5,6 ou 20 mM, avec ou sans palmitate (0,5 mM) (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \* p<0.05.

En conclusion, une incubation longue de 72h avec une concentration élevée en glucose induit dans les cellules  $\beta$  pancréatiques une augmentation de l'expression des déméthylases ALKBH5 et FTO. Dans les îlots pancréatiques humains, nous observons uniquement une augmentation de la déméthylase ALKBH5. L'augmentation d'expression des déméthylases dans ces conditions pourrait conduire à une perte de la méthylation  $m^6A$  similaire à celle observée au cours du diabète de type 2.

En présence de palmitate, une concentration élevée en glucose pendant 72h semble plutôt induire une augmentation de la méthylation  $m^6A$  en induisant une perte d'expression des deux déméthylases dans les cellules  $\beta$  pancréatiques et de ALKBH5 dans les îlots pancréatiques humains.

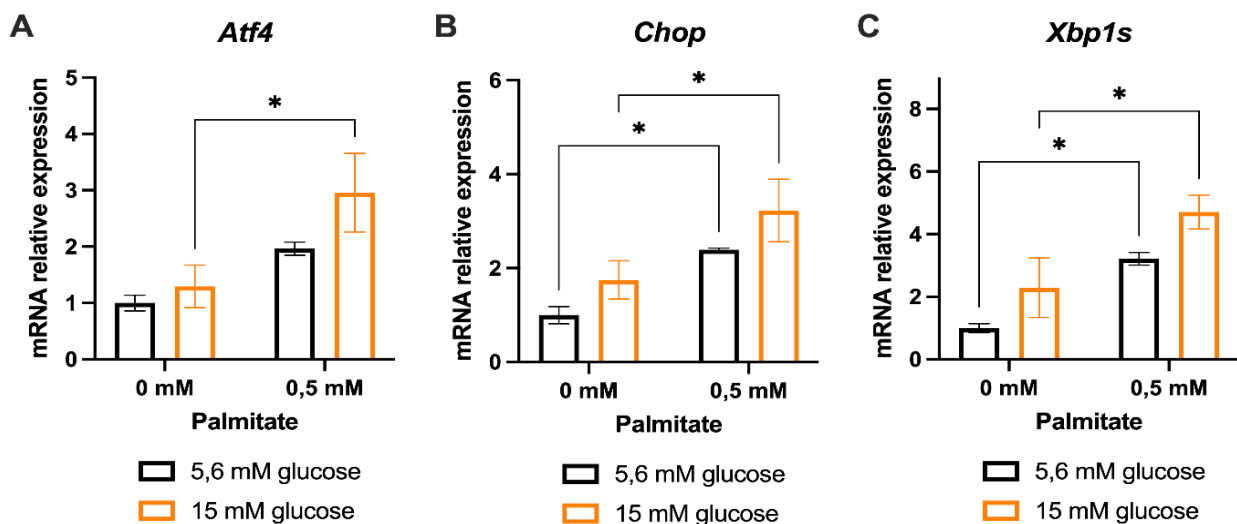
Les effets observés au cours du diabète du type 2 sur la régulation de la méthylation  $m^6A$  pourraient être principalement médiés par le glucose, avec un effet moindre du palmitate. Toutefois, ces résultats restent à être confirmés par une expérience d'immunoprécipitation de la méthylation  $m^6A$  et séquençage des ARN méthylés sur des échantillons d'ARN issus d'îlots pancréatiques de donneurs humains diabétiques et non diabétiques ainsi que sur nos différents modèles utilisés après un traitement glucose et palmitate. Cela nous permettra d'identifier les variations de méthylation des ARN cibles selon les traitements utilisés sur nos différents modèles et de les comparer aux résultats obtenus pour les îlots de patients diabétiques et non diabétiques.

## IV. Rôle du palmitate associé au glucose dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A des cellules $\alpha$ pancréatiques.

Ces résultats nous ont permis de mieux comprendre les interactions possibles entre l'environnement cellulaire et la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules  $\beta$  et l'îlot pancréatique. Toutefois, nous ne connaissons pas les effets de l'environnement sur la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A au sein des autres types cellulaires de l'îlot.

Nous avons donc étudié les effets du palmitate associé au glucose dans une lignée cellulaire  $\alpha$  pancréatique. Les cellules  $\alpha$ -TC sont traitées pendant 72h avec des concentrations en glucose de 5,6 ou 15 mM de glucose, associé ou non à 0,5 mM de palmitate (Figure 47).

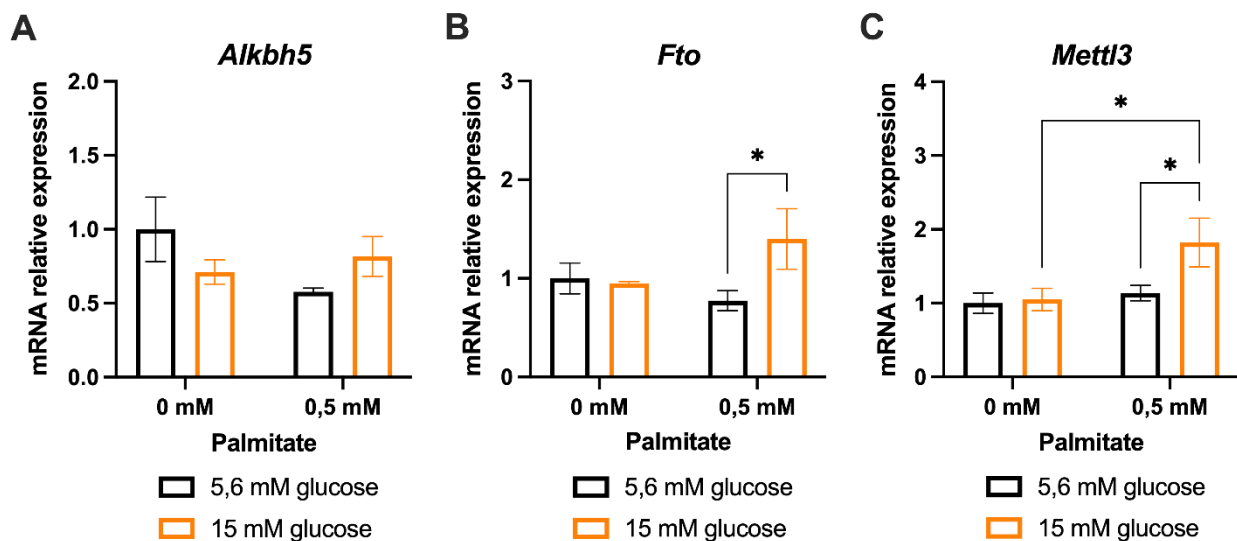
Dans ces cellules, la présence de palmitate induit une augmentation de l'expression des gènes *Chop*, *Atf4* et *Xbp1s* pour une incubation de 15mM en glucose. L'expression de *Chop* et *Xbp1s* est également augmentée en présence de palmitate et une concentration en glucose de 5,6 mM comparé à une condition sans palmitate (Figure 47B et C). Dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques, le palmitate associé au glucose induit également un stress du réticulum endoplasmique en activant la voie PERK et IRE-1a.



**Figure 47 : Étude de l'expression de gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques.**

Quantification de l'expression des ARNm de *Atf4* (A), *Chop* (B) et *Xbp1s* (C) par RT-qPCR après 72h heures de traitement glucose à 5,6 ou 20 mM, avec ou sans palmitate (0,5 mM) dans les cellules  $\alpha$ -TC (n=3). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \*p<0.05.

Après étude de l'expression des enzymes m<sup>6</sup>A dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 48), il apparaît qu'une incubation de 72h avec différentes concentrations en glucose n'induit pas de variations d'expression significatives des déméthylases et méthyltransférases impliquées dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A. Néanmoins, la présence de palmitate augmente l'expression de la déméthylase FTO et la méthyltransférase METTL3 en présence de 20 mM de glucose (Figure 48B et C).



**Figure 48 : Effets du palmitate associé au glucose sur l'expression des enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques.**

Quantification de l'expression des ARNm de *Alkbh5* (A), *Fto* (B) et *Mettl3* (C) dans les cellules  $\alpha$ -TC par RT-qPCR après 72h heures de traitement glucose à 5,6 ou 20 mM, avec ou sans palmitate (0,5 mM) (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \* p<0.05.

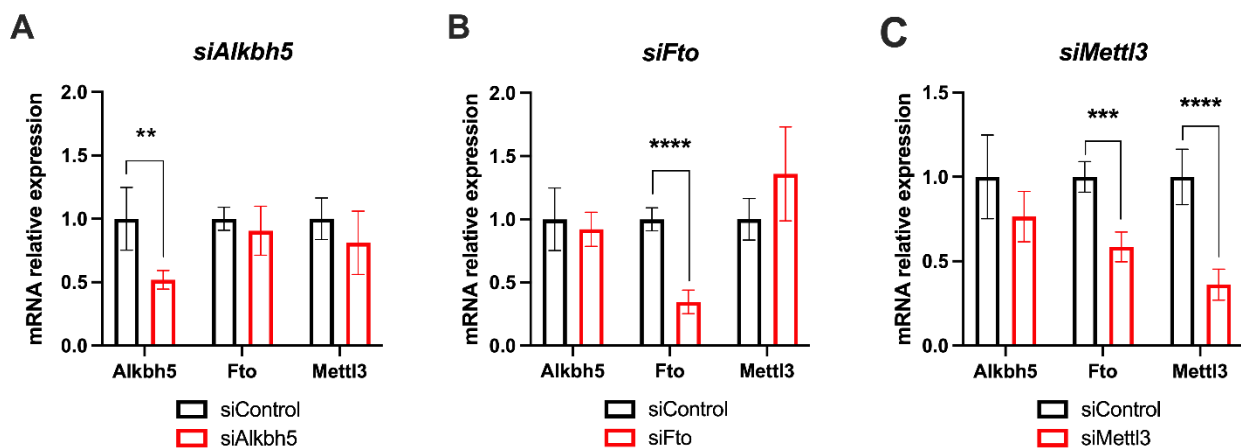
Le glucose seul ne semble donc pas avoir d'effet sur la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules  $\alpha$  pancréatiques. C'est l'association du palmitate et d'une concentration élevée en glucose qui augmente l'expression des enzymes FTO et METTL3. Cependant, nous ne connaissons pas les effets directs sur la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN. Une expérience de dosage de la méthylation m<sup>6</sup>A dans ces mêmes conditions est donc nécessaire afin de comprendre l'implication des cellules  $\alpha$  pancréatiques dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A au sein de l'îlot.

## V. Rôle des enzymes m<sup>6</sup>A dans la régulation de l'identité et de la fonction des cellules β et l'îlot pancréatique.

### A. Effets des siRNA dirigés contre les méthyltransférases et déméthylases sur les cellules β pancréatiques

Afin de mieux comprendre le rôle des méthyltransférases et déméthylases dans la cellule β pancréatique, nous avons transfecté les cellules Min6 avec différents siRNA dirigés contre les enzymes m<sup>6</sup>A.

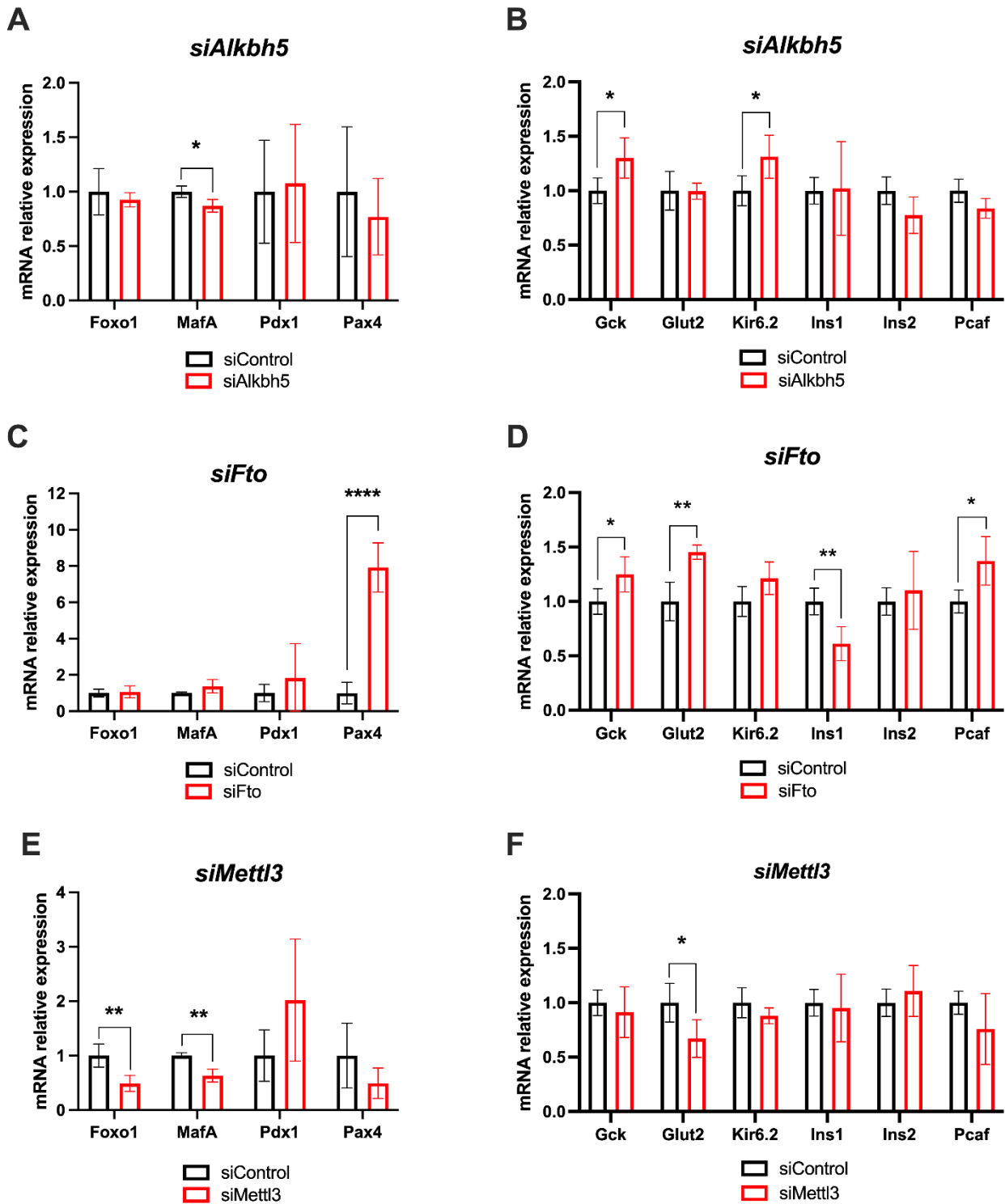
Dans un premier temps, nous avons déterminé l'efficacité des différents siRNA utilisés ainsi que leur effet respectif sur les autres enzymes impliquées dans la méthylation m<sup>6</sup>A (Figure 49). Après 48h, les différents siRNA utilisés induisent une perte d'expression des ARN cibles supérieure à 50%. De manière intéressante, l'utilisation du siRNA dirigé contre *Mettl3* induit également une perte de 50% de l'expression de *Fto*, probablement due à un phénomène compensatoire (Figure 49C).



**Figure 49 : Effets des différents siRNA sur l'expression des enzymes m<sup>6</sup>A dans les cellules Min6.**

Les cellules sont transfectées avec des siRNA dirigés contre *Alkbh5* (A), *Fto* (B) ou *Mettl3* (C). L'expression des différentes enzymes est étudiée 48h après transfection par RT-qPCR. Les données sont analysées par multiple t test. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ .

Nous avons ensuite étudié l'expression de différents gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle (tel que *Pdx1*, *Pax4*, *MafA* ou *Pcaf/Kat2b*) et le processus de sécrétion de l'insuline (comme *Gck*, *Glut3*, *Kir6.2*, *Ins1* et *Ins2*) des cellules β pancréatiques suite à l'inhibition de l'expression des enzymes m<sup>6</sup>A par l'utilisation de siRNA (Figure 50).



**Figure 50 : Effets des siRNA dirigés contre Alkbh5, Fto ou Mettl3 sur l'expression des gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques.**

Les cellules sont transfectées avec des siRNA dirigés contre Alkbh5 (A et B), Fto (C et D) ou Mettl3 (E et F). L'expression des différents gènes est étudiée 48h après transfection par RT-qPCR. Les données sont analysées par multiple t test.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ .

Le siRNA dirigé contre *Alkbh5* induit une légère diminution d'expression du facteur de transcription MAFA (Figure 50A), impliqué dans la régulation de l'identité des cellules  $\beta$ , associé à une augmentation d'expression de 30 % de la glucokinase (Gck) et Kir6.2 (Figure 50B), un canaux potassique sensible à l'ATP impliqué dans la sécrétion de l'insuline lors de la dépolarisation membranaire.

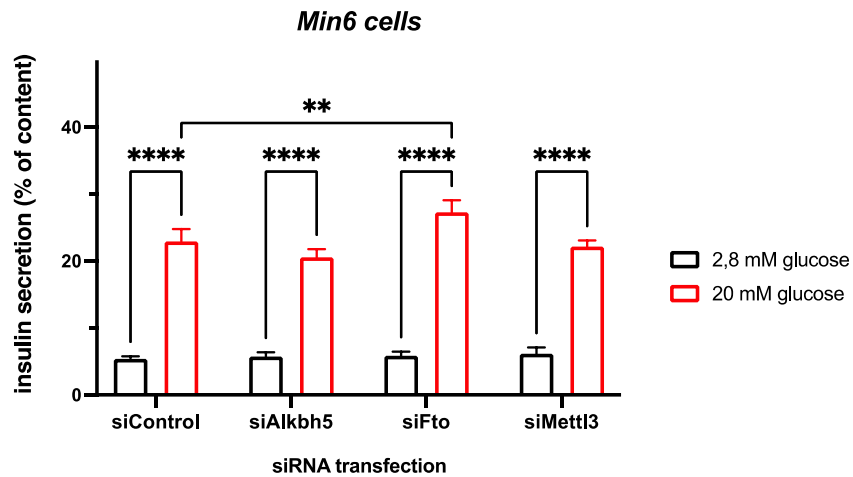
La diminution d'expression de *Fto* induite par l'utilisation de siRNA provoque une augmentation significative de l'expression de *Pax4*, un autre facteur de transcription impliqué dans l'identité des cellules  $\beta$  (Figure 50C) et *Kat2b* (aussi appelé Pcaf). Ce siRNA induit également une augmentation d'expression de *Gck* et de *Glut2*, transporteur du glucose dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, associée à une perte d'expression de *Ins1* (Figure 50D).

Enfin, la perte d'expression de *Mettl3* induit une perte d'expression de deux gènes impliqués dans le maintien de l'identité des cellules  $\beta$ , *Foxo1* et *MafA* (Figure 50E) associée à une diminution de *Glut2* (Figure 50F).

L'inhibition des déméthylases augmente l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'identité et de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques alors que l'inhibition de la méthyltransférase réduit leur expression. Ces résultats semblent montrer que les déméthylases régulent négativement l'expression de ces gènes alors que la méthyltransférase METTL3 les régule positivement.

La sécrétion d'insuline a également été évaluée après l'utilisation des différents siRNA afin de déterminer les effets directs de l'inhibition des enzymes m<sup>6</sup>A sur la fonction sécrétrice des cellules  $\beta$  pancréatiques (Figure 51).

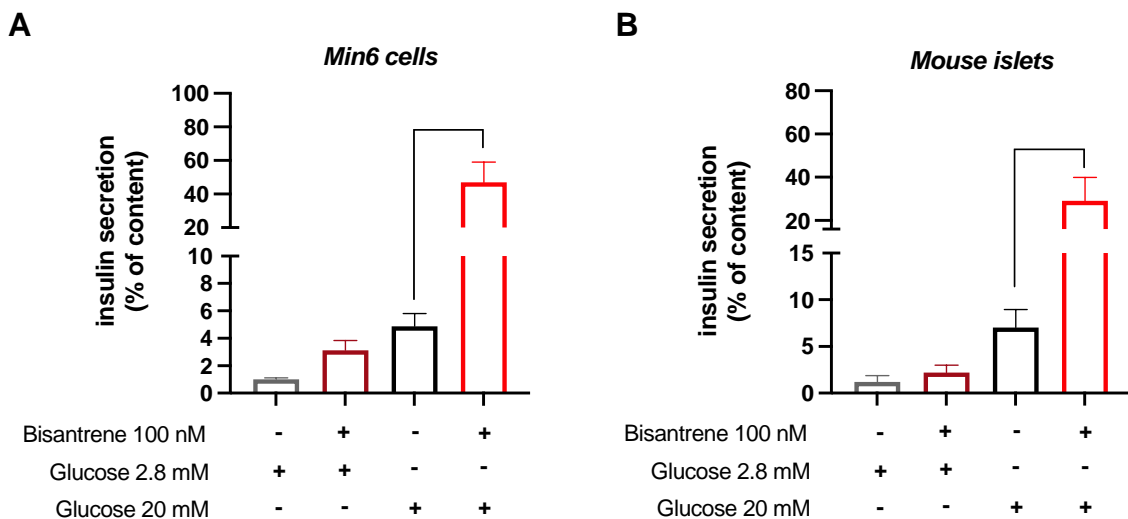
Quel que soit le siRNA utilisé, les cellules Min6 répondent à une stimulation au glucose de 20 mM avec une sécrétion d'insuline beaucoup plus importante qu'avec une stimulation à 2,8 mM de glucose. Seul le siRNA dirigé contre la déméthylase FTO induit une augmentation de la sécrétion de l'insuline dans les cellules Min6, confirmant les résultats précédemment obtenus, avec une régulation négative de la fonction des cellules  $\beta$  par les déméthylases.



**Figure 51 : Effets des différents siRNA utilisés sur la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques.** Quantification de l'insuline sécrétée par les cellules Min6 après stimulation au glucose à 2,8 et 20 mM, 48h après traitements avec les différents siRNA (n=16). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ .

## B. Effet de l'inhibiteur pharmacologique de la déméthylase FTO

Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement au rôle de la déméthylase FTO dans la sécrétion d'insuline. Les effets sur la sécrétion d'insuline étant faibles après traitement avec un siRNA, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de FTO, le bisantrene (Su et al., 2020), afin d'étudier l'importance de la déméthylase FTO dans la régulation de la sécrétion de l'insuline (Figure 52).



**Figure 52 : Effets du bisantrene sur la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  et des îlots pancréatiques de souris.** (A) Les cellules Min6 sont traitées avec 100 nM de bisantrene pendant 8h, la sécrétion d'insuline est ensuite quantifiée par ELISA après stimulation au glucose d'une heure à 2,8 ou 20 mM de glucose (n=4). (B) Traitements des îlots pancréatiques de souris avec 100 nM de bisantrene pendant 2h, puis quantification de la sécrétion d'insuline par ELISA après stimulation au glucose d'une heure à 2,8 ou 20 mM de glucose (n=4). Les données sont analysées par 2way ANOVA. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



Dans notre lignée cellulaire Min6, une incubation avec 100 nM bisantrene pendant 8h induit une augmentation significative de la sécrétion d'insuline après stimulation au glucose de 20 mM, comparée à une condition similaire sans bisantrene.

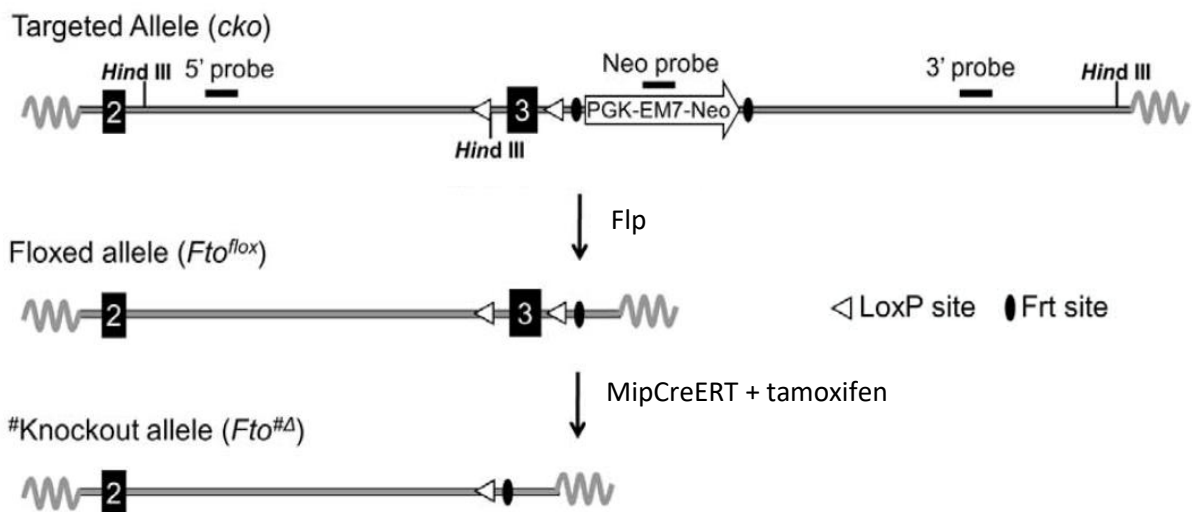
De même, un traitement similaire sur des îlots pancréatiques de souris induit également une augmentation de la sécrétion d'insuline après une stimulation à 20 mM de glucose.

Les résultats obtenus confirment l'augmentation de la sécrétion d'insuline après inhibition pharmacologique de la déméthylase FTO par le bisantrene. À la condition que cet inhibiteur soit spécifique, la déméthylase FTO pourrait donc être impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline, en plus de réduire l'expression des gènes impliqués dans l'identité et la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques.

## VI. Données supplémentaires

### A. Utilisation d'un modèle de souris invalidées pour la déméthylase FTO

Sur la base des résultats obtenus concernant la déméthylase FTO, nous avons voulu poursuivre notre étude à l'aide d'un modèle *in vivo* permettant d'étudier la fonction de FTO, en développant une lignée de souris invalidées pour le gène de la déméthylase dans la cellule  $\beta$  pancréatique. Pour cela, nous avons croisé des souris dont l'exon 3 du gène *Fto* est flanqué de séquences LoxP avec des souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle du promoteur de l'insuline murine (MIP : mouse insulin promoter) afin d'invalider ce gène spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Figure 53). Ce promoteur est inductible, car combiné au récepteur des œstrogènes (ER). Avant induction, la Cre recombinase est localisée dans le cytoplasme et se transloque dans le noyau pour effectuer la recombinaison génique après injection de tamoxifène, un ligand du récepteur aux œstrogènes.



**Figure 53 : Construction du modèle de souris *Fto-Flox* avant et après invalidation par la Cre recombinase.** L'exon 3 du gène *Fto* est flanqué de part et d'autre par des séquences LoxP, à proximité d'une cassette de sélection par néomycine. Après croisement avec des souris Flp, la cassette néomycine est retirée. Les souris invalidées sont obtenues par croisement des souris *Fto Flox* avec des souris *MipCreERT* et injection de tamoxifène (Gao et al., 2010).

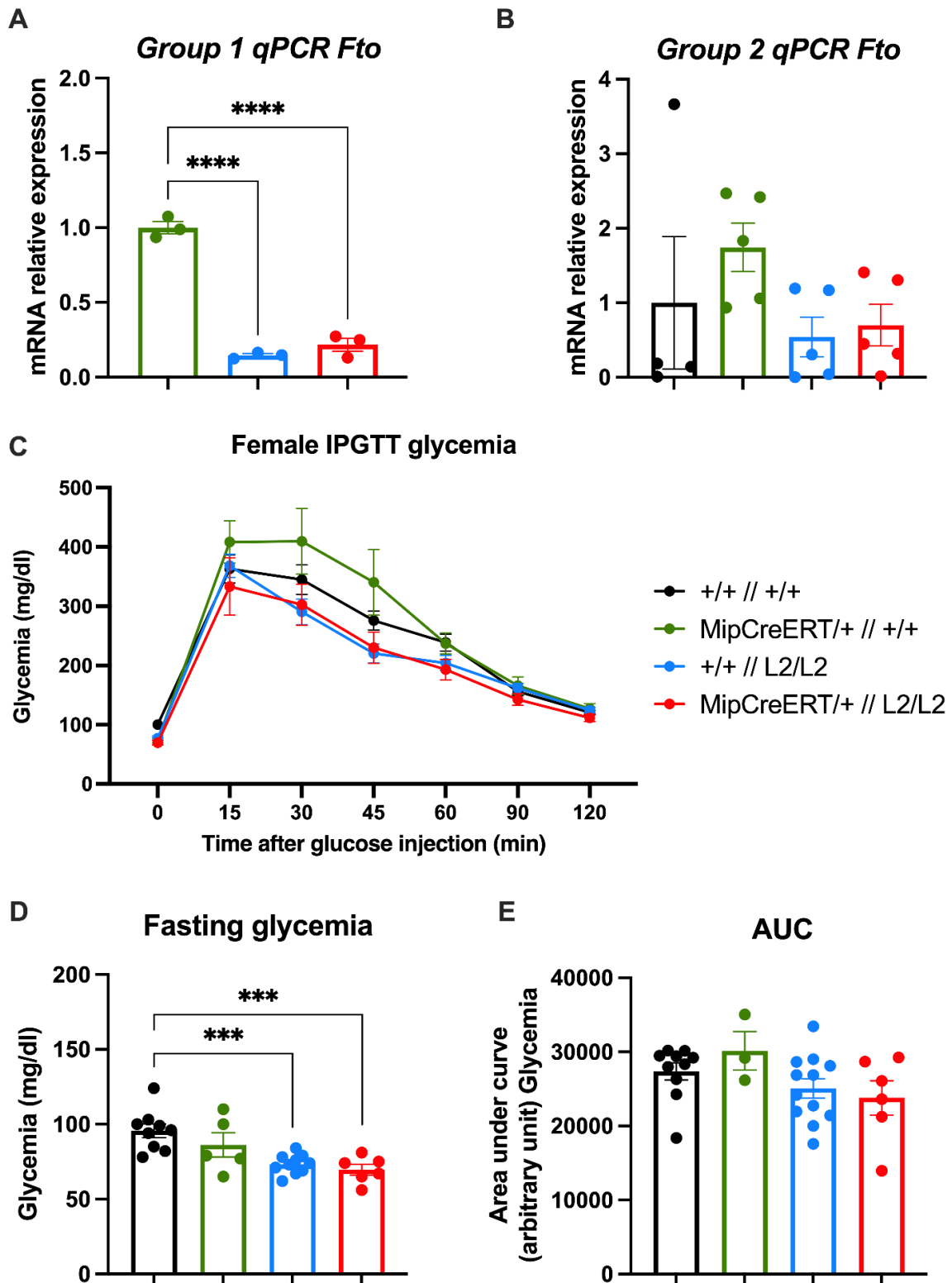
Les îlots de souris injectées avec du tamoxifène ont été isolés afin de tester l'efficacité de l'extinction de l'expression du gène *Fto* dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Pour cela, différents génotypes ont été utilisés : les souris sauvages ne possédant pas de gène *Fto* floxé et de Cre recombinase (génotype  $+/+ // +/+$ ), les souris exprimant uniquement la Cre sous le contrôle du

promoteur Mip inducible (génotype MipCreERT/+ // +/+), les souris possédant uniquement le gène *Fto* floxé pour l'exon 3 (génotype +/+ // L2/L2) et les souris possédant l'exon 3 floxé pour le gène *Fto* et exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Mip inducible (génotype MipCreERT/+ // L2/L2). Parmi ces souris, seules celles ayant pour génotype MipCreERT/+ // L2/L2 doivent montrer une perte d'expression de la déméthylase FTO suite à la perte de l'exon 3 induit par la recombinaison de la Cre recombinase après traitement au tamoxifène.

Les premières expériences ont été réalisées sur des femelles, un mois après l'injection de tamoxifène. Les résultats obtenus sur 2 lots différents de souris femelles injectées au tamoxifène (Figure 54) montrent pour le lot 1 (Figure 54A) une diminution significative de l'expression de *Fto* sur les souris floxées (+/+ // L2/L2) et les souris floxées exprimant la Cre recombinase (MipCreERT/+ // L2/L2) lorsqu'on les compare aux souris exprimant uniquement la Cre recombinase (MipCreERT/+ // +/+). Cette diminution est identique entre les 2 génotypes de souris. Pour le lot 2 (Figure 54B), les valeurs obtenues pour chaque souris sont très différentes les unes des autres et ne permettent pas d'obtenir des résultats significatifs. Toutefois les souris L2/L2 et MipCreERT L2/L2 montrent toujours des valeurs très proches. Il semble donc que les souris possédant uniquement le gène *Fto* avec l'exon 3 floxé soit également invalidées, de la même manière que les souris exprimant la Cre recombinase et l'exon 3 floxé du gène *Fto*.

Avant sacrifice pour étudier l'efficacité de l'invalidation génique, ces souris ont été soumises à un test métabolique par injection intrapéritonéale de glucose (IPGTT) afin d'étudier l'effet de l'invalidation de *Fto* sur la régulation de la glycémie par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Les souris ont ainsi été injectées avec 2g/kg de glucose afin de suivre l'évolution de la glycémie au cours du temps (Figure 54C). Lorsque l'on étudie la glycémie des différents génotypes de souris après une mise à jeun de 16h (Figure 54D), on observe une diminution de la glycémie à jeun pour les souris invalidées MipCreERT/+ // L2/L2 mais également pour les souris +/+ // L2/L2. Le suivi de la glycémie et la quantification de l'aire sous la courbe (Figure 54C et E) ne montrent pas de différences significatives entre les différents génotypes. Toutefois les souris +/+ // L2/L2 ont une glycémie au cours du temps similaires aux souris MipCreERT/+ // L2/L2 invalidées pour le gène *Fto*.

D'après nos résultats les souris femelles possédant uniquement le gène *Fto* floxé et qui n'expriment pas la Cre recombinase ont un phénotype similaire aux souris femelles invalidées pour le gène *Fto*.



**Figure 54 : Test métabolique et étude de l'expression de Fto dans les îlots de souris invalidées femelles.**

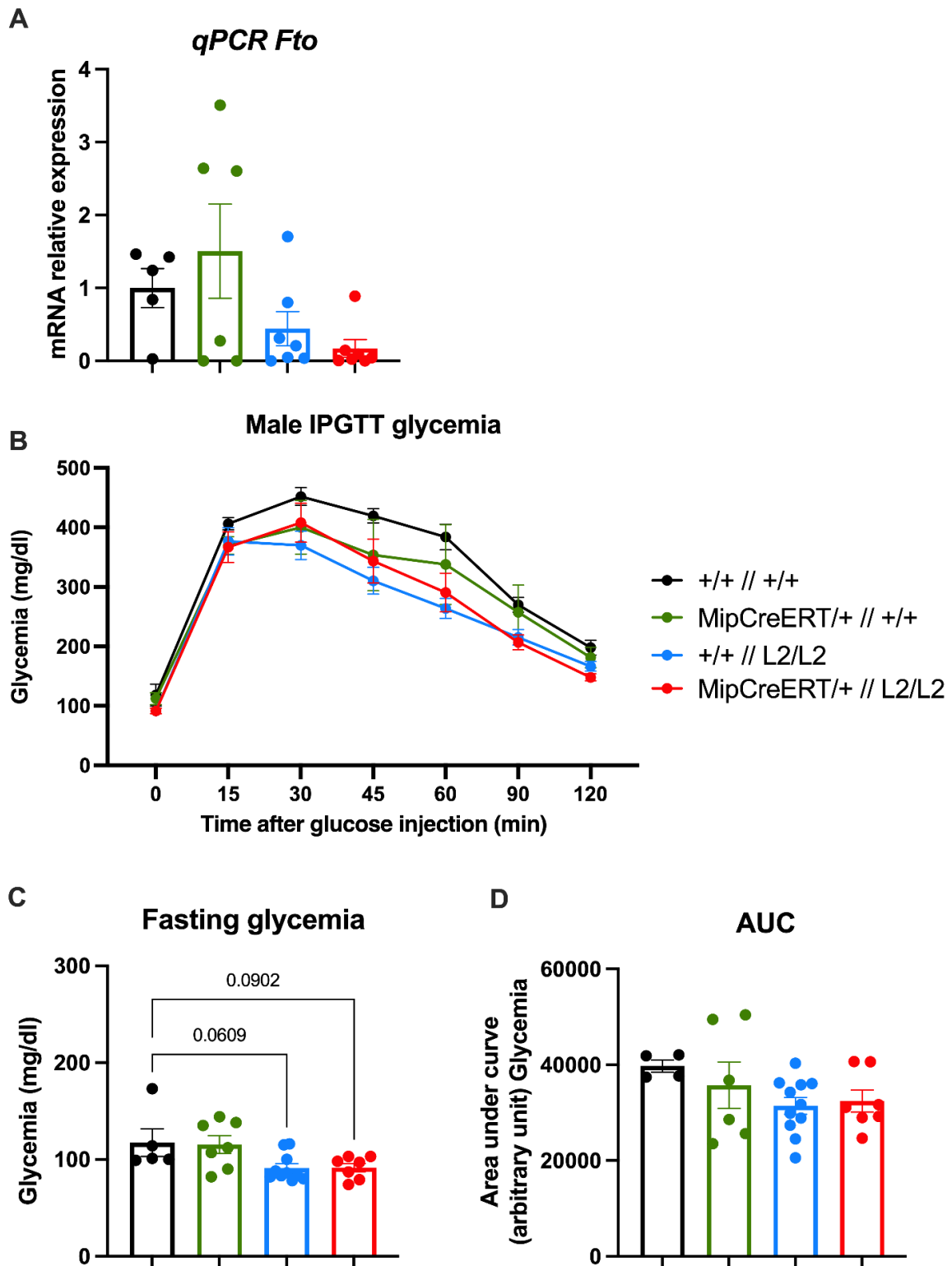
(A et B) Etude d'expression de Fto par qPCR dans les îlots de souris contrôles et invalidées pour le lot 1 et 2. (C) Suivi de la glycémie après injection intrapéritonéale de 2g/kg de glucose dans les souris contrôles et souris invalidées pour Fto. (D) Glycémie à jeun avant injection de glucose (E) Valeur des aires sous la courbe du suivi de la glycémie. Les données sont analysées par one-way ANOVA. \*\*\*  $p < 0,005$  ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

Des souris mâles avec les mêmes génotypes ont également été étudiées afin de s'affranchir des effets liés aux hormones sexuelles (Figure 55).

Malgré des résultats non significatifs à cause d'une variabilité trop importante dans les échantillons, les qPCR effectuées sur les ARN d'îlots isolés montrent, comme les résultats précédents, une diminution d'expression de *Fto* similaire entre les souris MipCreERT/+ // L2/L2, invalidées pour *Fto* et les souris +/+ // L2/L2, qui ne sont normalement pas invalidées, due à l'absence de la Cre recombinase (Figure 55A). Lors du suivi de la glycémie en IPGTT (Figure 55B), les souris mâles ne montrent pas non plus de différences significatives entre les différents génotypes. Même si les différences de glycémie à jeun ne sont pas non plus significatives (Figure 55C), les résultats observés entre les souris MipCreERT/+ // L2/L2 et les souris +/+ // L2/L2 montrent une tendance à la diminution avec des valeurs proches. De la même manière, les valeurs des aires sous la courbe n'ont pas de différences significatives (Figure 55D), mais les génotypes de souris MipCreERT/+ // L2/L2 et +/+ // L2/L2 ont également des valeurs très similaires.

En conclusion, quel que soit le sexe des souris, ce modèle ne semble pas valide pour être utilisé dans des expériences *in vivo* puisque les souris portant uniquement le gène *Fto* floxé semblent également être invalidées, tout comme les souris MipCreERT *Fto*-Flox. La présence des séquences LoxP sur le locus *Fto* semble donc entraîner une invalidation du gène, indépendamment de la recombinaison par l'enzyme Cre Recombnase.

Dans l'état, les souris MipCreERT *Fto*-Flox ne sont donc peut-être pas invalidées de manière tissu spécifique et inductible, mais correspondraient plutôt à une invalidation globale du gène *Fto*, dans tous les tissus.



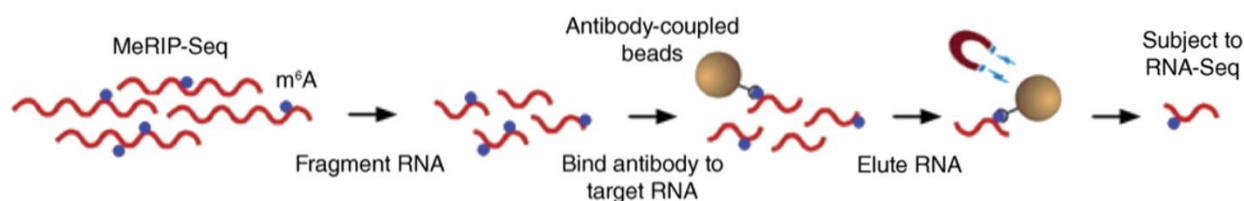
**Figure 55 : Test métabolique et étude de l'expression de *Fto* dans les îlots de souris invalidées mâles.**

(A) Etude d'expression de *Fto* par qPCR dans les îlots de souris contrôles et invalidées. (B) Suivi de la glycémie après injection intrapéritonéale de 2g/kg de glucose dans les souris contrôles et souris invalidées pour *Fto*. (C) Glycémie à jeun avant injection de glucose (D) Valeur des aires sous la courbe du suivi de la glycémie. Les données sont analysées par one-way ANOVA.

## B. Mise en place d'un protocole d'immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A pour séquençage ARN

Afin d'étudier les ARNm cibles de la méthylation m<sup>6</sup>A au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique et détecter d'éventuels variations de méthylation entre les différents traitements, nous avons mis en place, au cours de ce travail de thèse, un protocole d'immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A.

La méthylation m<sup>6</sup>A est immunoprécipitée à partir d'ARN fragmentés puis les ARN méthylés sont élués pour être soumis à un séquençage ARN (Figure 56). Avant cette étape, nous avons vérifié l'efficacité de l'immunoprécipitation en réalisant des qPCR sur des ARNm cibles, connus comme étant les cibles de la méthylation m<sup>6</sup>A.



**Figure 56 : Etapes de l'immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A pour séquençage des ARN méthylés.**

Les ARN méthylés ou non méthylés sont fragmentés puis immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-m<sup>6</sup>A couplés à des billes magnétiques. Les ARN élués sont ensuite séquençés afin d'identifier les cibles de la méthylation m<sup>6</sup>A et les variations de méthylation selon les conditions expérimentales (Adapté de Meyer et al., 2012).

Parmi les ARNm identifiés dans la littérature comme étant méthylés au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique, on retrouve l'ARNm de l'insuline et du facteur de transcription *MafA* (Lei et al., 2021; Wang et al., 2020). Nous avons donc utilisé ces ARNm afin de tester l'efficacité de notre protocole.

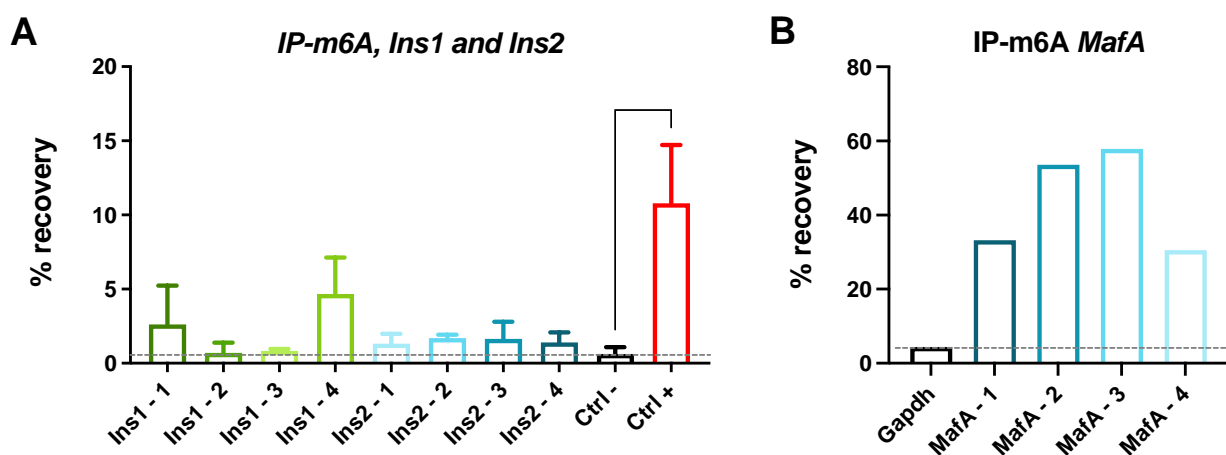
Dans un premier temps, nous avons testé notre protocole d'immunoprécipitation sur l'ARNm de l'insuline en utilisant des ARNm exogènes comme contrôles, avec un ARNm non méthylé (Ctrl -) et un ARNm contenant des résidus d'adénosines méthylés en position N6 (Ctrl +) (Figure 57A).

Après amplification par PCR, nous observons une différence significative entre le contrôle positif et négatif montrant que le protocole d'immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A fonctionne. Pour l'amplification de l'ARNm des gènes *Ins1* et *Ins2*, 4 paires d'oligonucléotides ont été utilisées ciblant chacune une région différente de l'ARN. Les résultats obtenus ne sont pas significatifs mais les données proviennent de deux échantillons seulement.

Toutefois, nous pouvons observer des valeurs supérieures à celle du contrôle négatif pour certaines paires d'oligonucléotides amplifiant *Ins1* et *Ins2*, atteignant jusqu'à 5 % d'ARN récupérés par rapport à l'échantillon de départ.

Nous avons également étudié la méthylation de l'ARNm de *MafA* après immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A (Figure 57B). L'ARNm de la *Gapdh*, identifié comme étant non méthylé dans la cellule  $\beta$  pancréatique, est utilisé comme contrôle négatif (Wang et al., 2020). Ces données préliminaires correspondent à l'étude d'un seul échantillon, à l'aide de 4 paires d'oligonucléotides qui amplifient des régions différentes de l'ARNm de *MafA*. On observe toutefois que le pourcentage d'ARN récupérés par rapport à l'échantillon de départ est plus important que pour *Ins1* et *Ins2*, avec des valeurs pouvant atteindre 60%, et dépasse largement le résultat obtenu pour l'ARNm de *Gapdh*.

Le protocole mis en place semble donc être validé mais des expériences supplémentaires avec un plus grand nombre d'échantillons sont nécessaires afin de confirmer ces résultats. Ils permettront par la suite d'effectuer un séquençage des ARN immunoprécipités et d'identifier les cibles et les éventuelles variations de la méthylation m<sup>6</sup>A selon les conditions expérimentales.



**Figure 57 : Immunoprécipitation de la méthylation m<sup>6</sup>A et qPCR des ARNm de *Ins1*, *Ins2* et *MafA* des cellules Min6.** Les ARN méthylés ou non méthylés sont fragmentés puis immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-m<sup>6</sup>A couplés à des billes magnétiques. Après élution les ARN de *Ins1*, *Ins2* (A) (n=2) et *MafA* (B) (n=1) sont rétrotranscrits et amplifiés par PCR pour étudier leur méthylation. Les données sont analysées par one-way ANOVA. \*\* p<0,005.



## Discussion et Perspectives

En parallèle d'un autre laboratoire (De Jesus et al., 2019), notre équipe a pu mettre en évidence une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les îlots pancréatiques issus de patients diabétiques. Nous avons également démontré qu'un régime diabétogène chez la souris induisait un stress métabolique associé à une perte de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les îlots pancréatiques. Ces données suggèrent donc que le statut diabétique pourrait contribuer à l'altération de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les îlots pancréatiques et, possiblement, dans les cellules β, éléments clés de la régulation glycémique par la sécrétion d'insuline.

Au cours du diabète de type 2, l'environnement glucolipotoxique joue un rôle majeur dans le dysfonctionnement et la perte de masse des cellules β pancréatiques. Nous avons émis l'hypothèse que la méthylation m<sup>6</sup>A pourrait intervenir dans la régulation de l'expression des gènes clés de l'identité et de la fonction des cellules β pancréatiques lors de différents stress. Pour cela, nous avons utilisé différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* afin de comprendre l'implication de la méthylation m<sup>6</sup>A au cours d'un stress et, plus particulièrement, en cas d'augmentation de la concentration en glucose ou en acide gras libres.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN, en présence de concentration importante en glucose, dans une lignée de cellules β pancréatiques et l'îlot pancréatique pendant un traitement court de 1 à 3h. Cette diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A pourrait être due à l'augmentation d'expression des déméthylases et à un changement de leur localisation, comme observé précédemment pour la protéine ALKBH5, dont l'expression est augmentée dans le noyau. Un traitement plus long de 72h à des concentrations élevées en glucose induit également une augmentation de l'expression des déméthylases.

De manière intéressante, la perte de méthylation m<sup>6</sup>A est également observée les îlots pancréatiques de patients diabétiques. De plus, des données de la littérature montre également, dans des échantillons de sang humains issus de patients diabétiques, une augmentation d'expression de la déméthylase FTO corrélée à l'augmentation de la glycémie et associée à une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A (Shen et al., 2015; Yang et al., 2019b).

La présence de palmitate associé à des concentrations en glucose élevées conduit à un effet inverse avec une augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A et une diminution de l'expression des déméthylases dans les cellules β pancréatiques et l'îlots.

Ces données suggèrent que la diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les îlots pancréatiques humains au cours du diabète de type 2 pourrait être principalement médiée par le glucose, avec un effet moindre du palmitate sur la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A.

De par la mise en place de la technique de m<sup>6</sup>A-seq, il serait intéressant d'identifier les cibles de la méthylation m<sup>6</sup>A dans la cellule  $\beta$  suite à une augmentation de la concentration en glucose et palmitate. Ces résultats permettraient également de déterminer si ces conditions entraînent des changements de méthylation d'ARN identiques ou différents et d'identifier ainsi les voies métaboliques directement impactées par ces variations. Ces données, comparées aux données obtenues d'îlots pancréatiques issus de patients diabétiques et non diabétiques, permettraient de mieux comprendre l'implication de la glucotoxicité et lipotoxicité dans le développement du diabète de type 2.

Il est également important de déterminer le rôle des autres types cellulaires de l'îlot dans les variations de la méthylation m<sup>6</sup>A observées au cours du diabète de type 2. Pour cela, nous avons notamment étudié les effets du palmitate et du glucose sur une lignée de cellules  $\alpha$  pancréatiques. Nos données préliminaires montrent une augmentation de l'expression de la déméthylase FTO, mais également de la méthyltransférase METTL3. Ces variations d'expression suggèrent que la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules  $\alpha$  est également impactée par un environnement glucolipotoxique. Néanmoins, ces données sont très préliminaires et des expériences complémentaires, comme le dosage de la méthylation m<sup>6</sup>A, sont nécessaires afin d'approfondir le rôle de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les cellules  $\alpha$  et l'îlot pancréatique au cours du diabète de type 2.

Bien que la fonction des déméthylases ALKBH5 et FTO soit encore peu connue dans la cellule  $\beta$  pancréatique, de récentes études ont pu montrer que les méthyltransférases METTL3 et METTL14 pouvaient avoir un rôle clés dans la cellule  $\beta$  et l'îlot pancréatique (De Jesus et al., 2019; J. Liu et al., 2019; Men et al., 2019; Y. Wang et al., 2020). Afin de mieux comprendre le rôle de ces enzymes, nous avons étudié les effets de l'inhibition de leurs expressions dans la lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques Min6, par l'utilisation de siRNA. L'utilisation de siRNAs dirigés contre la méthyltransférase METTL3 induit une diminution de l'expression de *Foxo1* et *MafA*, deux facteurs de transcription impliqués dans le maintien de l'identité de la cellule  $\beta$ , associée à l'augmentation de l'expression de *Glut2*, impliqué dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. La méthyltransférase METTL3, par la méthylation m<sup>6</sup>A de l'ARN, semble réguler positivement l'expression des gènes clés de la cellule  $\beta$  pancréatique.

Des études récentes suggèrent également que les méthyltransférases régulent la voie Insuline/IGF1-AKT-PDX1 (IGF1 : Insulin-like growth factor 1, AKT : Protein kinase B). En effet, l'extinction des méthyltransférases induit une hypométhylation de la majorité des ARNm codant les protéines impliquées dans cette voie, et conduit à une altération de la prolifération des cellules  $\beta$  et une diminution de la sécrétion d'insuline, comme lors du diabète de type 2 (De Jesus et al., 2019).

Nous avons également pu mettre en évidence que l'utilisation de siRNA contre les déméthylases induisait une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la fonction des cellules  $\beta$  pancréatique, notamment les gènes *Gck*, *Glut2* et *Kir6.2* associée à une augmentation de l'expression des gènes comme *Pax4*, un facteur de transcription impliqué dans la régulation transcriptionnelle et l'identité des cellules  $\beta$  pancréatiques. Les déméthylases pourraient jouer un rôle clés dans l'inhibition de l'expression de gènes de l'identité cellulaire et dans la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques. Il serait intéressant d'effectuer un séquençage des ARN après transfection des siRNA (ou utilisation de la technologie Crispr-Cas9) afin d'identifier l'ensemble des cibles de chacune des déméthylases et comprendre le rôle de ces enzymes dans la régulation de l'expression génique au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques.

De plus, nos résultats montrent que l'inactivation de *Fto* par siRNA induit également une faible augmentation de la sécrétion d'insuline. Afin d'étudier plus particulièrement le rôle de la déméthylase FTO dans la sécrétion d'insuline, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique, le bisantrene, qui empêche l'interaction de FTO avec l'ARN. Nos résultats montrent, à la fois dans les cellules  $\beta$  et l'îlot pancréatique, une augmentation importante de la sécrétion d'insuline après stimulation au glucose. Ces données suggèrent que la déméthylase FTO pourrait également être impliquée dans la régulation négative de la sécrétion d'insuline. L'expression de *Fto* étant augmentée au cours du diabète de type 2 et corrélée à une augmentation de la glycémie, son inhibition pourrait donc contribuer à réguler l'homéostasie du glucose (Shen et al., 2015; Yang et al., 2019b).

Le gène *Fto* est un gène de prédisposition à l'obésité et au diabète de type 2 (Dina et al., 2007). Chez la souris, l'inactivation de la déméthylase dans le tissu adipeux blanc induit une augmentation de catabolisme des lipides associée à une diminution de la masse grasse et une augmentation du métabolisme glucidique (Church et al., 2009). Une surexpression provoque, à l'inverse, une augmentation de la prise alimentaire et de la masse grasse (Church et al., 2010).

Chez l'Homme, un variant présent dans la première région intronique de *FTO* conduit également à une augmentation de la prise alimentaire, causée par une augmentation de l'expression de la déméthylase. En effet, la diminution de la méthylation de l'ARNm de la ghréline, une hormone orexigène, provoque une augmentation de son expression causée par la déméthylase FTO (Karra et al., 2013).

Chez la souris, l'expression de la déméthylase FTO dans le foie est positivement corrélée à l'expression de gènes impliqués dans la gluconeogenèse (Poritsanos et al., 2010). En effet, l'inactivation de *Fto* entraîne une diminution d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (Peng et al., 2019), dont ceux intervenant dans la voie de la néoglucogenèse, comme la *G6PC*. FTO module également l'expression du facteur de transcription FOXO1 dans les hépatocytes par déméthylation de l'ARNm, FOXO1 étant notamment impliqué dans la régulation transcriptionnelle des voies métaboliques hépatiques (Zhang et al., 2006).

D'après nos résultats et les données de la littérature, la déméthylase FTO semble donc jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme. Il était donc intéressant de développer un modèle murin invalidé pour *Fto* spécifiquement dans les cellules  $\beta$  afin d'étudier *in vivo* le rôle de cette enzyme dans la cellule  $\beta$  pancréatique et l'homéostasie énergétique. Cependant, les premiers résultats obtenus semblent montrer que le modèle utilisé n'est pas valide puisque les souris possédant le gène *Fto* floxé sur l'exon 3, exprimant ou non la Cre recombinase, ont un phénotype très similaire aux souris possédant à la fois le gène floxé et la Cre recombinase, avec une expression de la déméthylase identique entre ces deux génotypes. À ce stade, bien que nous n'ayons pas d'explication quant à la délétion du locus *Fto* en absence d'expression de la Cre recombinase, nous pouvons supposer que la construction permettant d'intégrer les sites loxP rendent les allèles de *Fto* hypomorphes, ce qui pourrait expliquer la diminution d'expression de *Fto* en absence de Cre recombinase.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse semble montrer que l'environnement des cellules  $\beta$  pancréatiques peut influencer la méthylation  $m^6A$  et l'expression génique. Un environnement gluco- et/ou lipotoxique, retrouvé au cours du diabète de type 2, induit des variations d'expression des méthyltransférases et déméthylases, altérant la méthylation  $m^6A$  des ARN. La méthylation  $m^6A$  joue donc un rôle crucial dans la régulation de la physiologie des cellules  $\beta$  pancréatiques, et une altération des enzymes régulatrices (méthyltransférases et/ou déméthylases) peut avoir un effet physiopathologique et conduire au développement de maladies métaboliques comme le diabète de type 2.

Toutefois, d'autres questions restent en suspens, notamment l'identification de l'intermédiaire entre les variations de concentrations en glucose et la modification d'expression de déméthylases et/ou méthyltransférases. Ces variations d'expression pourraient être médiées par le facteur de transcription CHREBP (Carbohydrate response element binding protein), décrit comme un senseur du glucose (pour revue, voir Ortega-Prieto & Postic, 2019). En effet, son expression et sa translocation dans le noyau sont augmentées en présence d'une concentration élevée de glucose et au cours du diabète de type 2 (Poungvarin et al., 2012). En conditions glucotoxiques, CHREBP induit, dans un modèle de lignée de cellule  $\beta$  pancréatique, une diminution de l'expression de l'insuline couplée à une perte de sécrétion, également observée lors de l'inactivation des méthyltransférases dans les cellules  $\beta$  chez la souris (De Jesus et al., 2019; Liu et al., 2019; Wang et al., 2020). Des données préliminaires, obtenues dans notre laboratoire, semblent montrer une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A dans les îlots pancréatiques de souris invalidées de manière globale pour *Chrebp*. CHREBP pourrait donc être impliquée dans la régulation de la méthylation m<sup>6</sup>A, néanmoins ces résultats reposent sur un nombre faible de souris et nécessitent des expérimentations supplémentaires.

La méthylation m<sup>6</sup>A étant sensible aux conditions gluco- et lipotoxiques à travers des modifications de l'expression des méthyltransférases et déméthylases, il est également possible que l'expression des enzymes m<sup>6</sup>A soit altérée par les différents stress induits par un environnement glucolipotoxique.

Un traitement avec les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IFN- $\alpha$  induit une augmentation de la méthylation m<sup>6</sup>A dans des îlots pancréatiques humains associée à l'augmentation d'expression de la méthyltransférase METTL3 (De Jesus et al., 2021). De plus, les données obtenues de m<sup>6</sup>A-seq sur des îlots pancréatiques humains traités montrent que les ARN méthylés sont notamment impliqués dans la réponse immunitaire innée mais également dans la voie de signalisation de l'apoptose. L'altération de l'expression des enzymes m<sup>6</sup>A pourrait être médiée par l'inflammation, qui peut également être régulée par la méthylation m<sup>6</sup>A. La méthylation m<sup>6</sup>A peut également intervenir dans le stress du réticulum endoplasmique. L'inactivation de la méthyltransférase METTL14 dans les îlots pancréatiques de souris induit une augmentation d'expression à la fois des ARN et des protéines de *Ire-1a* et *Xbp1*, impliquées dans la voie transcriptionnelle du stress du réticulum endoplasmique (Men et al., 2019).

Enfin, nous pouvons spéculer que les protéines « readers » qui reconnaissent et se fixent à la méthylation m<sup>6</sup>A de l'ARN pourraient également jouer un rôle dans la physiologie des cellules  $\beta$

ou avoir un effet physiopathologique lors du développement du diabète de type 2. En effet, l'inactivation dans les cellules  $\beta$  du gène codant pour la protéine reader IGF2BP2 conduit, par exemple, à une diminution de la sécrétion d'insuline chez la souris et une prolifération réduite des cellules  $\beta$  lors de la phase de compensation induite par un régime riche en graisse (HFD).

IGF2BP2 régule la sécrétion et la prolifération des cellules  $\beta$  en se fixant sur l'ARNm méthylé de *Pdx1*, ce qui améliore sa traduction (Regué et al., 2021). Ces données montrent que les protéines « readers » peuvent également impacter la physiologie et physiopathologie des cellules  $\beta$  pancréatiques.

# Conclusion générale

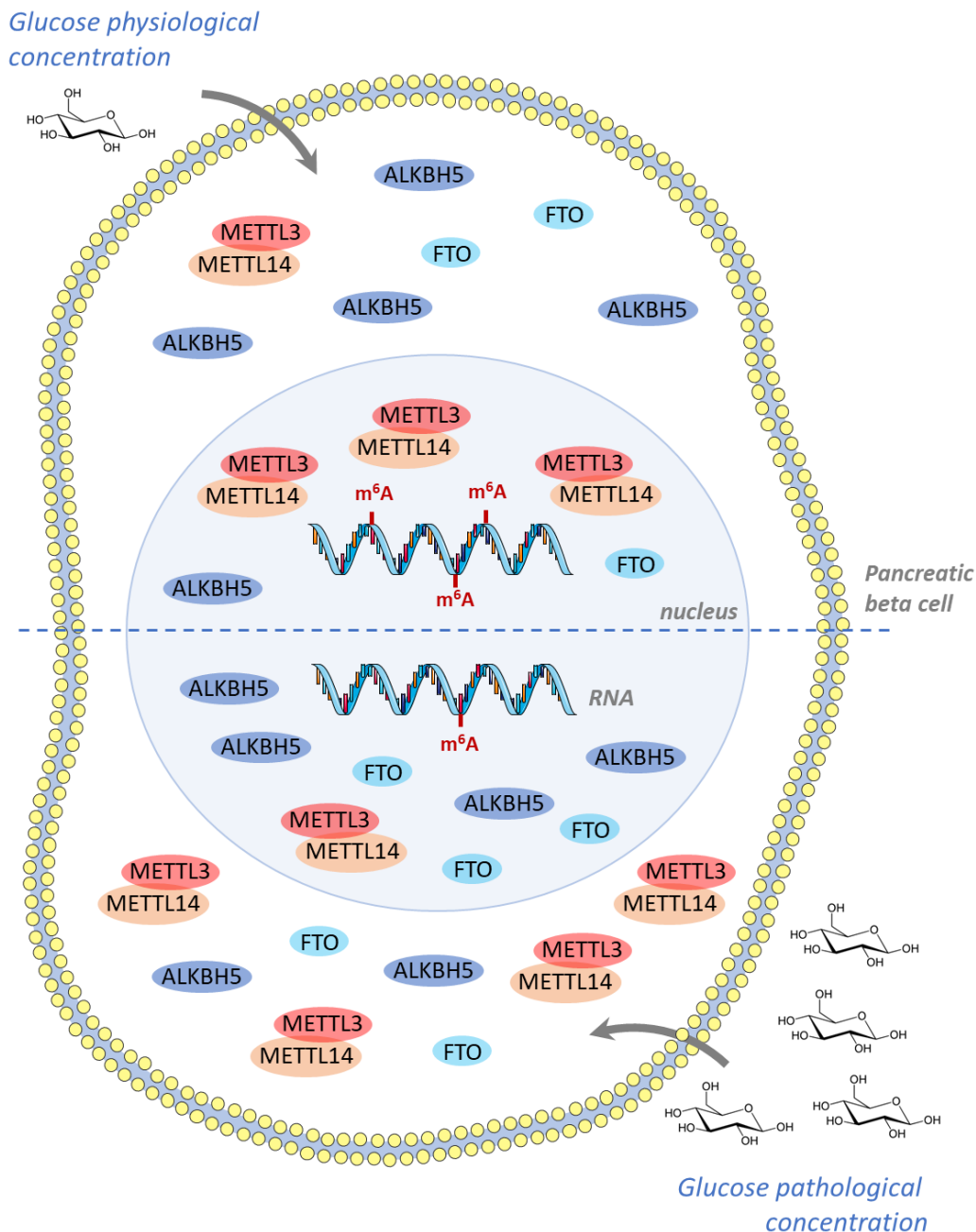
Nos résultats ont permis de montrer une diminution de la méthylation m6A dans des îlots pancréatiques murins et humains diabétiques. Un environnement glucolipotoxique, comme lors du diabète de type 2, semble donc conduire à des variations de la méthylation m6A qui pourraient altérer de l'expression de gènes clés de la cellule bêta pancréatique et sa fonction principale qu'est la sécrétion d'insuline.

Nous avons donc étudié, dans un premier temps, les effets d'une concentration importante en glucose et palmitate dans un modèle cellulaire de cellules bêta pancréatiques et dans des îlots pancréatiques humains. Nous avons pu montrer qu'un traitement court avec des concentrations élevées en glucose entraîne une diminution de la méthylation m6A des ARN dans la lignée de cellules bêta pancréatiques (Figure 58) et les îlots humains. Cette altération de la méthylation m6A est potentiellement causée par l'augmentation de l'expression des déméthylases ALKBH5 et FTO. À l'inverse, nos données montrent qu'un traitement long avec du palmitate associé au glucose active le stress du réticulum endoplasmique et entraîne une augmentation de la méthylation m6A dans notre modèle. La diminution d'expression des déméthylases FTO et ALKBH5, observée dans les cellules Min6 et les îlots pancréatiques humains, pourrait être à l'origine de cette augmentation de la méthylation.

Les effets observés sur la méthylation m6A des ARN dans les îlots pancréatiques au cours du diabète du type 2 pourraient donc être principalement médiés par le glucose, avec un effet moindre du palmitate. Ainsi, ces résultats mettent en lumière les possibles interactions entre la méthylation m6A des ARN dans les cellules bêta pancréatiques et l'environnement, au cours de variations de la glycémie.

Dans un second temps, l'utilisation de siRNA et d'inhibiteurs pharmacologiques a permis de déterminer le rôle des déméthylases et méthyltransférase au sein de la cellule bêta pancréatique (Figure 59). Nos résultats semblent montrer, dans les cellules Min6, un effet positif de la méthyltransférase METTL3 sur l'expression des gènes clés de la cellule bêta pancréatique. Les déméthylases, au contraire, modulent négativement l'expression de ces gènes, notamment la déméthylase FTO, qui affecte également la sécrétion d'insuline. L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique de la déméthylase semble confirmer ces résultats, avec une augmentation importante de la sécrétion d'insuline en présence de l'inhibiteur de FTO.

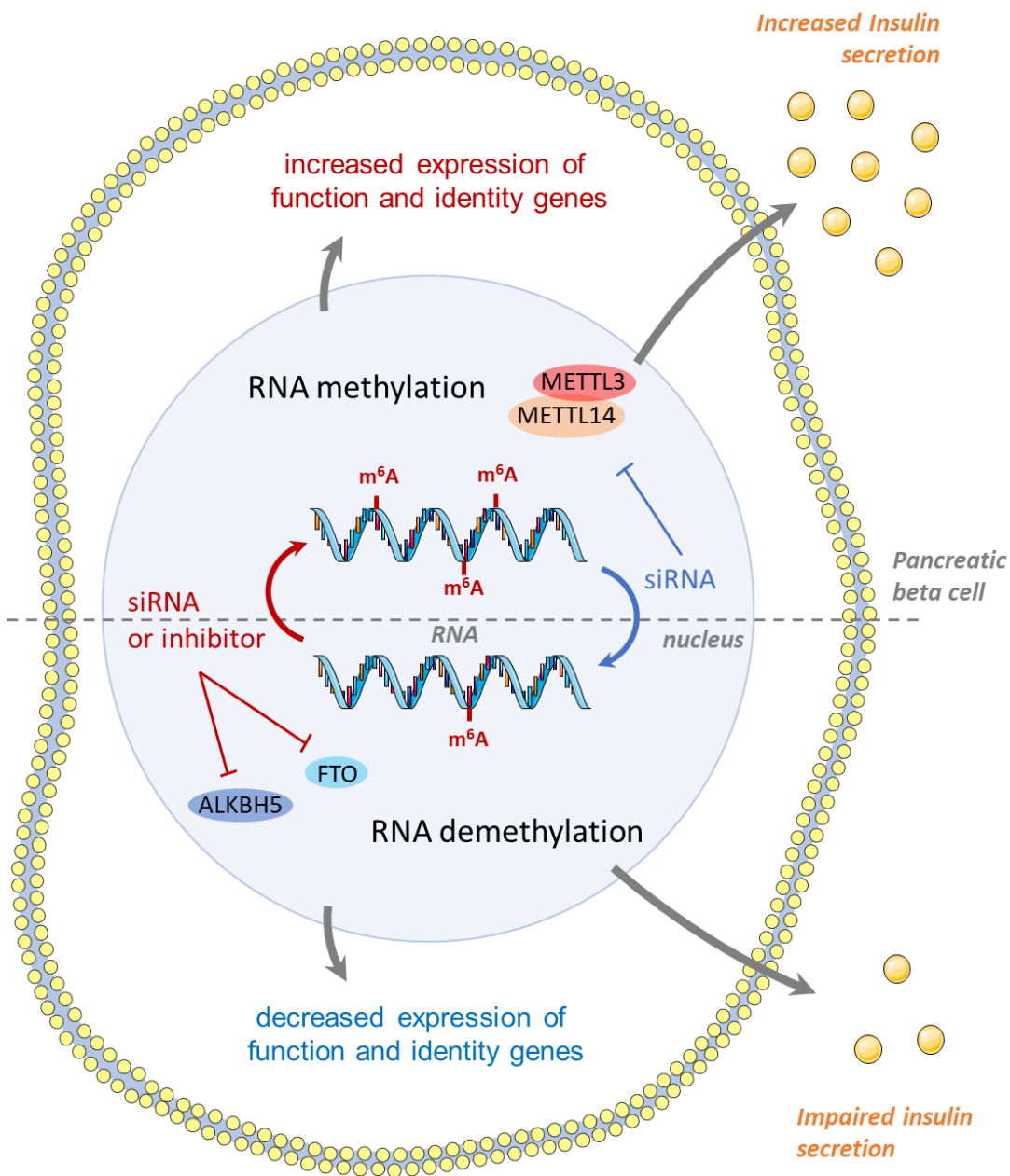
Bien que des expériences complémentaires soient nécessaires, nos données suggèrent que la déméthylase FTO pourrait jouer un rôle crucial dans le développement du diabète de type 2. Ainsi, son inhibition permettrait de contrer la perte de méthylation m<sup>6</sup>A des ARN et améliorerait donc l'expression des gènes impliqués dans le maintien de l'identité et de la fonction des cellules bêta pancréatiques, dont la sécrétion d'insuline



**Figure 58 : Les variations de concentrations en glucose impactent la méthylation m<sup>6</sup>A ainsi que l'expression et la localisation des enzymes dans les cellules β pancréatiques.**

Des concentrations importantes en glucose augmente l'expression des méthyltransférases et déméthylases et affectent leur localisation. La méthyltransférase METTL3, qui est principalement nucléaire, augmente au niveau du cytoplasme, alors que la déméthylase ALKBH5, qui est plutôt cytoplasmique, augmente au niveau du noyau, lieu principal de la méthylation et déméthylation de l'ARN. Ces variations sont associées à une diminution de la méthylation m<sup>6</sup>A des ARN (Figures issues de Servier Medical Art).





**Figure 59 : Rôles des méthyltransférases et déméthylases dans la fonction et l'identité des cellules  $\beta$  pancréatiques.** L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de siRNA dirigés contre les déméthylases ALKBH5 et FTO a entraîné une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'identité et la fonction des cellules  $\beta$  associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Ainsi ces 2 enzymes semblent avoir un effet repressur sur l'expression de ces gènes et la sécrétion d'insuline. A l'inverse l'utilisation de siRNA dirigé contre la méthyltransférase METTL3 a entraîné une diminution d'expression des gènes de l'identité et de la fonction indiquant un rôle positif de l'enzyme sur l'expression de ces gènes dans la cellule  $\beta$ .

# Références

- Aguilo, F., Li, S., Balasubramanian, N., Sancho, A., Benko, S., Zhang, F., Vashisht, A., Rengasamy, M., Andino, B., Chen, C.-H., Zhou, F., Qian, C., Zhou, M.-M., Wohlschlegel, J. A., Zhang, W., Suchy, F. J., & Walsh, M. J. (2016). Deposition of 5-Methylcytosine on Enhancer RNAs Enables the Coactivator Function of PGC-1 $\alpha$ . *Cell Reports*, *14*(3), 479-492. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.043>
- Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., Suzuki, T., Nishimasu, H., Ishitani, R., Sugita, A., Hirose, Y., Iwasaki, S., Nureki, O., & Suzuki, T. (2019). Cap-specific terminal N 6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science (New York, N.Y.)*, *363*(6423), eaav0080. <https://doi.org/10.1126/science.aav0080>
- Alarcón, C. R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., & Tavazoie, S. F. (2015). HNRNPA2B1 is a mediator of m6A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, *162*(6), 1299-1308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.011>
- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyl-adenosine (m6A) marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*(7544), 482-485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>
- Alibegovic, A. C., Sonne, M. P., Højbjerg, L., Bork-Jensen, J., Jacobsen, S., Nilsson, E., Faerch, K., Hiscock, N., Mortensen, B., Friedrichsen, M., Stallknecht, B., Dela, F., & Vaag, A. (2010). Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *299*(5), E752-763. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00590.2009>
- Amos, H., & Korn, M. (1958). 5-Methyl cytosine in the RNA of Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta*, *29*(2), 444-445. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90214-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(58)90214-2)
- Amo-Shiinoki, K., Tanabe, K., Hoshii, Y., Matsui, H., Harano, R., Fukuda, T., Takeuchi, T., Bouchi, R., Takagi, T., Hatanaka, M., Takeda, K., Okuya, S., Nishimura, W., Kudo, A., Tanaka, S., Tanabe, M., Akashi, T., Yamada, T., Ogawa, Y., ... Tanizawa, Y. (2021). Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes. *JCI Insight*, *6*(1). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143791>
- Anderson, J. T., & Droogmans, L. (2005). Biosynthesis and function of 1-methyladenosine in transfer RNA. In H. Grosjean (Éd.), *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing* (p. 121-139). Springer. <https://doi.org/10.1007/b106364>
- Araújo, T. M. de, & Velloso, L. A. (2020). Hypothalamic IRX3 : A New Player in the Development of Obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *31*(5), 368-377. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.01.002>
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., & Nakao, K. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *86*(10), 4753-4758. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7885>
- Ashford, M. L. J., Boden, P., & Treherne, J. (2004). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pflügers Archiv*. <https://doi.org/10.1007/BF00373626>

- Behboudi-Gandevani, S., Amiri, M., Bidhendi Yarandi, R., & Ramezani Tehrani, F. (2019). The impact of diagnostic criteria for gestational diabetes on its prevalence : A systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *11*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13098-019-0406-1>
- Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D., & Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes : A systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, *373*(9677), 1773-1779. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60731-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60731-5)
- Berchtold, L. A., Prause, M., Størling, J., & Mandrup-Poulsen, T. (2016). Chapter Five—Cytokines and Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. In G. S. Makowski (Éd.), *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 75, p. 99-158). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.02.001>
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature Medicine*, *7*(8), 947-953. <https://doi.org/10.1038/90992>
- Beyan, H., Wen, L., & Leslie, R. D. (2012). Guts, Germs, and Meals : The Origin of Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, *12*(5), 456-462. <https://doi.org/10.1007/s11892-012-0298-z>
- Bhushan, A., Itoh, N., Kato, S., Thiery, J. P., Czernichow, P., Bellusci, S., & Scharfmann, R. (2001). Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *128*(24), 5109-5117.
- Biden, T. J., Boslem, E., Chu, K. Y., & Sue, N. (2014). Lipotoxic endoplasmic reticulum stress,  $\beta$  cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(8), 389-398. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.02.003>
- Boccaletto, P., Machnicka, M. A., Purta, E., Piatkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T. K., de Crécy-Lagard, V., Ross, R., Limbach, P. A., Kotter, A., Helm, M., & Bujnicki, J. M. (2018). MODOMICS : A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D303-D307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1030>
- Boden, G. (2008). Obesity and Free Fatty Acids (FFA). *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, *37*(3), 635-ix. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.06.007>
- Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., & Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA (New York, N.Y.)*, *3*(11), 1233-1247.
- Boulias, K., Toczyłowska-Socha, D., Hawley, B. R., Liberman, N., Takashima, K., Zaccara, S., Guez, T., Vasseur, J.-J., Debart, F., Aravind, L., Jaffrey, S. R., & Greer, E. L. (2019). Identification of the m6Am Methyltransferase PCIF1 Reveals the Location and Functions of m6Am in the Transcriptome. *Molecular Cell*, *75*(3), 631-643.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.006>
- Bourgeois, G., Ney, M., Gaspar, I., Aigueperse, C., Schaefer, M., Kellner, S., Helm, M., & Motorin, Y. (2015). Eukaryotic rRNA Modification by Yeast 5-Methylcytosine-Methyltransferases and Human Proliferation-Associated Antigen p120. *PLoS One*, *10*(7), e0133321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133321>
- Brzezicha, B., Schmidt, M., Makalowska, I., Jarmolowski, A., Pienkowska, J., & Szweykowska-Kulinska, Z. (2006). Identification of human tRNA:m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA Leu (CAA). *Nucleic Acids Research*, *34*(20), 6034-6043. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl765>
- 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*(1), 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(7), 2334-2339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>
- Cámara, Y., Asin-Cayuela, J., Park, C. B., Metodiev, M. D., Shi, Y., Ruzzenente, B., Kukat, C., Habermann, B., Wibom, R., Hultenby, K., Franz, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hallberg, B. M., Gustafsson, C. M., & Larsson, N.-G. (2011). MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metabolism*, *13*(5), 527-539. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.002>
- Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *22*(2), 142-158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>
- Cao, P., Marek, P., Noor, H., Patsalo, V., Tu, L.-H., Wang, H., Abedini, A., & Raleigh, D. P. (2013). Islet amyloid : From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Letters*, *587*(8), 1106-1118. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.046>
- Cardoso, S. M., Pereira, C., & Oliveira, R. (1999). Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(1-2), 3-13. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00205-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00205-6)
- Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., & Gilbert, W. V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, *515*(7525), 143-146. <https://doi.org/10.1038/nature13802>
- Castillo-Armengol, J., Fajas, L., & Lopez-Mejia, I. C. (2019). Inter-organ communication : A gatekeeper for metabolic health. *EMBO Reports*, *20*(9), e47903. <https://doi.org/10.15252/embr.201947903>
- Cauchi, S., El Achhab, Y., Choquet, H., Dina, C., Krempler, F., Weitgasser, R., Nejjari, C., Patsch, W., Chikri, M., Meyre, D., & Froguel, P. (2007). TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups : A global meta-analysis. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *85*(7), 777-782. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0203-4>
- Chadt, A., & Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *472*(9), 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>
- Chakrabarti, S. K., James, J. C., & Mirmira, R. G. (2002). Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(15), 13286-13293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111857200>
- Chegade, J. M., Gladysz, M., & Mooradian, A. D. (2013). Dyslipidemia in type 2 diabetes : Prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs*, *73*(4), 327-339. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0023-5>
- Chen, H., Gu, L., Orellana, E. A., Wang, Y., Guo, J., Liu, Q., Wang, L., Shen, Z., Wu, H., Gregory, R. I., Xing, Y., & Shi, Y. (2020). METTL4 is an snRNA m6Am methyltransferase that regulates RNA splicing. *Cell Research*, *30*(6), 544-547. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0270-4>
- Chen, M., Wei, L., Law, C.-T., Tsang, F. H.-C., Shen, J., Cheng, C. L.-H., Tsang, L.-H., Ho, D. W.-H., Chiu, D. K.-C., Lee, J. M.-F., Wong, C. C.-L., Ng, I. O.-L., & Wong, C.-M. (2018). RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent

posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 67(6), 2254-2270.

<https://doi.org/10.1002/hep.29683>

Chen, T., Hao, Y.-J., Zhang, Y., Li, M.-M., Wang, M., Han, W., Wu, Y., Lv, Y., Hao, J., Wang, L., Li, A., Yang, Y., Jin, K.-X., Zhao, X., Li, Y., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wu, L.-G., Jiang, G., ... Zhou, Q. (2015). M6A RNA Methylation Is Regulated by MicroRNAs and Promotes Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 16(3), 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.016>

Chiang, E.-P. I., Wang, Y.-C., Chen, W.-W., & Tang, F.-Y. (2009). Effects of Insulin and Glucose on Cellular Metabolic Fluxes in Homocysteine Transsulfuration, Remethylation, S-Adenosylmethionine Synthesis, and Global Deoxyribonucleic Acid Methylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(3), 1017-1025. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2038>

Cho, S. H., Ha, M., Cho, Y. H., Ryu, J. H., Yang, K., Lee, K. H., Han, M.-E., Oh, S.-O., & Kim, Y. H. (2018). ALKBH5 gene is a novel biomarker that predicts the prognosis of pancreatic cancer : A retrospective multicohort study. *Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 22(4), 305-309. <https://doi.org/10.14701/ahbps.2018.22.4.305>

Chuang, J.-C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J. J., & Zigman, J. M. (2011). Ghrelin Directly Stimulates Glucagon Secretion from Pancreatic  $\alpha$ -Cells. *Molecular Endocrinology*, 25(9), 1600-1611. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1001>

Chujo, T., & Suzuki, T. (2012). Trmt61B is a methyltransferase responsible for 1-methyladenosine at position 58 of human mitochondrial tRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(12), 2269-2276. <https://doi.org/10.1261/rna.035600.112>

Church, C., Lee, S., Bagg, E. A. L., McTaggart, J., Deacon, R., Gerken, T., Lee, A., Moir, L., Mecinović, J., Quwailid, M. M., Schofield, C., Ashcroft, F., & Cox, R. (2009). A Mouse Model for the Metabolic Effects of the Human Fat Mass and Obesity Associated FTO Gene. *PLoS genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000599>

Church, C., Moir, L., McMurray, F., Girard, C., Banks, G. T., Teboul, L., Wells, S., Brüning, J. C., Nolan, P. M., Ashcroft, F. M., & Cox, R. D. (2010). Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nature Genetics*, 42(12), 1086-1092. <https://doi.org/10.1038/ng.713>

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. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(3), 1044-1054. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-2860>

Clausen, T. D., Mathiesen, E. R., Hansen, T., Pedersen, O., Jensen, D. M., Lauenborg, J., & Damm, P. (2008). High Prevalence of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes in Adult Offspring of Women With Gestational Diabetes Mellitus or Type 1 Diabetes : The role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care*, 31(2), 340-346. <https://doi.org/10.2337/dc07-1596>

Claussnitzer, M., Dankel, S. N., Kim, K.-H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., Glunk, V., Sousa, I. S., Beaudry, J. L., Puvion-Dran, V., Abdennur, N. A., Liu, J., Svensson, P.-A., Hsu, Y.-H., Drucker, D. J., Mellgren, G., Hui, C.-C., Hauner, H., & Kellis, M. (2015). FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *The New England journal of medicine*, 373(10), 895-907. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502214>

Cohn, W. E. (1960). Pseudouridine, a Carbon-Carbon Linked Ribonucleoside in Ribonucleic Acids : Isolation, Structure, and Chemical Characteristics. *Journal of Biological Chemistry*, 235(5), 1488-1498. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69432-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69432-3)

Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P. L., Serup, P., & Mansouri, A. (2007). Embryonic endocrine pancreas and mature  $\beta$  cells acquire  $\alpha$  and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(4), 961-970. <https://doi.org/10.1172/JCI29115>

Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sørensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., & Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development*, *17*(20), 2591-2603. <https://doi.org/10.1101/gad.269003>

Cunha, D. A., Hekerman, P., Ladrière, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M. C., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A. K., Bellomo, E., Overbergh, L., Mathieu, C., Lupi, R., Hai, T., Herchuelz, A., Marchetti, P., Rutter, G. A., Eizirik, D. L., & Cnop, M. (2008). Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of cell science*, *121*(0 14), 2308-2318. <https://doi.org/10.1242/jcs.026062>

Davis, F. F., & Allen, F. W. (1957). Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *The Journal of Biological Chemistry*, *227*(2), 907-915.

De Jesus, D. F., Zhang, Z., Brown, N. K., Hu, J., Kahraman, S., Mathews, C. E., Powers, A. C., Atkinson, M. A., Eizirik, D. L., He, C., & Kulkarni, R. (2021). 287-OR : M6A mRNA Methylation Regulates the Innate Immune Response in Human  $\beta$ -Cells. *Diabetes*, *70*(Supplement 1). <https://doi.org/10.2337/db21-287-OR>

De Jesus, D. F., Zhang, Z., Kahraman, S., Brown, N. K., Chen, M., Hu, J., Gupta, M. K., He, C., & Kulkarni, R. N. (2019). M6A mRNA Methylation Regulates Human  $\beta$ -Cell Biology in Physiological States and in Type 2 Diabetes. *Nature Metabolism*, *1*(8), 765-774. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0089-9>

Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(10), 3971-3975. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lóra, J., & Zaret, K. S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development (Cambridge, England)*, *128*(6), 871-881.

Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Körner, A., Jacobson, P., Carlsson, L. M. S., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., Delplanque, J., Vaillant, E., Pattou, F., Ruiz, J., Weill, J., Levy-Marchal, C., Horber, F., Potoczna, N., Hercberg, S., ... Froguel, P. (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nature Genetics*, *39*(6), 724-726. <https://doi.org/10.1038/ng2048>

Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, *485*(7397), 201-206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>

Dominissini, D., Nachtergaele, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Peer, E., Kol, N., Ben-Haim, M. S., Dai, Q., Di Segni, A., Salmon-Divon, M., Clark, W. C., Zheng, G., Pan, T., Solomon, O., Eyal, E., Hershkovitz, V., Han, D., Doré, L. C., Amariglio, N., Rechavi, G., & He, C. (2016). The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, *530*(7591), 441-446. <https://doi.org/10.1038/nature16998>

Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(2), 98-107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>

Dorn, L. E., Lasman, L., Chen, J., Xu, X., Hund, T. J., Medvedovic, M., Hanna, J. H., van Berlo, J. H., & Accornero, F. (2019). The N6-Methyladenosine mRNA Methylase METTL3 Controls Cardiac Homeostasis and Hypertrophy. *Circulation*, *139*(4), 533-545. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036146>

- Drolle, E., Hane, F., Lee, B., & Leonenko, Z. (2014). Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. *Drug Metabolism Reviews*, 46(2), 207-223. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.882354>
- Drucker, D. J. (2018). Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metabolism*, 27(4), 740-756. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.001>
- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J., & Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7, 12626. <https://doi.org/10.1038/ncomms12626>
- Dunn, D. B. (1961). The occurrence of 1-methyladenine in ribonucleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 46(1), 198-200. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90668-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90668-0)
- 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 Metabolism*, 15(4), 518-533. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.023>
- 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(9), 2356-2370. <https://doi.org/10.2337/db06-1650>
- Eyler, D. E., Franco, M. K., Batool, Z., Wu, M. Z., Dubuke, M. L., Dobosz-Bartoszek, M., Jones, J. D., Polikanov, Y. S., Roy, B., & Koutmou, K. S. (2019). Pseudouridylation of mRNA coding sequences alters translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(46), 23068-23074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821754116>
- Fan, H., Sakuraba, K., Komuro, A., Kato, S., Harada, F., & Hirose, Y. (2003). PCIF1, a novel human WW domain-containing protein, interacts with the phosphorylated RNA polymerase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 378-385. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)03015-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)03015-2)
- Fioramonti, X., Marsollier, N., Song, Z., Fakira, K. A., Patel, R. M., Brown, S., Duparc, T., Pica-Mendez, A., Sanders, N. M., Knauf, C., Valet, P., McCrimmon, R. J., Beuve, A., Magnan, C., & Routh, V. H. (2010). Ventromedial Hypothalamic Nitric Oxide Production Is Necessary for Hypoglycemia Detection and Counterregulation. *Diabetes*, 59(2), 519-528. <https://doi.org/10.2337/db09-0421>
- Firdous, P., Nissar, K., Ali, S., Ganai, B. A., Shabir, U., Hassan, T., & Masoodi, S. R. (2018). Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 253. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00253>
- Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J. C., & Rüther, U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature*, 458(7240), 894-898. <https://doi.org/10.1038/nature07848>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137-188. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Frayling, T. M., Timpson, N. J., Weedon, M. N., Zeggini, E., Freathy, R. M., Lindgren, C. M., Perry, J. R. B., Elliott, K. S., Lango, H., Rayner, N. W., Shields, B., Harries, L. W., Barrett, J. C., Ellard, S., Groves, C. J., Knight, B., Patch, A.-M., Ness, A. R., Ebrahim, S., ... McCarthy, M. I. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5826), 889-894. <https://doi.org/10.1126/science.1141634>

- Frederich, R. C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B. B., & Flier, J. S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice : Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine*, 1(12), 1311-1314. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1311>
- Fu, Y., Jia, G., Pang, X., Wang, R. N., Wang, X., Li, C. J., Smemo, S., Dai, Q., Bailey, K. A., Nobrega, M. A., Han, K.-L., Cui, Q., & He, C. (2013). FTO-mediated formation of N6-hydroxymethyladenosine and N6-formyladenosine in mammalian RNA. *Nature Communications*, 4, 1798. <https://doi.org/10.1038/ncomms2822>
- Furuichi, Y., LaFiandra, A., & Shatkin, A. J. (1977). 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, 266(5599), 235-239. <https://doi.org/10.1038/266235a0>
- Furuichi, Y., Morgan, M., Shatkin, A. J., Jelinek, W., Salditt-Georgieff, M., & Darnell, J. E. (1975). Methylated, blocked 5 termini in HeLa cell mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1904-1908. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1904>
- Fustin, J.-M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M. S., Kakeya, H., Manabe, I., & Okamura, H. (2013). RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*, 155(4), 793-806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.026>
- Fustin, J.-M., Kojima, R., Itoh, K., Chang, H.-Y., Ye, S., Zhuang, B., Oji, A., Gibo, S., Narasimamurthy, R., Virshup, D., Kurosawa, G., Doi, M., Manabe, I., Ishihama, Y., Ikawa, M., & Okamura, H. (2018). Two Ck1δ transcripts regulated by m6A methylation code for two antagonistic kinases in the control of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 5980-5985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721371115>
- Gao, X., Shin, Y.-H., Li, M., Wang, F., Tong, Q., & Zhang, P. (2010). The fat mass and obesity associated gene FTO functions in the brain to regulate postnatal growth in mice. *PLoS One*, 5(11), e14005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014005>
- Garcias Morales, D., & Reyes, J. L. (2021). A birds'-eye view of the activity and specificity of the mRNA m6A methyltransferase complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 12(1), e1618. <https://doi.org/10.1002/wrna.1618>
- Gerken, T., Girard, C. A., Tung, Y.-C. L., Webby, C. J., Saudek, V., Hewitson, K. S., Yeo, G. S. H., McDonough, M. A., Cunliffe, S., McNeill, L. A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A. P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I. S., Sedgwick, B., ... Schofield, C. J. (2007). The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate-Dependent Nucleic Acid Demethylase. *Science*, 318(5855), 1469-1472. <https://doi.org/10.1126/science.1151710>
- Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y. S., Ben-Haim, M. S., Eyal, E., Yunger, S., Pinto, Y., Jaitin, D. A., Viukov, S., Rais, Y., Krupalnik, V., Chomsky, E., ... Hanna, J. H. (2015). Stem cells. M6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6225), 1002-1006. <https://doi.org/10.1126/science.1261417>
- Gigova, A., Duggimpudi, S., Pollex, T., Schaefer, M., & Koš, M. (2014). A cluster of methylations in the domain IV of 25S rRNA is required for ribosome stability. *RNA*, 20(10), 1632-1644. <https://doi.org/10.1261/rna.043398.113>
- Goh, Y. T., Koh, C. W. Q., Sim, D. Y., Roca, X., & Goh, W. S. S. (2020). METTL4 catalyzes m6Am methylation in U2 snRNA to regulate pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Research*, 48(16), 9250-9261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa684>



- Gokhale, N. S., McIntyre, A. B. R., McFadden, M. J., Roder, A. E., Kennedy, E. M., Gandara, J. A., Hopcraft, S. E., Quicke, K. M., Vazquez, C., Willer, J., Ilkayeva, O. R., Law, B. A., Holley, C. L., Garcia-Blanco, M. A., Evans, M. J., Suthar, M. S., Bradrick, S. S., Mason, C. E., & Horner, S. M. (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host & Microbe*, *20*(5), 654-665. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.015>
- Goll, M. G., Kirpekar, F., Maggert, K. A., Yoder, J. A., Hsieh, C.-L., Zhang, X., Golic, K. G., Jacobsen, S. E., & Bestor, T. H. (2006). Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science (New York, N.Y.)*, *311*(5759), 395-398. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>
- Grote, V. A., Becker, S., & Kaaks, R. (2010). Diabetes Mellitus Type 2 – An Independent Risk Factor for Cancer? *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *118*(01), 4-8. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1243193>
- Gu, G., Brown, J. R., & Melton, D. A. (2003). Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development*, *120*(1), 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00330-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00330-1)
- Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage : NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *129*(10), 2447-2457.
- 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. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(8), 3305-3316. <https://doi.org/10.1172/JCI65390>
- Gurzov, E. N., Germano, C. M., Cunha, D. A., Ortis, F., Vanderwinden, J.-M., Marchetti, P., Zhang, L., & Eizirik, D. L. (2010). P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis (PUMA) Activation Contributes to Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis Induced by Proinflammatory Cytokines and Endoplasmic Reticulum Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(26), 19910-19920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122374>
- Haag, S., Kretschmer, J., & Bohnsack, M. T. (2015). WBSR22/Merm1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N7-methylation of G1639 in human 18S rRNA. *RNA*, *21*(2), 180-187. <https://doi.org/10.1261/rna.047910.114>
- Haag, S., Sloan, K. E., Ranjan, N., Warda, A. S., Kretschmer, J., Blessing, C., Hübner, B., Seikowski, J., Dennerlein, S., Rehling, P., Rodnina, M. V., Höbartner, C., & Bohnsack, M. T. (2016). NSUN3 and ABH1 modify the wobble position of mt-tRNA<sup>Met</sup> to expand codon recognition in mitochondrial translation. *The EMBO Journal*, *35*(19), 2104-2119. <https://doi.org/10.15252/embj.201694885>
- Haag, S., Warda, A. S., Kretschmer, J., Günnigmann, M. A., Höbartner, C., & Bohnsack, M. T. (2015). NSUN6 is a human RNA methyltransferase that catalyzes formation of m5C72 in specific tRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, *21*(9), 1532-1543. <https://doi.org/10.1261/rna.051524.115>
- Hagopian, K., Ramsey, J. J., & Weindruch, R. (2004). Krebs cycle enzymes from livers of old mice are differentially regulated by caloric restriction. *Experimental Gerontology*, *39*(8), 1145-1154. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.04.009>
- Hall, E., Volkov, P., Dayeh, T., Bacos, K., Rönn, T., Nitert, M. D., & Ling, C. (2014). Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Medicine*, *12*, 103. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-103>
- Hamma, T., & Ferré-D'Amaré, A. R. (2006). Pseudouridine Synthases. *Chemistry & Biology*, *13*(11), 1125-1135. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.09.009>

Han, M., Liu, Z., Xu, Y., Liu, X., Wang, D., Li, F., Wang, Y., & Bi, J. (2020). Abnormality of m6A mRNA Methylation Is Involved in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 98. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00098>

Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*, *6*(5), 1099-1108. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00108-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00108-8)

Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, *397*(6716), 271-274. <https://doi.org/10.1038/16729>

Hauenschild, R., Tserovski, L., Schmid, K., Thüring, K., Winz, M.-L., Sharma, S., Entian, K.-D., Wacheul, L., Lafontaine, D. L. J., Anderson, J., Alfonzo, J., Hildebrandt, A., Jäschke, A., Motorin, Y., & Helm, M. (2015). The reverse transcription signature of N1-methyladenosine in RNA-Seq is sequence dependent. *Nucleic Acids Research*, *43*(20), 9950-9964. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv895>

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*(2), 403-411. <https://doi.org/10.2337/db08-0792>

He, L., Xu, Z., Yao, K., Wu, G., Yin, Y., Nyachoti, C. M., & Kim, S. W. (2015). The Physiological Basis and Nutritional Function of Alpha-ketoglutarate. *Current Protein & Peptide Science*, *16*(7), 576-581. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150630140157>

He, Y., Hu, H., Wang, Y., Yuan, H., Lu, Z., Wu, P., Liu, D., Tian, L., Yin, J., Jiang, K., & Miao, Y. (2018). ALKBH5 Inhibits Pancreatic Cancer Motility by Decreasing Long Non-Coding RNA KCN15-AS1 Methylation. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *48*(2), 838-846. <https://doi.org/10.1159/000491915>

Hebrok, M., Kim, S. K., & Melton, D. A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes & Development*, *12*(11), 1705-1713. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1705>

Heintges, T., Lüthen, R., & Niederau, C. (1994). Inhibition of exocrine pancreatic secretion by somatostatin and its analogues. *Digestion*, *55 Suppl 1*, 1-9.

Heller, R. S., Jenny, M., Collombat, P., Mansouri, A., Tomasetto, C., Madsen, O. D., Mellitzer, G., Gradwohl, G., & Serup, P. (2005). Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Developmental Biology*, *286*(1), 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.041>

Hodson, D. J., Mitchell, R. K., Marselli, L., Pullen, T. J., Gimeno Brias, S., Semplici, F., Everett, K. L., Cooper, D. M. F., Bugliani, M., Marchetti, P., Lavallard, V., Bosco, D., Piemonti, L., Johnson, P. R., Hughes, S. J., Li, D., Li, W.-H., Shapiro, A. M. J., & Rutter, G. A. (2014). ADCY5 couples glucose to insulin secretion in human islets. *Diabetes*, *63*(9), 3009-3021. <https://doi.org/10.2337/db13-1607>

Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., & Weissman, J. S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, *186*(3), 323-331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>

Hong, B., Brockenbrough, J. S., Wu, P., & Aris, J. P. (1997). Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(1), 378-388. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.1.378>

Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., Qi, M., Lu, Z., Shi, H., Wang, J., Cheng, Y., Luo, G., Dai, Q., Liu, M., Guo, X., Sha, J., Shen, B., & He, C. (2017). Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that

regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, 27(9), 1115-1127.

<https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>

Hu, Y., Xu, X.-H., He, K., Zhang, L.-L., Wang, S.-K., Pan, Y.-Q., He, B.-S., Feng, T.-T., & Mao, X.-M. (2014). Genome-wide analysis of DNA methylation variations caused by chronic glucolipototoxicity in beta-cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 122(2), 71-78. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363231>

Hua, F., Yu, J.-J., & Hu, Z.-W. (2016). Diabetes and cancer, common threads and missing links. *Cancer Letters*, 374(1), 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.006>

Huang, C., Lin, C., Haataja, L., Gurlo, T., Butler, A. E., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2007). High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes*, 56(8), 2016-2027. <https://doi.org/10.2337/db07-0197>

Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B. S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C. L., Hu, Y.-C., Hüttelmaier, S., Skibbe, J. R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., ... Chen, J. (2018). Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 285-295. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>

Huang, H., Weng, H., Zhou, K., Wu, T., Zhao, B. S., Sun, M., Chen, Z., Deng, X., Xiao, G., Auer, F., Klemm, L., Wu, H., Zuo, Z., Qin, X., Dong, Y., Zhou, Y., Qin, H., Tao, S., Du, J., ... Chen, J. (2019). Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m6A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, 567(7748), 414-419. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1016-7>

Huang, Y., Yan, J., Li, Q., Li, J., Gong, S., Zhou, H., Gan, J., Jiang, H., Jia, G.-F., Luo, C., & Yang, C.-G. (2015). Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 373-384. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1276>

Hussain, S., Sajini, A. A., Blanco, S., Dietmann, S., Lombard, P., Sugimoto, Y., Paramor, M., Gleeson, J. G., Odom, D. T., Ule, J., & Frye, M. (2013). NSun2-mediated cytosine-5 methylation of vault noncoding RNA determines its processing into regulatory small RNAs. *Cell Reports*, 4(2), 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.029>

Ibarra Urizar, A., Prause, M., Wortham, M., Sui, Y., Thams, P., Sander, M., Christensen, G. L., & Billestrup, N. (2019). Beta-cell dysfunction induced by non-cytotoxic concentrations of Interleukin-1 $\beta$  is associated with changes in expression of beta-cell maturity genes and associated histone modifications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 496, 110524. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110524>

Janson, J., Ashley, R. H., Harrison, D., McIntyre, S., & Butler, P. C. (1999). The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*, 48(3), 491-498. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.3.491>

Jia, D., Sun, Y., & Konieczny, S. F. (2008). Mist1 regulates pancreatic acinar cell proliferation through p21 CIP1/WAF1. *Gastroenterology*, 135(5), 1687-1697. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.026>

Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., & He, C. (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885-887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>

Jia, G., Yang, C.-G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., & He, C. (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Letters*, 582(23), 3313-3319. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.019>

- Jiang, F.-X., & Morahan, G. (2011). Pancreatic Stem Cells : Unresolved Business. In *Stem Cells in Clinic and Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/23760>
- Jones, J. D., Monroe, J., & Koutmou, K. S. (2020). A molecular-level perspective on the frequency, distribution, and consequences of messenger RNA modifications. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *11*(4), e1586. <https://doi.org/10.1002/wrna.1586>
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., & Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, *371*(6498), 606-609. <https://doi.org/10.1038/371606a0>
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., & Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes*, *50*(11), 2438-2443. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2438>
- Karaskov, E., Scott, C., Zhang, L., Teodoro, T., Ravazzola, M., & Volchuk, A. (2006). Chronic Palmitate But Not Oleate Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Which May Contribute to INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Endocrinology*, *147*(7), 3398-3407. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1494>
- Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, F. A., Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., & Weissman, D. (2008). Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *16*(11), 1833-1840. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.200>
- Karra, E., O'Daly, O. G., Choudhury, A. I., Yousseif, A., Millership, S., Neary, M. T., Scott, W. R., Chandarana, K., Manning, S., Hess, M. E., Iwakura, H., Akamizu, T., Millet, Q., Gelegen, C., Drew, M. E., Rahman, S., Emmanuel, J. J., Williams, S. C. R., Rütther, U. U., ... Batterham, R. L. (2013). A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(8), 3539-3551. <https://doi.org/10.1172/JCI44403>
- Karunatilaka, K. S., & Rueda, D. (2014). Post-transcriptional modifications modulate conformational dynamics in human U2–U6 snRNA complex. *RNA*, *20*(1), 16-23. <https://doi.org/10.1261/rna.041806.113>
- Kato, A., Tatsumi, Y., Yako, H., Sango, K., Himeno, T., Kondo, M., Kato, Y., Kamiya, H., Nakamura, J., & Kato, K. (2019). Recurrent short-term hypoglycemia and hyperglycemia induce apoptosis and oxidative stress via the ER stress response in immortalized adult mouse Schwann (IMS32) cells. *Neuroscience Research*, *147*, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.11.004>
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. E. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature Genetics*, *32*(1), 128-134. <https://doi.org/10.1038/ng959>
- Ke, S., Pandya-Jones, A., Saito, Y., Fak, J. J., Vågbo, C. B., Geula, S., Hanna, J. H., Black, D. L., Darnell, J. E., & Darnell, R. B. (2017). M6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. *Genes & Development*, *31*(10), 990-1006. <https://doi.org/10.1101/gad.301036.117>
- Keith, J. M., Ensinger, M. J., & Moss, B. (1978). HeLa cell RNA (2'-O-methyladenosine-N6)-methyltransferase specific for the capped 5'-end of messenger RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, *253*(14), 5033-5039.
- Kennedy, E. M., Bogerd, H. P., Kornepati, A. V. R., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall, J. B., Poling, B. C., Tsai, K., Gokhale, N. S., Horner, S. M., & Cullen, B. R. (2016). Posttranscriptional m(6)A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell Host & Microbe*, *19*(5), 675-685. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.002>

- Khin, P.-P., Lee, J.-H., & Jun, H.-S. (2021). A Brief Review of the Mechanisms of  $\beta$ -Cell Dedifferentiation in Type 2 Diabetes. *Nutrients*, *13*(5), 1593. <https://doi.org/10.3390/nu13051593>
- King, T. H., Liu, B., McCully, R. R., & Fournier, M. J. (2003). Ribosome Structure and Activity Are Altered in Cells Lacking snoRNPs that Form Pseudouridines in the Peptidyl Transferase Center. *Molecular Cell*, *11*(2), 425-435. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00040-6)
- Klok, M. D., Jakobsdottir, S., & Drent, M. L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans : A review. *Obesity Reviews*, *8*(1), 21-34. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x>
- Knuckles, P., Lence, T., Hausmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S. H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., Andrade-Navarro, M. A., Biggiogera, M., Helm, M., Soller, M., Bühler, M., & Roignant, J.-Y. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/FI(2)d. *Genes & Development*, *32*(5-6), 415-429. <https://doi.org/10.1101/gad.309146.117>
- Kolb, H., & Martin, S. (2017). Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Medicine*, *15*, 131. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0901-x>
- Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., Hagenbüchle, O., & Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & Development*, *12*(23), 3752-3763.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., ... Kadowaki, T. (2007). Adiponectin Stimulates AMP-Activated Protein Kinase in the Hypothalamus and Increases Food Intake. *Cell Metabolism*, *6*(1), 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.06.003>
- Lammert, E., Cleaver, O., & Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5542), 564-567. <https://doi.org/10.1126/science.1064344>
- Lamy, C. M., Sanno, H., Labouèbe, G., Picard, A., Magnan, C., Chatton, J.-Y., & Thorens, B. (2014). Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. *Cell Metabolism*, *19*(3), 527-538. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.003>
- Larsen, H. L., & Grapin-Botton, A. (2017). The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *66*, 51-68. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.005>
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(21), 7448-7459. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003>
- Lee, J. C., Smith, S. B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R. G., & German, M. S. (2001). Regulation of the Pancreatic Pro-Endocrine Gene Neurogenin3. *Diabetes*, *50*(5), 928-936. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.5.928>
- Lei, L., Bai, Y.-H., Jiang, H.-Y., He, T., Li, M., & Wang, J.-P. (2021). A bioinformatics analysis of the contribution of m6A methylation to the occurrence of diabetes mellitus. *Endocrine Connections*, *EC-21-0328.R2*. <https://doi.org/10.1530/EC-21-0328>
- Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.-L., Ktorza, A., Casteilla, L., & Pénicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes*, *58*(3), 673-681. <https://doi.org/10.2337/db07-1056>

- Lenzen, S., Drinkgern, J., & Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radical Biology & Medicine*, *20*(3), 463-466. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)02051-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)02051-5)
- Li, N., Kang, Y., Wang, L., Huff, S., Tang, R., Hui, H., Agrawal, K., Gonzalez, G. M., Wang, Y., Patel, S. P., & Rana, T. M. (2020). ALKBH5 regulates anti-PD-1 therapy response by modulating lactate and suppressive immune cell accumulation in tumor microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(33), 20159-20170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918986117>
- Li, X., Xiong, X., Wang, K., Wang, L., Shu, X., Ma, S., & Yi, C. (2016). Transcriptome-wide mapping reveals reversible and dynamic N(1)-methyladenosine methylome. *Nature Chemical Biology*, *12*(5), 311-316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2040>
- Li, X., Xiong, X., Zhang, M., Wang, K., Chen, Y., Zhou, J., Mao, Y., Lv, J., Yi, D., Chen, X.-W., Wang, C., Qian, S.-B., & Yi, C. (2017). Base-Resolution Mapping Reveals Distinct m1A Methylome in Nuclear- and Mitochondrial-Encoded Transcripts. *Molecular Cell*, *68*(5), 993-1005.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.019>
- Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., & Gregory, R. I. (2016). METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Molecular cell*, *62*(3), 335-345. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.021>
- Lin, S., Liu, Q., Lelyveld, V. S., Choe, J., Szostak, J. W., & Gregory, R. I. (2018). Mettl1/Wdr4-Mediated m7G tRNA Methylome Is Required for Normal mRNA Translation and Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Molecular Cell*, *71*(2), 244-255.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.001>
- Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nature Methods*, *12*(8), 767-772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>
- Lipson, K. L., Ghosh, R., & Urano, F. (2008). The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PLoS One*, *3*(2), e1648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001648>
- Liu, F., Clark, W., Luo, G., Wang, X., Fu, Y., Wei, J., Wang, X., Hao, Z., Dai, Q., Zheng, G., Ma, H., Han, D., Evans, M., Klungland, A., Pan, T., & He, C. (2016). ALKBH1-Mediated tRNA Demethylation Regulates Translation. *Cell*, *167*(3), 816-828.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.038>
- Liu, J., Luo, G., Sun, J., Men, L., Ye, H., He, C., & Ren, D. (2019). METTL14 is essential for  $\beta$ -cell survival and insulin secretion. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1865*(9), 2138-2148. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.04.011>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, *10*(2), 93-95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., & Pan, T. (2015). N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, *518*(7540), 560-564. <https://doi.org/10.1038/nature14234>
- Liu, N., Zhou, K. I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L., & Pan, T. (2017). N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Research*, *45*(10), 6051-6063. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx141>
- Liu, Q., Zhao, Y., Wu, R., Jiang, Q., Cai, M., Bi, Z., Liu, Y., Yao, Y., Feng, J., Wang, Y., & Wang, X. (2019). ZFP217 regulates adipogenesis by controlling mitotic clonal expansion in a METTL3-m6A dependent manner. *RNA Biology*, *16*(12), 1785-1793. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1658508>

- Louie, D. S., Williams, J. A., & Owyang, C. (1985). Action of pancreatic polypeptide on rat pancreatic secretion : In vivo and in vitro. *The American Journal of Physiology*, *249*(4 Pt 1), G489-495. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1985.249.4.G489>
- Loweth, A. C., Williams, G. T., James, R. F., Scarpello, J. H., & Morgan, N. G. (1998). Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. *Diabetes*, *47*(5), 727-732. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.5.727>
- Ma, H., Wang, X., Cai, J., Dai, Q., Natchiar, S. K., Lv, R., Chen, K., Lu, Z., Chen, H., Shi, Y. G., Lan, F., Fan, J., Klaholz, B. P., Pan, T., Shi, Y., & He, C. (2019). N6-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation. *Nature Chemical Biology*, *15*(1), 88-94. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0184-3>
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H. I., Spinas, G. A., Kaiser, N., Halban, P. A., & Donath, M. Y. (2002). Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(6), 851-860. <https://doi.org/10.1172/JCI15318>
- Magnani, F., & Mattevi, A. (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, *59*, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.001>
- Mailloux, R. J. (2020). An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(6), E472. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>
- Martín, M., Gallego-Llamas, J., Ribes, V., Kedingler, M., Niederreither, K., Chambon, P., Dollé, P., & Gradwohl, G. (2005). Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Developmental Biology*, *284*(2), 399-411. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.035>
- Masters, S. L., Dunne, A., Subramanian, S. L., Hull, R. L., Tannahill, G. M., Sharp, F. A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L. A., Harris, J., Coll, R. C., Mills, K. H. G., Mok, K. H., Newsholme, P., Nuñez, G., Yodoi, J., ... O'Neill, L. A. J. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, *11*(10), 897-904. <https://doi.org/10.1038/ni.1935>
- Mato, J., Alvarez, L., Ortiz, P., & Pajares, M. A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis : Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, *73*(3), 265-280. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(96\)00197-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(96)00197-0)
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A. V., Patil, D. P., Linder, B., Pickering, B. F., Vasseur, J.-J., Chen, Q., Gross, S. S., Elemento, O., Debart, F., Kiledjian, M., & Jaffrey, S. R. (2017). Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, *541*(7637), 371-375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>
- Men, L., Sun, J., Luo, G., & Ren, D. (2019). Acute Deletion of METTL14 in  $\beta$ -Cells of Adult Mice Results in Glucose Intolerance. *Endocrinology*, *160*(10), 2388-2394. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00350>
- Metodiev, M. D., Spåhr, H., Loguercio Polosa, P., Meharg, C., Becker, C., Altmueller, J., Habermann, B., Larsson, N.-G., & Ruzzenente, B. (2014). NSUN4 is a dual function mitochondrial protein required for both methylation of 12S rRNA and coordination of mitoribosomal assembly. *PLoS Genetics*, *10*(2), e1004110. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004110>
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., & Sommer, T. (2005). ERAD : The long road to destruction. *Nature Cell Biology*, *7*(8), 766-772. <https://doi.org/10.1038/ncb0805-766>
- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, *149*(7), 1635-1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>

- Mfopou, J. K., Chen, B., Sui, L., Sermon, K., & Bouwens, L. (2010). Recent Advances and Prospects in the Differentiation of Pancreatic Cells From Human Embryonic Stem Cells. *Diabetes*, *59*(9), 2094-2101. <https://doi.org/10.2337/db10-0439>
- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J., & Seino, S. (2001). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature Neuroscience*, *4*(5), 507-512. <https://doi.org/10.1038/87455>
- Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, *101*(5), 451-454. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80855-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80855-7)
- Moroz-Omori, E. V., Huang, D., Kumar Bedi, R., Cheriyankunnel, S. J., Bochenkova, E., Dolbois, A., Rzeczowski, M. D., Li, Y., Wiedmer, L., & Cafilisch, A. (2021). METTL3 Inhibitors for Epitranscriptomic Modulation of Cellular Processes. *ChemMedChem*. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100291>
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, *403*(6765), 98-103. <https://doi.org/10.1038/47513>
- Nakano, S., Suzuki, T., Kawarada, L., Iwata, H., Asano, K., & Suzuki, T. (2016). NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNA(Met). *Nature Chemical Biology*, *12*(7), 546-551. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2099>
- Nauck, M. A., Homberger, E., Siegel, E. G., Allen, R. C., Eaton, R. P., Ebert, R., & Creutzfeldt, W. (1986). Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *63*(2), 492-498. <https://doi.org/10.1210/jcem-63-2-492>
- Newsholme, P., Haber, E. P., Hirabara, S. M., Rebelato, E. L. O., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H. C., Carpinelli, A. R., & Curi, R. (2007). Diabetes associated cell stress and dysfunction : Role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *The Journal of Physiology*, *583*(Pt 1), 9-24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.135871>
- Nikolova, G., Jabs, N., Konstantinova, I., Domogatskaya, A., Tryggvason, K., Sorokin, L., Fässler, R., Gu, G., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Melton, D. A., & Lammert, E. (2006). The vascular basement membrane : A niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Developmental Cell*, *10*(3), 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.015>
- Niu, Y., Lin, Z., Wan, A., Chen, H., Liang, H., Sun, L., Wang, Y., Li, X., Xiong, X., Wei, B., Wu, X., & Wan, G. (2019). RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. *Molecular Cancer*, *18*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1004-4>
- 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. *Scientific Reports*, *7*, 6285. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06731-w>
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., & Nakatani, Y. (1996). The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases. *Cell*, *87*(5), 953-959. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)82001-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)82001-2)
- 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. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 384. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00384>



- Ohnishi, H., Mine, T., & Kojima, I. (1994). Inhibition by somatostatin of amylase secretion induced by calcium and cyclic AMP in rat pancreatic acini. *The Biochemical Journal*, 304 ( Pt 2), 531-536. <https://doi.org/10.1042/bj3040531>
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.137>
- Ortega-Prieto, P., & Postic, C. (2019). Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Frontiers in Genetics*, 10, 472. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00472>
- Öunap, K., Käsper, L., Kurg, A., & Kurg, R. (2013). The Human WBSCR22 Protein Is Involved in the Biogenesis of the 40S Ribosomal Subunits in Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 8(9), e75686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075686>
- Ozanick, S., Krecic, A., Andersland, J., & Anderson, J. T. (2005). The bipartite structure of the tRNA m1A58 methyltransferase from *S. cerevisiae* is conserved in humans. *RNA*, 11(8), 1281-1290. <https://doi.org/10.1261/rna.5040605>
- Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis : From bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), 530-565. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>
- Pandey, R. R., Delfino, E., Homolka, D., Roithova, A., Chen, K.-M., Li, L., Franco, G., Vågbø, C. B., Taillebourg, E., Fauvarque, M.-O., & Pillai, R. S. (2020). The Mammalian Cap-Specific m6Am RNA Methyltransferase PCIF1 Regulates Transcript Levels in Mouse Tissues. *Cell Reports*, 32(7), 108038. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108038>
- Parker, H. E., Habib, A. M., Rogers, G. J., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2009). Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia*, 52(2), 289-298. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1202-x>
- Pascal, A., & Westhof, E. (1998). Effects of pseudouridylation on tRNA hydration and dynamics : A theoretical approach. *Modification and Editing of RNA*, 103-112.
- Patil, D. P., Chen, C.-K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). M6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369-373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Pedroso, J. A. B., Ramos-Lobo, A. M., & Donato, J. (2019). SOCS3 as a future target to treat metabolic disorders. *Hormones (Athens, Greece)*, 18(2), 127-136. <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0078-5>
- Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., & Montminy, M. R. (1994). Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 8(12), 1798-1806. <https://doi.org/10.1210/mend.8.12.7708065>
- Peng, S., Xiao, W., Ju, D., Sun, B., Hou, N., Liu, Q., Wang, Y., Zhao, H., Gao, C., Zhang, S., Cao, R., Li, P., Huang, H., Ma, Y., Wang, Y., Lai, W., Ma, Z., Zhang, W., Huang, S., ... Huang, N. (2019). Identification of entacapone as a chemical inhibitor of FTO mediating metabolic regulation through FOXO1. *Science Translational Medicine*, 11(488), eaau7116. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau7116>
- Penzo, M., & Montanaro, L. (2018). Turning Uridines around : Role of rRNA Pseudouridylation in Ribosome Biogenesis and Ribosomal Function. *Biomolecules*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/biom8020038>

- Petersen, H. V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B. K., & Madsen, O. D. (1994). Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(22), 10465-10469. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10465>
- Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., Reece, J. M., Deeney, J. T., Andersen, M. E., Corkey, B. E., & Collins, S. (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, *56*(7), 1783-1791. <https://doi.org/10.2337/db06-1601>
- Pictet, R. L., Clark, W. R., Williams, R. H., & Rutter, W. J. (1972). An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Developmental Biology*, *29*(4), 436-467. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(72)90083-8)
- Pierreux, C. E., Poll, A. V., Kemp, C. R., Clotman, F., Maestro, M. A., Cordi, S., Ferrer, J., Leyns, L., Rousseau, G. G., & Lemaigre, F. P. (2006). The Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor-6 Controls the Development of Pancreatic Ducts in the Mouse. *Gastroenterology*, *130*(2), 532-541. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.005>
- Ping, X.-L., Sun, B.-F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.-J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.-S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X.-M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W.-P., Zhu, X.-F., ... Yang, Y.-G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, *24*(2), 177-189. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
- Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013>
- Poritsanos, N. J., Lew, P. S., & Mizuno, T. M. (2010). Relationship between blood glucose levels and hepatic Fto mRNA expression in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *400*(4), 713-717. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.133>
- Poungvarin, N., Lee, J. K., Yechoor, V. K., Li, M. V., Assavapokee, T., Suksaranjit, P., Thepsongwajja, J. J., Saha, P. K., Oka, K., & Chan, L. (2012). Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) plays a pivotal role in beta cell glucotoxicity. *Diabetologia*, *55*(6), 1783-1796. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2506-4>
- Preston, A. M., Gurisik, E., Bartley, C., Laybutt, D. R., & Biden, T. (2009). Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1506-5>
- Raalte, D. H. van, & Diamant, M. (2011). Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus : Target for durable therapy? *Diabetes Research and Clinical Practice*, *93*, S37-S46. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70012-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70012-2)
- Rabhi, N., Denechaud, P.-D., Gromada, X., Hannou, S. A., Zhang, H., Rashid, T., Salas, E., Durand, E., Sand, O., Bonnefond, A., Yengo, L., Chavey, C., Bonner, C., Kerr-Conte, J., Abderrahmani, A., Auwerx, J., Fajas, L., Froguel, P., & Annicotte, J.-S. (2016). KAT2B Is Required for Pancreatic Beta Cell Adaptation to Metabolic Stress by Controlling the Unfolded Protein Response. *Cell Reports*, *15*(5), 1051-1061. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.079>
- Rabhi, N., Salas, E., Froguel, P., & Annicotte, J.-S. (2014). Role of the Unfolded Protein Response in  $\beta$  Cell Compensation and Failure during Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, *2014*, e795171. <https://doi.org/10.1155/2014/795171>

Rabinovitch, A., & Suarez-Pinzon, W. L. (1998). Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet  $\beta$ -Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Biochemical Pharmacology*, *55*(8), 1139-1149. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00492-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00492-9)

Regu , L., Zhao, L., Ji, F., Wang, H., Avruch, J., & Dai, N. (2021). RNA m6A reader IMP2/IGF2BP2 promotes pancreatic  $\beta$ -cell proliferation and insulin secretion by enhancing PDX1 expression. *Molecular Metabolism*, *48*, 101209. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101209>

Rexroth, S., Poetsch, A., R gner, M., Hamann, A., Werner, A., Osiewacz, H. D., Sch fer, E. R., Seelert, H., & Dencher, N. A. (2012). Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1817*(2), 381-387. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.11.006>

Rix, I., Nex e-Larsen, C., Bergmann, N. C., Lund, A., & Knop, F. K. (2000). Glucagon Physiology. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferr re, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279127/>

R nn, T., Poulsen, P., Hansson, O., Holmkvist, J., Almgren, P., Nilsson, P., Tuomi, T., Isomaa, B., Groop, L., Vaag, A., & Ling, C. (2008). Age influences DNA methylation and gene expression of COX7A1 in human skeletal muscle. *Diabetologia*, *51*(7), 1159. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1018-8>

Ronveaux, C. C., Tom , D., & Raybould, H. E. (2015). Glucagon-Like Peptide 1 Interacts with Ghrelin and Leptin to Regulate Glucose Metabolism and Food Intake through Vagal Afferent Neuron Signaling<sup>12</sup>. *The Journal of Nutrition*, *145*(4), 672-680. <https://doi.org/10.3945/jn.114.206029>

Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. M., & Zaret, K. S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes & Development*, *15*(15), 1998-2009. <https://doi.org/10.1101/gad.904601>

Roundtree, I. A., Luo, G.-Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P., He, E., Shen, B., & He, C. (2017). YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *ELife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.31311>

Routh, V. H. (2002). Glucose-sensing neurons : Are they physiologically relevant? *Physiology & Behavior*, *76*(3), 403-413. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00761-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00761-8)

Russell, A. P. (2005). PGC-1 $\alpha$  and exercise : Important partners in combating insulin resistance. *Current Diabetes Reviews*, *1*(2), 175-181. <https://doi.org/10.2174/1573399054022811>

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045 : Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *157*. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>

Safra, M., Sas-Chen, A., Nir, R., Winkler, R., Nachshon, A., Bar-Yaacov, D., Erlacher, M., Rossmann, W., Stern-Ginossar, N., & Schwartz, S. (2017). The m1A landscape on cytosolic and mitochondrial mRNA at single-base resolution. *Nature*, *551*(7679), 251-255. <https://doi.org/10.1038/nature24456>

Salditt-Georgieff, M., Harpold, M., Chen-Kiang, S., & Darnell, J. E. (1980). The addition of 5' cap structures occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped. *Cell*, *19*(1), 69-78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90389-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90389-x)

- Salisbury, R. J., Blaylock, J., Berry, A. A., Jennings, R. E., De Krijger, R., Piper Hanley, K., & Hanley, N. A. (2014). The window period of NEUROGENIN3 during human gestation. *Islets*, *6*(3), e954436. <https://doi.org/10.4161/19382014.2014.954436>
- Sander, M., Sussel, L., Conners, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., & German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, *127*(24), 5533-5540.
- Schaefer, M., Steringer, J. P., & Lyko, F. (2008). The Drosophila cytosine-5 methyltransferase Dnmt2 is associated with the nuclear matrix and can access DNA during mitosis. *PLoS One*, *3*(1), e1414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001414>
- Schaffer, A. E., Freude, K. K., Nelson, S. B., & Sander, M. (2010). Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Developmental Cell*, *18*(6), 1022-1029. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.015>
- Schöller, E., Weichmann, F., Treiber, T., Ringle, S., Treiber, N., Flatley, A., Feederle, R., Bruckmann, A., & Meister, G. (2018). Interactions, localization, and phosphorylation of the m6A generating METTL3-METTL14-WTAP complex. *RNA (New York, N.Y.)*, *24*(4), 499-512. <https://doi.org/10.1261/rna.064063.117>
- Schossere, M., Minois, N., Angerer, T. B., Amring, M., Dellago, H., Harreither, E., Calle-Perez, A., Pircher, A., Gerstl, M. P., Pfeifenberger, S., Brandl, C., Sonntagbauer, M., Kriegner, A., Linder, A., Weinhäusel, A., Mohr, T., Steiger, M., Mattanovich, D., Rinnerthaler, M., ... Grillari, J. (2015). Methylation of ribosomal RNA by NSUN5 is a conserved mechanism modulating organismal lifespan. *Nature Communications*, *6*, 6158. <https://doi.org/10.1038/ncomms7158>
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *569*(1), 29-63. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056>
- Schubert, D., Behl, C., Lesley, R., Brack, A., Dargusch, R., Sagara, Y., & Kimura, H. (1995). Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(6), 1989-1993.
- Schumann, D. M., Maedler, K., Franklin, I., Konrad, D., Størling, J., Böni-Schnetzler, M., Gjinovci, A., Kurrer, M. O., Gauthier, B. R., Bosco, D., Andres, A., Berney, T., Greter, M., Becher, B., Chervonsky, A. V., Halban, P. A., Mandrup-Poulsen, T., Wollheim, C. B., & Donath, M. Y. (2007). The Fas pathway is involved in pancreatic beta cell secretory function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(8), 2861-2866. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611487104>
- Seino, Y., Fukushima, M., & Yabe, D. (2010). GIP and GLP-1, the two incretin hormones : Similarities and differences. *Journal of Diabetes Investigation*, *1*(1-2), 8-23. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00022.x>
- Selberg, S., Blokhina, D., Aatonen, M., Koivisto, P., Siltanen, A., Mervaala, E., Kankuri, E., & Karelson, M. (2019). Discovery of Small Molecules that Activate RNA Methylation through Cooperative Binding to the METTL3-14-WTAP Complex Active Site. *Cell Reports*, *26*(13), 3762-3771.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.100>
- Selberg, S., Seli, N., Kankuri, E., & Karelson, M. (2021). Rational Design of Novel Anticancer Small-Molecule RNA m6A Demethylase ALKBH5 Inhibitors. *ACS Omega*, *6*(20), 13310-13320. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01289>

- Sendinc, E., Valle-Garcia, D., Dhall, A., Chen, H., Henriques, T., Navarrete-Perea, J., Sheng, W., Gygi, S. P., Adelman, K., & Shi, Y. (2019). PCIF1 Catalyzes m6Am mRNA Methylation to Regulate Gene Expression. *Molecular Cell*, 75(3), 620-630.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.030>
- Serup, P., Jensen, J., Andersen, F. G., Jørgensen, M. C., Blume, N., Holst, J. J., & Madsen, O. D. (1996). Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17), 9015-9020. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9015>
- Seymour, P. A., Freude, K. K., Tran, M. N., Mayes, E. E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., & Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1865-1870. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609217104>
- Shafqat, N., Muniz, J. R. C., Pilka, E. S., Papagrigoriou, E., von Delft, F., Oppermann, U., & Yue, W. W. (2013). Insight into S-adenosylmethionine biosynthesis from the crystal structures of the human methionine adenosyltransferase catalytic and regulatory subunits. *The Biochemical Journal*, 452(1), 27-36. <https://doi.org/10.1042/BJ20121580>
- Shen, F., Huang, W., Huang, J.-T., Xiong, J., Yang, Y., Wu, K., Jia, G.-F., Chen, J., Feng, Y.-Q., Yuan, B.-F., & Liu, S.-M. (2015). Decreased N(6)-methyladenosine in peripheral blood RNA from diabetic patients is associated with FTO expression rather than ALKBH5. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(1), E148-154. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1893>
- Shen, S., Faouzi, S., Bastide, A., Martineau, S., Malka-Mahieu, H., Fu, Y., Sun, X., Mateus, C., Routier, E., Roy, S., Desaubry, L., André, F., Eggermont, A., David, A., Scoazec, J.-Y., Vagner, S., & Robert, C. (2019). An epitranscriptomic mechanism underlies selective mRNA translation remodelling in melanoma persister cells. *Nature Communications*, 10, 5713. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13360-6>
- Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas organogenesis : From lineage determination to morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 81-105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>
- Shima, H., Matsumoto, M., Ishigami, Y., Ebina, M., Muto, A., Sato, Y., Kumagai, S., Ochiai, K., Suzuki, T., & Igarashi, K. (2017). S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Reports*, 21(12), 3354-3363. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.092>
- Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieling, J. A. F. O., Loayza-Puch, F., Elkon, R., & Agami, R. (2017). Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell*, 169(2), 326-337.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.031>
- Smushkin, G., & Vella, A. (2010). Genetics of Type 2 Diabetes. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(4), 471-477. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32833a558d>
- 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(6623), 399-402. <https://doi.org/10.1038/386399a0>
- Spijker, H. S., Song, H., Ellenbroek, J. H., Roefs, M. M., Engelse, M. A., Bos, E., Koster, A. J., Rabelink, T. J., Hansen, B. C., Clark, A., Carlotti, F., & de Koning, E. J. P. (2015). Loss of  $\beta$ -Cell Identity Occurs in Type 2 Diabetes and Is Associated With Islet Amyloid Deposits. *Diabetes*, 64(8), 2928-2938. <https://doi.org/10.2337/db14-1752>
- Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K., & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity : Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, 2(3), 135-145. <https://doi.org/10.4161/isl.2.3.11815>

- Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., & Habener, J. F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetics*, *15*(1), 106-110. <https://doi.org/10.1038/ng0197-106>
- Su, R., Dong, L., Li, Y., Gao, M., Han, L., Wunderlich, M., Deng, X., Li, H., Huang, Y., Gao, L., Li, C., Zhao, Z., Robinson, S., Tan, B., Qing, Y., Qin, X., Prince, E., Xie, J., Qin, H., ... Chen, J. (2020). Targeting FTO Suppresses Cancer Stem Cell Maintenance and Immune Evasion. *Cancer Cell*, *38*(1), 79-96.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.017>
- Sun, H.-L., Zhu, A. C., Gao, Y., Terajima, H., Fei, Q., Liu, S., Zhang, L., Zhang, Z., Harada, B. T., He, Y.-Y., Bissonnette, M. B., Hung, M.-C., & He, C. (2020). Stabilization of ERK-Phosphorylated METTL3 by USP5 Increases m6A Methylation. *Molecular Cell*, *80*(4), 633-647.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.026>
- Tamarina, N. A., Roe, M. W., & Philipson, L. (2014). Characterization of mice expressing Ins1 gene promoter driven CreERT recombinase for conditional gene deletion in pancreatic  $\beta$ -cells. *Islets*, *6*(1), e27685. <https://doi.org/10.4161/isl.27685>
- Tang, C., Klukovich, R., Peng, H., Wang, Z., Yu, T., Zhang, Y., Zheng, H., Klungland, A., & Yan, W. (2018). ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(2), E325-E333. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717794115>
- Tang, H., Fan, X., Xing, J., Liu, Z., Jiang, B., Dou, Y., Gorospe, M., & Wang, W. (2015). NSun2 delays replicative senescence by repressing p27 (KIP1) translation and elevating CDK1 translation. *Aging*, *7*(12), 1143-1158. <https://doi.org/10.18632/aging.100860>
- Theander-Carrillo, C., Wiedmer, P., Cettour-Rose, P., Nogueiras, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P., Castaneda, T. R., Muzzin, P., Schürmann, A., Szanto, I., Tschöp, M. H., & Rohner-Jeanrenaud, F. (2006). Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 1983-1993. <https://doi.org/10.1172/JCI25811>
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., & Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, *46*(11), 1733-1742. <https://doi.org/10.2337/diab.46.11.1733>
- Tong, J., Prigeon, R. L., Davis, H. W., Bidlingmaier, M., Kahn, S. E., Cummings, D. E., Tschöp, M. H., & D'Alessio, D. (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*, *59*(9), 2145-2151. <https://doi.org/10.2337/db10-0504>
- Trixl, L., & Lusser, A. (2019). The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark. *WIREs RNA*, *10*(1), e1510. <https://doi.org/10.1002/wrna.1510>
- Tu, B. P., & Weissman, J. S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes : Mechanisms and consequences. *The Journal of Cell Biology*, *164*(3), 341-346. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311055>
- Tuorto, F., Liebers, R., Musch, T., Schaefer, M., Hofmann, S., Kellner, S., Frye, M., Helm, M., Stoecklin, G., & Lyko, F. (2012). RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(9), 900-905. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2357>
- Türkvan, A., Erden, A., Türkoğlu, M. A., & Yener, Ö. (2013). Congenital variants and anomalies of the pancreas and pancreatic duct : Imaging by magnetic resonance cholangiopancreatography and multidetector computed tomography. *Korean Journal of Radiology*, *14*(6), 905-913. <https://doi.org/10.3348/kjr.2013.14.6.905>

- Ueda, Y., Ooshio, I., Fusamae, Y., Kitae, K., Kawaguchi, M., Jingushi, K., Hase, H., Harada, K., Hirata, K., & Tsujikawa, K. (2017). AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells. *Scientific Reports*, *7*, 42271. <https://doi.org/10.1038/srep42271>
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5453), 664-666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>
- van Tran, N., Ernst, F. G. M., Hawley, B. R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., Bohnsack, K. E., Bohnsack, M. T., Jaffrey, S. R., Graille, M., & Lafontaine, D. L. J. (2019). The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Research*, *47*(15), 7719-7733. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz619>
- Victor, V. M., Rocha, M., Herance, R., & Hernandez-Mijares, A. (2011). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, *17*(36), 3947-3958. <https://doi.org/10.2174/138161211798764915>
- Vilaro, E., Nachbagauer, C., Buzet, A., Taschner, A., Holzmann, J., & Rossmann, W. (2012). A subcomplex of human mitochondrial RNase P is a bifunctional methyltransferase—Extensive moonlighting in mitochondrial tRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research*, *40*(22), 11583-11593. <https://doi.org/10.1093/nar/gks910>
- Villareal, D. T., Robertson, H., Bell, G. I., Patterson, B. W., Tran, H., Wice, B., & Polonsky, K. S. (2010). TCF7L2 Variant rs7903146 Affects the Risk of Type 2 Diabetes by Modulating Incretin Action. *Diabetes*, *59*(2), 479-485. <https://doi.org/10.2337/db09-1169>
- Villasenor, A., Chong, D. C., & Cleaver, O. (2008). Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Developmental Dynamics*, *237*(11), 3270-3279. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21740>
- Waku, T., Nakajima, Y., Yokoyama, W., Nomura, N., Kako, K., Kobayashi, A., Shimizu, T., & Fukamizu, A. (2016). NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *Journal of Cell Science*, *129*(12), 2382-2393. <https://doi.org/10.1242/jcs.183723>
- Wang, P., Doxtader, K. A., & Nam, Y. (2016). Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Molecular Cell*, *63*(2), 306-317. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.041>
- Wang, T., Hong, T., Huang, Y., Su, H., Wu, F., Chen, Y., Wei, L., Huang, W., Hua, X., Xia, Y., Xu, J., Gan, J., Yuan, B., Feng, Y., Zhang, X., Yang, C.-G., & Zhou, X. (2015). Fluorescein Derivatives as Bifunctional Molecules for the Simultaneous Inhibiting and Labeling of FTO Protein. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(43), 13736-13739. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b06690>
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., & He, C. (2014). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, *505*(7481), 117-120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
- Wang, X., Pan, Y., Zhu, H., Hao, G., Huang, Y., Barnes, V., Shi, H., Snieder, H., Pankow, J., North, K., Grove, M., Guan, W., Demerath, E., Dong, Y., & Su, S. (2018). An epigenome-wide study of obesity in African American youth and young adults : Novel findings, replication in neutrophils, and relationship with gene expression. *Clinical Epigenetics*, *10*, 3. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0435-2>
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., & He, C. (2015). N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, *161*(6), 1388-1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>

- Wang, Y., Sun, J., Lin, Z., Zhang, W., Wang, S., Wang, W., Wang, Q., & Ning, G. (2020). M6A mRNA Methylation Controls Functional Maturation in Neonatal Murine  $\beta$ -Cells. *Diabetes*, *69*(8), 1708-1722. <https://doi.org/10.2337/db19-0906>
- Wang, Y., Zhang, L., Ren, H., Ma, L., Guo, J., Mao, D., Lu, Z., Lu, L., & Yan, D. (2021). Role of Hakai in m6A modification pathway in Drosophila. *Nature Communications*, *12*(1), 2159. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22424-5>
- Warda, A. S., Kretschmer, J., Hackert, P., Lenz, C., Urlaub, H., Höbartner, C., Sloan, K. E., & Bohnsack, M. T. (2017). Human METTL16 is a N6-methyladenosine (m6A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Reports*, *18*(11), 2004-2014. <https://doi.org/10.15252/embr.201744940>
- Watson, M. L., Macrae, K., Marley, A. E., & Hundal, H. S. (2011a). Chronic Effects of Palmitate Overload on Nutrient-Induced Insulin Secretion and Autocrine Signalling in Pancreatic MIN6 Beta Cells. *PLOS ONE*, *6*(10), e25975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025975>
- Watson, M. L., Macrae, K., Marley, A. E., & Hundal, H. S. (2011b). Chronic Effects of Palmitate Overload on Nutrient-Induced Insulin Secretion and Autocrine Signalling in Pancreatic MIN6 Beta Cells. *PLOS ONE*, *6*(10), e25975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025975>
- Wei, C., Gershowitz, A., & Moss, B. (1975). N6, O2'-dimethyladenosine a novel methylated ribonucleoside next to the 5' terminal of animal cell and virus mRNAs. *Nature*, *257*(5523), 251-253. <https://doi.org/10.1038/257251a0>
- Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., He, P. C., Shi, H., Cui, X., Su, R., Klungland, A., Jia, G., Chen, J., & He, C. (2018). Differential m6A, m6Am, and m1A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Molecular Cell*, *71*(6), 973-985.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.011>
- Winkler, R., Gillis, E., Lasman, L., Safra, M., Geula, S., Soyris, C., Nachshon, A., Tai-Schmiedel, J., Friedman, N., Le-Trilling, V. T. K., Trilling, M., Mandelboim, M., Hanna, J. H., Schwartz, S., & Stern-Ginossar, N. (2019). M6A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons. *Nature Immunology*, *20*(2), 173-182. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0275-z>
- Wu, N., Yang, M., Gaur, U., Xu, H., Yao, Y., & Li, D. (2016). Alpha-Ketoglutarate : Physiological Functions and Applications. *Biomolecules & Therapeutics*, *24*(1), 1-8. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.078>
- Wyatt, G. R. (1950). Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature*, *166*(4214), 237-238. <https://doi.org/10.1038/166237b0>
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wang, X., Ma, H.-L., Huang, C.-M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G.-B., Wang, H.-L., Zhou, Q., Wang, X.-J., ... Yang, Y.-G. (2016). Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *61*(4), 507-519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
- Xie, L.-J., Yang, X.-T., Wang, R.-L., Cheng, H.-P., Li, Z.-Y., Liu, L., Mao, L., Wang, M., & Cheng, L. (2019). Identification of Flavin Mononucleotide as a Cell-Active Artificial N6-Methyladenosine RNA Demethylase. *Angewandte Chemie International Edition*, *58*(15), 5028-5032. <https://doi.org/10.1002/anie.201900901>
- Xie, W., Ma, L. L., Xu, Y. Q., Wang, B. H., & Li, S. M. (2019). METTL3 inhibits hepatic insulin sensitivity via N6-methyladenosine modification of Fasn mRNA and promoting fatty acid metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *518*(1), 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.018>
- Xing, J., Yi, J., Cai, X., Tang, H., Liu, Z., Zhang, X., Martindale, J. L., Yang, X., Jiang, B., Gorospe, M., & Wang, W. (2015). NSun2 Promotes Cell Growth via Elevating Cyclin-Dependent Kinase 1 Translation. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(23), 4043-4052. <https://doi.org/10.1128/MCB.00742-15>



Xue, A., Wu, Y., Zhu, Z., Zhang, F., Kemper, K. E., Zheng, Z., Yengo, L., Lloyd-Jones, L. R., Sidorenko, J., Wu, Y., McRae, A. F., Visscher, P. M., Zeng, J., & Yang, J. (2018). Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes. *Nature Communications*, *9*(1), 2941. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04951-w>

Yadav, D. K., Kumar, S., Choi, E.-H., Chaudhary, S., & Kim, M.-H. (2019). Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. *Scientific Reports*, *9*(1), 4496. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40913-y>

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B. B., & Kadowaki, T. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*, *8*(11), 1288-1295. <https://doi.org/10.1038/nm788>

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., ... Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine*, *7*(8), 941-946. <https://doi.org/10.1038/90984>

Yang, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Chen, Y.-S., Xu, J.-W., Lai, W.-Y., Li, A., Wang, X., Bhattarai, D. P., Xiao, W., Sun, H.-Y., Zhu, Q., Ma, H.-L., Adhikari, S., Sun, M., Hao, Y.-J., Zhang, B., Huang, C.-M., Huang, N., ... Yang, Y.-G. (2017). 5-methylcytosine promotes mRNA export—NSUN2 as the methyltransferase and ALYREF as an m5C reader. *Cell Research*, *27*(5), 606-625. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.55>

Yang, Y., Shen, F., Huang, W., Qin, S., Huang, J.-T., Sergi, C., Yuan, B.-F., & Liu, S.-M. (2019). Glucose Is Involved in the Dynamic Regulation of m6A in Patients With Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *104*(3), 665-673. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00619>

Yankova, E., Blackaby, W., Albertella, M., Rak, J., De Braekeleer, E., Tsagkogeorga, G., Pilka, E. S., Aspris, D., Leggate, D., Hendrick, A. G., Webster, N. A., Andrews, B., Fosbeary, R., Guest, P., Irigoyen, N., Eleftheriou, M., Gozdecka, M., Dias, J. M. L., Bannister, A. J., ... Kouzarides, T. (2021). Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia. *Nature*, *593*(7860), 597-601. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03536-w>

Ye, F., Zhang, L., Jin, L., Zheng, M., Jiang, H., & Luo, C. (2014). Repair of methyl lesions in RNA by oxidative demethylation. *MedChemComm*, *5*(12), 1797-1803. <https://doi.org/10.1039/C4MD00256C>

Yoneda, S., Uno, S., Iwahashi, H., Fujita, Y., Yoshikawa, A., Kozawa, J., Okita, K., Takiuchi, D., Eguchi, H., Nagano, H., Imagawa, A., & Shimomura, I. (2013). Predominance of  $\beta$ -cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *98*(5), 2053-2061. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3832>

Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., & Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(50), 33741-33749. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33741>

Yoshitomi, H., & Zaret, K. S. (2004). Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development (Cambridge, England)*, *131*(4), 807-817. <https://doi.org/10.1242/dev.00960>

Yu, F., Wei, J., Cui, X., Yu, C., Ni, W., Bungert, J., Wu, L., He, C., & Qian, Z. (2021). Post-translational modification of RNA m6A demethylase ALKBH5 regulates ROS-induced DNA damage response. *Nucleic Acids Research*, *49*(10), 5779-5797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab415>

- Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., & Shoelson, S. E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5535), 1673-1677. <https://doi.org/10.1126/science.1061620>
- Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., He, C., & Liu, J. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discovery*, *4*(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>
- Zhang, C., & Jia, G. (2018). Reversible RNA Modification N1-methyladenosine (m1A) in mRNA and tRNA. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *16*(3), 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.03.003>
- Zhang, H., Zhang, J., Pope, C. F., Crawford, L. A., Vasavada, R. C., Jagasia, S. M., & Gannon, M. (2010). Gestational diabetes mellitus resulting from impaired beta-cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes*, *59*(1), 143-152. <https://doi.org/10.2337/db09-0050>
- Zhang, J., An, H., Ni, K., Chen, B., Li, H., Li, Y., Sheng, G., Zhou, C., Xie, M., Chen, S., Zhou, T., Yang, G., Chen, X., Wu, G., Jin, S., & Li, M. (2019). Glutathione prevents chronic oscillating glucose intake-induced  $\beta$ -cell dedifferentiation and failure. *Cell Death & Disease*, *10*(4), 321. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1552-y>
- Zhang, L.-S., Liu, C., Ma, H., Dai, Q., Sun, H.-L., Luo, G., Zhang, Z., Zhang, L., Hu, L., Dong, X., & He, C. (2019). Transcriptome-wide Mapping of Internal N7-Methylguanosine Methylome in Mammalian mRNA. *Molecular Cell*, *74*(6), 1304-1316.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.036>
- Zhang, W., Chen, M., Chen, X., Segura, B. J., & Mulholland, M. W. (2001). Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *The Journal of Physiology*, *537*(Pt 1), 231-236. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0231k.x>
- Zhang, W., Patil, S., Chauhan, B., Guo, S., Powell, D. R., Le, J., Klotsas, A., Matika, R., Xiao, X., Franks, R., Heidenreich, K. A., Sajjan, M. P., Farese, R. V., Stolz, D. B., Tso, P., Koo, S.-H., Montminy, M., & Unterman, T. G. (2006). FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver : Effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10105-10117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600272200>
- Zhang, Z., Luo, K., Zou, Z., Qiu, M., Tian, J., Sieh, L., Shi, H., Zou, Y., Wang, G., Morrison, J., Zhu, A. C., Qiao, M., Li, Z., Stephens, M., He, X., & He, C. (2020). Genetic analyses support the contribution of mRNA N6-methyladenosine (m6A) modification to human disease heritability. *Nature Genetics*, *52*(9), 939-949. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0644-z>
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y.-J., Ping, X.-L., Chen, Y.-S., Wang, W.-J., Jin, K.-X., Wang, X., Huang, C.-M., Fu, Y., Ge, X.-M., Song, S.-H., Jeong, H. S., Yanagisawa, H., Niu, Y., ... Yang, Y.-G. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Research*, *24*(12), 1403-1419. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.151>
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C.-M., Li, C. J., Vågbø, C. B., Shi, Y., Wang, W.-L., Song, S.-H., Lu, Z., Bosmans, R. P. G., Dai, Q., Hao, Y.-J., Yang, X., Zhao, W.-M., Tong, W.-M., Wang, X.-J., Bogdan, F., ... He, C. (2013). ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Molecular Cell*, *49*(1), 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., & Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology*, *11*(2), 136-140. <https://doi.org/10.1038/ni.1831>

Zhou, Y., Kong, Y., Fan, W., Tao, T., Xiao, Q., Li, N., & Zhu, X. (2020). Principles of RNA methylation and their implications for biology and medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *131*, 110731. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110731>

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L., & Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development*, *12*(7), 982-995. <https://doi.org/10.1101/gad.12.7.982>

# Annexes

Article publié en premier auteur dans le journal *Cells*

## ***Glucose regulates m<sup>6</sup>A methylation of RNA in pancreatic islets***

Florine Bornaque<sup>1</sup>, Clément Philippe Delannoy<sup>1</sup>, Emilie Courty<sup>1</sup>, Nabil Rabhi<sup>1, #</sup>, Charlène Carney<sup>1</sup>, Laure Rolland<sup>1</sup>, Maeva Moreno<sup>1</sup>, Xavier Gromada<sup>1</sup>, Cyril Bourouh<sup>1</sup>, Pauline Petit<sup>2</sup>, Emmanuelle Durand<sup>1</sup>, François Pattou<sup>2</sup>, Julie Kerr-Conte<sup>2</sup>, Philippe Froguel<sup>1</sup>, Amélie Bonnefond<sup>1</sup>, Frédéric Oger<sup>1</sup> and Jean-Sébastien Annicotte<sup>1, 3, \*</sup>

<sup>1</sup> Institut Pasteur de Lille, University of Lille, Inserm, CHU Lille, CNRS, U1283-UMR 8199-EGID, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> University of Lille, Inserm, CHU Lille, U1190-EGID, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Author to whom correspondence should be addressed.

# Present address: Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, MA02118, USA

Received: 19 September 2021 / Revised: 10 January 2022 / Accepted: 12 January 2022 / Published: 15 January 2022

(This article belongs to the Special Issue [Cellular and Molecular Biology of the Beta Cell](#))

## Abstract

Type 2 diabetes is characterized by chronic hyperglycemia associated with impaired insulin action and secretion. Although the heritability of type 2 diabetes is high, the environment, including blood components, could play a major role in the development of the disease. Amongst environmental effects, epitranscriptomic modifications have been recently shown to affect gene expression and glucose homeostasis. The epitranscriptome is characterized by reversible chemical changes in RNA, with one of the most prevalent being the m6A methylation of RNA. Since pancreatic  $\beta$  cells fine tune glucose levels and play a major role in type 2 diabetes physiopathology, we hypothesized that the environment, through variations in blood glucose or blood free fatty acid concentrations, could induce changes in m6A methylation of RNAs in pancreatic  $\beta$  cells. Here we observe a significant decrease in m6A methylation upon high glucose concentration, both in mice and human islets, associated with altered expression levels of m6A demethylases. In addition, the use of siRNA and/or specific inhibitors against selected m6A enzymes demonstrate that these enzymes modulate the expression of genes involved in pancreatic  $\beta$ -cell identity and glucose-stimulated insulin secretion. Our data suggest that environmental variations, such as glucose, control m6A methylation in pancreatic  $\beta$  cells, playing a key role in the control of gene expression and pancreatic  $\beta$ -cell functions. Our results highlight novel causes and new mechanisms potentially involved in type 2 diabetes physiopathology and may contribute to a better understanding of the etiology of this disease.

*Keywords:* epitranscriptome; insulin secretion; pancreatic beta cell; type 2 diabetes

# 1. Introduction

Glucose metabolism is physiologically regulated through a feedback loop between insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells and insulin-sensitive tissues (liver, muscle, adipose tissues), in which tissue sensitivity to insulin correlates with the magnitude of the  $\beta$ -cell response. Type 2 diabetes (T2D) is characterized by high blood glucose levels and develops due to inadequate pancreatic  $\beta$ -cell function (i.e., insulin secretion) in the face of peripheral insulin resistance. Genome-wide association studies, as well as post-mortem studies of diabetic patients' pancreas specimens, have revealed that  $\beta$ -cell dysfunction is thought to have a major role in the pathogenesis of T2D [1,2,3,4]. The restoration of normal  $\beta$ -cell mass and function has therefore become a field of intensive research seeking for the next generation of anti-diabetic drugs. Among the factors that impact the disease, obesity, physical inactivity and ageing are considered as non-genetic risk factors contributing to T2D development. These environmental factors have been reported to shape subtle and reversible modifications of DNA, named epigenetic regulations, influencing gene transcription and organ dysfunction. Although the mechanisms underlying  $\beta$ -cell dysfunction are still debated, emerging data suggest that epigenetic modifications are necessary for  $\beta$ -cell adaptation to metabolic stress [5]. Most importantly, deregulation of the epigenome (e.g., a combination of histone post-translational modifications and their interacting proteins [6]) results in the development of metabolic disorders, such as T2D [7,8,9].

The identification of specific DNA epigenetic marks and of their epigenomic modifiers that are involved in the control of  $\beta$ -cell function has been the purpose of tremendous effort for several decades [10]. In spite of these illuminating investigations on the epigenome, several other regulatory aspects of gene expression remain underestimated in the context of T2D. For example, RNAs are subjects to posttranscriptional modifications, through direct chemical modifications, editing or non-templated nucleotide additions [11]. The regulation of the transcriptome is the key to cellular processes that underpin cell biology, development, tissue function and diseases. It is now emerging that the modification status of the transcriptome is dynamic and responsive to environmental/developmental cues, exactly as for the DNA. This has altogether elicited the achievement of an epitranscriptome where post-transcriptional RNA modification coupled with the recruitment of effector RNA binding proteins and enzymes dynamically regulate genomic output and RNA function. Importantly, mutations in core-regulators of the epitranscriptome are key factors contributing to many human diseases or congenital disorders [12].

Epitranscriptomic modifications are dynamic and reversible modifications that affect RNAs fate. Among the 170 characterized epitranscriptomic modifications, one of the most prevalent in eucaryotes is m6A methylation in position N6 of adenosine [13]. The methyl group is added in a co-transcriptional manner [14,15], with the use of S-adenosylmethionine by a complex of proteins composed of the two methyltransferases METTL3 and METTL14 [16], associated with the proteins WTAP [17], KIAA1429 [18], RBM15/15B [19], ZC3H13 [20], and VIRMA [21] that facilitate the localization of the complex on specific regions of the RNA. This process is reversible since m6A methylation can be removed by two eraser enzymes, the Fat mass and obesity-associated protein (FTO) and ALKBH5 demethylases. FTO, being first identified as a susceptibility gene for obesity [22] and T2D, can remove m6A methylation from RNA in the nuclear speckles [23], whereas ALKBH5 specifically demethylates m6A-methylated RNAs in the nucleus [24]. This methylation is mainly found in the CDS and 3'UTR regions and around the stop codon, in a consensus sequence named DRACH (D = G/A/U; R = G/A; H = AUC) [25,26,27]. Once modified by m6A methylation, RNAs are recognized by reader proteins, which will affect the translation [28], splicing [29], stability [30], structure [31] or export of RNAs from the nucleus to the cytoplasm [32]. m6A methylation of RNAs plays critical roles in many physiological processes [19,33,34] but also contributes to disease development such as T2D [35]. Recent studies have demonstrated that the genetic invalidation of *Mettl3* and/or *Mettl14* in mouse pancreatic  $\beta$  cells leads to loss of  $\beta$ -cell identity, function and mass, associated with decreased insulin secretion and hyperglycemia [35,36,37,38]. Other studies have described a decrease in m6A methylation in the pancreatic islets of patients with type 2 diabetes, associated with a decreased expression of the methyltransferases METTL3 and METTL14 [35]. Finally, decreased levels of m6A methylation in blood sample of patients with type 2 diabetic are associated with increased expression levels of the demethylase FTO [39,40] that correlates positively with blood glucose concentration [40]. Although these studies identified a link between the epitranscriptome and T2D, the underlying molecular mechanisms involved in the modulation of m6A levels within pancreatic  $\beta$  cells in physiological and pathological conditions remain unknown.

Here, we tested the hypothesis that the metabolic environment of the pancreatic  $\beta$  cell could directly modulate the epitranscriptome through the regulation of m6A methylation of RNAs. We show in this study that m6A levels are decreased in T2D human islets and are regulated by glucose. We also demonstrate that the cellular localization of epitranscriptomic enzymes is regulated by glucose, suggesting that their activity is

dependent on glucose concentrations. Finally, we demonstrate that blocking these enzymes has a strong impact on  $\beta$ -cell identity and functions, highlighting a molecular link between glucose, m6A and pancreatic  $\beta$ -cell function.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animal Experiments**

Mice were housed according to European Union guidelines for the use of laboratory animals. In vivo experiments were performed in compliance with the French ethical guidelines for studies on experimental animals (animal house agreement no. 59-350294, authorization for animal experimentation, project approval by our local ethical committee no. APAFIS#2915-201511300923025v4). C57BL/6J mice were maintained under 12 h light/dark cycle. 5-weeks-old male mice were fed with normal diet or high fat diet (60% of fat, Research Diet) for 12 weeks. Metabolic phenotyping, including measurements of body weight, glycemia and glucose tolerance, was performed as described previously [8]. db/db mice (strain BKS.Cg-Dock7m+/+LeprdbJ) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA).

For mouse pancreatic islet isolation, pancreas was injected with 1.5 mg/mL of type V collagenase (C9263, Sigma, St. Louis, MO, USA) and digested at 37 °C during 10 min. After filtration with a sieve, islets were purified with polysucrose density gradient medium (from histopaque 1119, Sigma) of 1119, 1100, 1080 and 1060 g/mL. Finally, pancreatic islets were sampled between the 1100 and 1080 gradient and then handpicked under binocular microscope for better purity. Mouse pancreatic islets were then incubated during 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, in culture medium composed of RPMI 1640 and Glutamax (61870044, Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 pg/mL penicillin-streptomycin. For Fto inhibitor treatment, mouse pancreatic islets were treated during 2 h under the same conditions as described for Min6 cells (see Section 2.3).

### **2.2. Human Pancreatic Islets Studies**

Human pancreatic islets were provided by Pr. F. Pattou in the context of ECIT, JDRF funded islet distribution program and isolated according to Kerr-Conte et al., 2010 [41]. Islets were harvested from brain-dead, non-diabetic and type 2 diabetic adult human donors (Supplementary Table S1 for donor information). For palmitate treatment, islets were incubated with 5.6 mM or 20 mM glucose with or without 0.5 mM sodium palmitate



coupled with FFA-free human serum albumin during 72 h, with daily change of the medium. For treatment with the FTO inhibitor, pancreatic islets were incubated at the indicated time with 100 nM of bisantrene (B4563, Sigma). Pancreatic islets were then snap-frozen for further processing. For glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) tests, 1 h before the end of the bisantrene treatment, human islets were starved in Krebs–Ringer bicarbonate buffer supplemented with 0.5% BSA and 100 nM of bisantrene and processed for GSIS as described below.

### **2.3. Cell Culture and Treatments**

Min6 cells (Addexbio, San Diego, CA, USA) were cultured in complete Min6 medium containing DMEM medium with 4.5 g/L of glucose (31966-021, Gibco) supplemented with 15% fetal bovine serum, 100 µg/mL penicillin-streptomycin and 55 µM β-mercaptoethanol. Cells were maintained at 37 °C and 5% of CO<sub>2</sub>. For acute glucose treatment, Min6 cells were cultured in complete Min6 medium with 2.8 or 20 mM of glucose for 1, 2, 3 or 6 h. For long-term treatments, Min6 cells were incubated with 5.6 or 20 mM glucose with or without 1 mM palmitate coupled with FFA-free bovine serum albumin (BSA, A7030, Sigma) during 72 h, with a daily change of the medium. For treatments with the FTO inhibitor, cells were incubated with 100 nM of bisantrene (B4563, Sigma) in complete Min6 medium. 1 h before the end of treatment, Min6 cells were starved in Krebs–Ringer bicarbonate buffer supplemented with 0.5% BSA and 100 nM of bisantrene for glucose-stimulated insulin secretion tests.

### **2.4. siRNA Transfection**

The antibiotics were first removed from the medium by 2 washes with DMEM. Cells were then transfected with Dharmafect 1 (Horizon Discovery, Waterbeach, UK) and 25 nM of siRNA (Smartpool ON-TARGETplus siRNA, Horizon Discovery) in complete Min6 medium without antibiotics following manufacturer's instructions. Cells were lysed 48 h after treatment and further processed for RNA or protein extraction (See Supplementary Table S2 for siRNA information).

### **2.5. Glucose Stimulated Insulin Secretion and Insulin Quantification**

For GSIS, Min6 cells, mouse and human pancreatic islets were starved for 1 h with Krebs–Ringer bicarbonate buffer supplemented with 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA). Cells were then stimulated with 2.8 or 20 mM of glucose for 1 h. Insulin secretion and insulin content (obtained after lysis with 180 mM HCl and 75% ethanol, then neutralized by 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) were assessed through ELISA (mouse or human Elisa insulin kit, Mercodia, Winston Salem, NC, USA). Insulin secretion was then normalized to insulin content and

expressed as a percentage of insulin content or as a stimulation index corresponding to the fold of insulin secretion at 20 mM over 2.8 mM of glucose.

## **2.6. RNA Extraction and RT-qPCR**

Total RNA was extracted from Min6 cells using Nucleospin RNA Kit (Macherey Nagel, Allentown, PA, USA) according to manufacturer's instructions. RNA from isolated pancreatic islets were extracted using Rneasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was retrotranscribed using SuperScript III reagents (Invitrogen, Waltham, MA, USA), random hexamers and dNTPs. Expression of mRNA was quantified by real-time qPCR using gene-specific oligonucleotides (See Supplementary Table S3 for oligonucleotide information) and FastStart SYBR Green Master Mix (Roche, Basel, Switzerland). Results from Min6 cells and mouse pancreatic islets were normalized to mouse cyclophilin mRNA levels. Data from human islets were normalized to human cyclophilin mRNA levels.

## **2.7. m<sup>6</sup>A Quantification by Dot Blot**

500 ng of RNAs was used for m<sup>6</sup>A quantification through dot blot experiments. Briefly, RNAs were blotted on a nylon membrane using a dot blotter with aspiration for 15 min and fixed by UV with 130 J/cm<sup>2</sup> (254 nm). Membranes were incubated with 0.04% methylene blue and 0.5 M sodium acetate to mark total RNA. Before antibody incubation, membranes were washed with TBS-Tween 0.1% and blocked 1 h at room temperature with 5% nonfat milk in 0.1% TBS-Tween. A primary anti-m<sup>6</sup>A antibody was used to mark m<sup>6</sup>A methylation of RNAs for an overnight incubation at 4 °C (See Supplementary Table S4 for the antibodies used in this study). After washing the membrane with 0.1% TBS-Tween, they were incubated with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase. m<sup>6</sup>A-methylated RNAs were then visualized with enhanced ChemiLuminescence Western blotting substrate (Pierce, Waltham, MA, USA). Labeling of m<sup>6</sup>A-methylated RNA was normalized to total RNA using the methylene blue labeled membrane.

## **2.8. m<sup>6</sup>A Quantification by ELISA**

m<sup>6</sup>A quantification was done using the EpiQuik m<sup>6</sup>A RNA methylation Kit (Colorimetric, Epigentek, Farmingdale, NY, USA) according to the manufacturer's instructions, using 200 ng of total RNA and primary antibody against m<sup>6</sup>A modification.

## **2.9. Immunofluorescence and Quantification**

Immunofluorescence analysis were performed on pancreatic tissues that were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned at 5 μm as described previously [8]. Briefly, for immunofluorescence microscopy analyses, after antigen retrieval using citrate buffer, 5-μm formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) pancreatic sections were incubated

with the indicated antibodies (See Supplementary Table S4 for the antibodies used in this study). Immunofluorescence staining was revealed by using a fluorescein-isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (for m6A), alexa-conjugated anti-mouse (for glucagon) or anti-guinea pig (for insulin co-staining with m6A) secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI.

After different treatments, Min6 cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS during 15 min at room temperature and washed 3 times with PBS. Cells were then permeabilized with 1% PBS-Triton in the same condition. Cells were blocked in 1% PBS-BSA for 30 min at room temperature and incubated with primary antibodies for 16 h at 4 °C (See Supplementary Table S4 for the antibodies). Secondary antibodies conjugated with fluorophores (AlexaFluor secondary antibodies, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) were used to reveal immunofluorescence staining of target proteins. DAPI was used to stain nuclei. Images were processed and quantified using Macro on ImageJ Software.

## **2.10. Nuclear/Cytoplasmic Fractionation, Western Blot Analysis and Quantification**

Western blot analysis was performed as previously described [42]. Briefly, after different treatments as indicated, Min6 cells were washed twice with cold PBS supplemented with phosphatase inhibitors. Nuclear/cytoplasmic fractionation was performed using Nuclear Extract Kit (40010, Active Motif, Carlsbad, CA, USA).

Immunoblotting experiments were performed using 15 µg of total proteins. After electromigration, proteins were transferred on nitrocellulose membrane during 1 h at 110 V that were further incubated in TBS-Tween 0.05% supplemented with 5% of milk. Membranes were incubated 16 h at 4 °C with primary antibodies as indicated in blocking buffer supplemented with 3% of bovine serum albumin or milk. After washing, membranes were incubated 1 h with the secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. The revelation of luminescent bands was performed using Pierce ECL Western blotting substrate or SuperSignal West Dura Extended duration substrate (ThermoFisher) with Chemidoc Xrs+. Quantification of band signals was performed using ImageJ software.

## **2.11. Statistical Analysis**

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism 9.0 software with Mann–Whitney tests, Kolmogorov–Smirnov tests, Multiple t-tests, 1-way ANOVA with Dunnett’s post-hoc tests or 2-way ANOVA with Bonferroni’s or Tukey’s correction for multiple comparisons as indicated in the figure legends. Differences were considered statistically significant at p value < 0.05 (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001).

## 3. Results

### 3.1 m6A RNA Methylation Is Reduced in Human and Murine Pancreatic Islets

To evaluate the potential changes in the m6A methylation levels in pancreatic islets during T2D, several pathophysiological models were used, in which methylation of m6A was quantified from isolated pancreatic islets total RNA or immunofluorescence assays using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) mouse pancreata. First, m6A methylation of RNAs has been quantified in pancreatic islets isolated from C57Bl6/J mice fed with a control chow (CD) or with a high-fat diet (HFD) during 12 weeks. HFD feeding induced weight gain (Supplementary Figure S1A), increased fasting hyperglycemia (Supplementary Figure S1B) and impaired glucose tolerance (Supplementary Figure S1C,D) when compared to age-matched chow-fed mice. In this hyperglycemic context, we observed a 50% decrease ( $p = 0.0635$ ) in the m6A methylation in pancreatic islets of mice fed with HFD compared to CD (Figure 1A). Most importantly, these results were further confirmed in human pancreatic islets obtained from donors with T2D compared to non-diabetic controls (Figure 1B, mean age  $\pm$  SD,  $41.2 \pm 18.2$  for controls versus  $61 \pm 6.0$  for T2D;  $p = 0.07$ ). Indeed, m6A methylation is reduced by more than 60% ( $p = 0.008$ ) in islets from donors with T2D compared to non-diabetic islets. Finally, we compared m6A levels in FFPE pancreata obtained from 15-week-old mice fed a CD, a HFD or from the diabetic and obese mouse model db/db. Although it is well accepted that HFD represents a model of  $\beta$ -cell compensation during insulin resistance more than  $\beta$ -cell failure per se, it has been previously reported that the loss of  $\beta$ -cell mass and function is observed in 15-week-old db/db mice when compared to younger db/db mice [43]. Here again, we observed a decrease of immunofluorescent staining for m6A methylation in HFD-fed, an effect that was exacerbated in pancreas from db/db mice when compared to age-matched, CD fed wild type controls (Figure 1C). These results suggest that m6A levels are sensible to a hyperglycemic, T2D environment and suggest a possible role of m6A methylation in the loss of  $\beta$  cell functions during T2D.

### 3.2. High Glucose Concentrations Reduce m6A Methylation in Mouse $\beta$ -Cell Line and Human Pancreatic Islets

Since T2D is characterized by a chronic hyperglycemia, we then investigated the possible role of modulating glucose concentrations to better understand the potential mechanisms involved in the dynamic regulation of m6A methylation observed in pancreatic islets from donors with T2D. Dot blot experiments demonstrate that a treatment with 20 mM glucose

induced a 20% to 40% decrease in m6A methylation after 2 and 3 h of treatment compared to 2.8 mM glucose treatment in the mouse pancreatic  $\beta$  cell line Min6 (Figure 2A,B). Immunofluorescence analysis of m6A methylation of RNA in Min6 cells further confirmed that 20 mM glucose incubation led to a global decrease of m6A methylation both in the cytoplasm and in the nucleus, when compared to 2.8 mM glucose concentration (Figure 2C,D). Interestingly, in human pancreatic islets isolated from control, non-diabetic donors, we observe that treating those islets for 1 h with 20 mM glucose also induced a decrease of 20 to 30 % in m6A RNA methylation compared to a 2.8 mM glucose treatment (Figure 2E,F). Altogether, these data suggest that high glucose concentrations similarly decrease m6A methylation of RNAs in human pancreatic islets and mouse  $\beta$ -cell lines.

### **3.3. Glucose Induces Changes in mRNA Expression and Protein Localization of *Mettl3* and *Alkbh5* in Mouse Min6 Cells**

The decrease in global m6A methylation observed after a glucose treatment could be mediated by the loss of expression or activity of m6A methyltransferases and/or an increased expression or activity of m6A demethylases. Thus, we studied the expression of selected methyltransferases and demethylases involved in the regulation of m6A methylations in the same conditions than described above. Upon 20 mM glucose, we observed that the mRNA levels of *Alkbh5* and *Fto* encoding demethylases and of *Mettl3* encoding methyltransferase were increased by 45%, 35% and 40%, respectively (Figure 3A–C), suggesting that the decrease in m6A methylation observed after glucose treatment may possibly be regulated by a rise in the mRNA expression of demethylases, which could be compensated by a concomitant increased expression of *Mettl3*. The increased mRNA levels of m6A enzymes were not associated to a rise of the expression of the early glucose responsive genes *Egr1*, *Irf2*, *Id2* and *Tob1* (Supplementary Figure S2A), suggesting that these genes were not directly involved in the transcriptional regulation of *Alkbh5*, *Fto* and *Mettl3* by glucose. In addition, the increase in mRNA levels was not associated to a concomitant increase in protein levels since short-term, acute treatment of Min6 cells with 20 mM of glucose for 3 or 6 h did not induce a rise in *METTTL3* and *ALKBH5* protein levels compared to 2.8 mM of glucose concentration (Supplementary Figure S2B–E). This suggested that the enzymatic activity or nuclear localization of these enzymes, rather than their protein levels, could mediate the decrease in global m6A methylation upon acute glucose treatment. Therefore, since the enzymatic activity of these enzymes could also depend on their subcellular localization, we analyzed the effect of glucose on their nuclear and cytoplasmic shuttling. Although we could not detect significant changes in nuclear

versus cytoplasmic localization of these enzymes through classical biochemical fractionation approaches (Supplementary Figure S3A–E), immunofluorescence analysis demonstrated that glucose treatment induced variations in the localization of ALKBH5 and METTL3. Indeed, the ALKBH5 protein, which is predominantly cytoplasmic, increased its nuclear localization upon 20 mM glucose treatment (Figure 3D,E). Conversely, the METTL3 protein, which is mainly nuclear in basal conditions, acquires also a cytoplasmic localization upon glucose treatment (Figure 3F,G). Altogether, these data suggest that glucose not only increases the mRNA levels of *Mettl3*, *Fto* and *Alkbh5* but also induces variations in the localization of those m6A enzymes, probably allowing access of demethylases to methylated mRNAs in the nucleus.

### **3.4. A Combination of Glucose and Palmitate Treatment Increases m6A Methylation in Pancreatic $\beta$ Cell Line and Human Islets Associated to *Alkbh5* Downregulation**

In addition to chronic hyperglycemia during T2D, insulin resistance also increases the level of circulating free fatty acids (FFA), leading to dyslipidemia and an increased risk of cardiovascular disease [44]. This rise in circulating FFA contributes to  $\beta$ -cell dysfunctions and insulin secretion defects [45,46]. We therefore tested whether free fatty acids could also modulate m6A RNA methylation by treating our different experimental models with palmitate, a saturated fatty acid previously shown to trigger  $\beta$ -cell stress and insulin secretion defects [47]. We first tested the efficacy of a combination treatment of 1 mM palmitate and 20 mM glucose for 72 h on impairing insulin secretion and inducing the expression of genes involved in ER stress, previously known to be regulated by a lipotoxic stress [45]. As expected, the palmitate treatment reduced glucose-stimulated insulin secretion in Min6 cells (Figure 4A). In the absence of palmitate, we observed that insulin secretion represented approximately 36% of the intracellular insulin content whereas it decreased to approximately 23% after a 72 h treatment with 1 mM of palmitate. It has been previously shown that palmitate induces the expression of ER stress genes [48]. qPCR experiments demonstrated a 50% increase of the mRNA levels of *Atf4* and the spliced form of *Xbp1*, without changing the levels of *Chop* (Figure 4B). Through immunofluorescence analysis, we then studied the effect of palmitate on m6A methylation and on the expression of m6A regulating enzymes in Min6 cells (Figure 4C,D). We observed that palmitate induces an increase of 70% of m6A methylation of total RNA in Min6 cells. Our results also show a significant effect on decreasing the expression of *Alkbh5* demethylases after palmitate treatment (Figure 4E), which could partly explain the increase in m6A methylation. Although a short-term treatment with glucose had no effect

on ALKBH5 and METTL3 protein levels (Supplementary Figure S2A–D), chronic treatment with glucose induced an increase in the expression of both proteins, an effect that was abolished by palmitate stimulation (Figure 4F,G). We then carried out the same experiment in human pancreatic islets (Figure 4H). The analysis of the expression of m6A enzymes by qPCR showed a 20% decreased expression of ALKBH5 in the presence of palmitate. Together, these results suggest that a chronic treatment combining glucose and palmitate increases m6A RNA methylation in Min6 cells and human pancreatic islets, probably through reducing the mRNA and/or protein levels of the ALKBH5 demethylase.

### **3.5. Chronic Palmitate Treatment Does Not Modulate m6A Methylation in Pancreatic $\beta$ Cell Line and Human Islets at Low Glucose Concentration**

To better appreciate the metabolic factor triggering the modulation of m6A RNA methylation upon cotreatment with palmitate and glucose, we treated Min6 cells and human islets for 72 h with low glucose (5.6 mM) with or without palmitate. Similar to Min6 cells treated for 72 h with 20 mM glucose (Figure 4A), incubating Min6 cells with 5.6 mM glucose and 1 mM palmitate for 72 h also impaired GSIS (Figure 5A). Interestingly, palmitate, upon low glucose concentration, did not induced ER stress, as demonstrated by the analysis of Xbp1s, Atf4 and Chop mRNA expression levels through qPCR experiments (Figure 5B). In this metabolic context, m6A methylation of total RNA in Min6 cells, as well as the expression levels of enzymes regulating this epitranscriptomic mark were not changed by palmitate (Figure 5D,E). These results were confirmed in human islets, in which palmitate decreased GSIS without altering ALKBH5, FTO or METTL3 levels (Figure 5F,G). These data demonstrate that the chronic cotreatment with palmitate at a low glucose concentration may not be sufficient to modulate m6A methylation and/or m6A enzymes. Altogether, our results obtained upon low (Figure 5) and high (Figure 4) glucose concentration suggest that a chronic treatment combining 20 mM glucose and palmitate has a major effect on regulating m6A levels and gene expression of m6A related-enzymes.

### **3.6. m6A Enzymes Regulates the Expression of Genes Involved in the Function and Identity of Pancreatic $\beta$ Cells**

In order to study the potential role of those enzymes involved in m6A methylation of RNA within the pancreatic  $\beta$  cell, we transfected Min6 cells with different siRNAs targeting these enzymes. After 48 h of treatment, we observe that these siRNAs were effective against their respective target, with at least a 50% reduction of their respective transcripts (Figure

6A,D,G). In addition, we observed that the siRNA directed against *Mettl3* induced a concomitant reduction in the expression of the *Fto* demethylase of about 40%, which suggests a compensatory process (Figure 6G). Subsequently, we studied the expression of genes involved in maintaining the identity and function of the pancreatic  $\beta$  cell, including genes involved in the transcriptional regulation (*Foxo1*, *MafA*, *Pdx1*, *Pax4* and *Pcaf/Kat2b*) or the insulin secretion process (*Gck*, *Glut2/Slc2a2*, *Kir6.2/Kcnj11*, *Ins1* and *Ins2*). For siRNAs directed against *Alkbh5*, we observed a slight decrease in the expression of the key marker of  $\beta$  cell identity, *MafA* (Figure 6B). In addition, an increase of around 30% in the expression of glucokinase (*Gck*) and *Kir6.2* was found upon *Alkbh5* knock-down (Figure 6C). Knocking down *Fto* through siRNA resulted in a significant increase of *Pax4* and *Pcaf* mRNA expression levels, as well as an increase in *Gck* and *Glut2* levels (Figure 6F). Conversely, *Ins1* mRNA levels were decreased in *Fto*-deficient Min6 cells (Figure 6F). Finally, transfecting Min6 cells with siRNAs targeting *Mettl3* mostly induced a halving of *Foxo1*, *MafA* and *Glut2* mRNA expression levels (Figure 6H,I). Altogether, our data suggest that siRNAs directed against demethylases rather induce an increase in the expression of the genes involved in the identity and function of pancreatic  $\beta$  cells, while those directed against the *Mettl3* methyltransferase rather decreased the expression of identity genes and may have contributed to maintaining the identity and function of pancreatic  $\beta$  cells.

### **3.7. Knock-Down or Pharmacological Inhibition of FTO Stimulates Glucose-Induced Insulin Secretion**

To assess the potential effects of the FTO demethylase on pancreatic  $\beta$  cell function, we knocked down the *Fto* gene in Min6 cells using gene-specific siRNA and evaluated glucose-stimulated insulin secretion. 48 h after a treatment with the *Fto* siRNAs, we observed that knocking-down *Fto* expression in Min6 cells increased insulin secretion in response to 20 mM glucose (Figure 7A). Since the genetic depletion of *Fto* in Min6 cells increased  $\beta$ -cell identity and function genes (Figure 6), as well as GSIS (Figure 7A), we put forth the hypothesis that the pharmacological inhibition of this enzyme could also modulate  $\beta$ -cell functions. We took advantage of the recently described FTO inhibitor bisantrene to block FTO enzymatic activity [49]. We observed that treating Min6 cells with bisantrene potentiated insulin secretion in response to 20 mM glucose (Figure 7B).

This effect was further confirmed in isolated mouse islets. Indeed, treating pancreatic islets isolated from lean, non-diabetic C57Bl/6J mice with bisantrene potentiated insulin secretion after a 20 mM glucose stimulation (Figure 7C,  $p = 0.0112$ ). We then treated



human pancreatic islets to evaluate the potential of bisantrene to stimulate insulin secretion in response to glucose. Although 1-h treatment with 100 nM bisantrene slightly, albeit not significantly, increased m6A methylation of total RNA from human islets, no effects of bisantrene on global m6A methylation were observed after 4 h or 24 h treatments (Figure 7D,F). Interestingly, treating human islets with bisantrene for 24 h significantly increased glucose-stimulated insulin secretion (Figure 7G). Altogether, our data show that the genetic depletion and pharmacological inhibition of FTO potentiate glucose-stimulated insulin secretion, both in mouse and human pancreatic islets, suggesting that FTO could play a critical role in the negative regulation of insulin secretion.

## 4. Discussion

Here, we report that m6A methylation is reduced in pancreatic islets isolated from mice subjected to a metabolic stress and from the obese and diabetic leptin receptor-deficient db/db mouse model. More interesting is our observation that m6A methylation of RNAs is strongly decreased in human pancreatic islets from T2D patients, in line with recent reports showing a decrease in m6A methylation in human samples [35,39,40]. Altogether our data highlight that the diabetic status may contribute to m6A demethylation of RNAs within pancreatic islets, and probably within the insulin-producing  $\beta$  cells. To better understand the potential molecular mechanisms linking hyperglycemia, hyperlipidemia and m6A RNA methylation, we developed in vitro strategies to model hyperglycemia and study the regulation of m6A methylation. Here we show that exposure of pancreatic islets or mouse  $\beta$ -cell lines to high glucose concentration strongly decreases m6A RNA methylation in our pancreatic  $\beta$ -cell models. Strikingly, recent data obtained on diabetic human blood samples have shown a negative correlation between glucose concentration and m6A methylation of RNAs [40]. We can speculate that the effect of a diabetic environment, characterized by chronic hyperglycemia, on m6A methylation of RNAs, could therefore be mediated, at least in part, by glucose.

During T2D, the expression of FTO is increased and positively correlates with glucose concentration [39,40]. The FTO locus is a predisposing gene for obesity [22]. In mice, its genetic deficiency induces, in white adipose tissue, an increase in lipid catabolism and carbohydrate metabolism as well as a reduction of the fat mass [50]. Conversely, Fto overexpression causes an increase in food intake and fat mass [51]. In humans, a variant of the gene inducing its overexpression causes an increase in food intake, due to reduction in RNA methylation of ghrelin, an orexigenic hormone, and causes a decrease in its translation [52]. FTO demethylase therefore plays an important role in the regulation of metabolism, in particular in adipose tissue. It would therefore be interesting to develop a mouse model invalidated for Fto specifically in pancreatic  $\beta$  cells in order to study its role in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell metabolism. Interestingly, besides Fto, we also observed an increased expression of the Alkbh5 and Mettl3 enzymes upon high glucose concentrations. In addition, we identified that glucose modifies the subcellular localization of these enzymes, with an increase in the ALKBH5 protein in the nucleus, the main site of m6A methylation of RNAs as well as an increase in METTL3 in the cytoplasm, where methylation activity is less important [53]. Regretfully, due to the lack of specific and reliable anti-FTO antibodies, we could not evaluate its cellular localization upon glucose

treatment. Although the precise function of ALKBH5, FTO and METTL3 in pancreatic  $\beta$  cells remains unknown, as well as their specific function and their target RNAs in the cytoplasm or nucleus, it is tempting to speculate that these enzymes may play a fundamental role in pancreatic  $\beta$ -cell function or identity, and, consequently, T2D pathophysiology. Indeed, the use of siRNA has allowed us to better appreciate their roles in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell genes. In addition, we observed different effects on protein levels of these enzymes upon acute versus chronic glucose treatment. Although short-term glucose treatment induced their mRNA levels, despite changing the expression level of early glucose induced genes such as Egr1, Irf2, Id2 and Tob1, changes in nuclear/cytoplasmic localization and decreased m6A methylation, a chronic glucose treatment rather increased their global protein levels. Whether the regulation by glucose of m6A enzymes is direct or indirect, involves other glucose-responsive transcriptional regulators or modulates m6A-dependent or independent mRNA half-life remains to be investigated. Our data provide new insights as to the potential role of the m6A machinery in the adaptive response of the  $\beta$ -cell to acute versus chronic stress conditions.

We found that siRNAs directed against demethylases induced an increase in the expression of genes mainly involved in the function of pancreatic  $\beta$  cells such as glucokinase, Glut2 (Slc2a2), Kir6.2 but also Pax4, a transcription factor involved in the identity of the pancreatic  $\beta$  cell. Thus, demethylases may play a role in inhibiting the expression of genes involved in the identity and function of pancreatic  $\beta$  cells. On the other hand, we demonstrate that siRNAs directed against the methyltransferase Mettl3 induced a decrease in the expression of Foxo1 and MafA involved in the identity of the pancreatic  $\beta$  cells, and of Glut2, involved in the secretion of insulin in response to glucose. Although their precise roles in maintaining  $\beta$ -cell identity remain unknown, recent data suggest that the silencing of methyltransferases impacts the insulin/IGF1-Akt-Pdx1 pathway [35] with hypomethylation in mRNA of the majority of the genes involved in this pathway, leading to altered  $\beta$ -cell proliferation and a decrease in insulin secretion, which is also a hallmark of T2D. Thus, while m6A demethylases may play a role in altering  $\beta$ -cell function, m6A methyltransferases may be involved in maintaining the identity and function of pancreatic  $\beta$  cells, probably through the methylation of the mRNAs of these genes. Whether m6A methylation of  $\beta$ -cell identity genes controls their fate and/or expression remain to be studied. Interestingly, our data demonstrate that the use of the pharmacological FTO inhibitor bisantrene improved  $\beta$ -cell function through an increase of glucose-stimulated insulin secretion. This suggests that FTO may be involved in the downregulation of insulin secretion, and that targeting FTO could improve glucose homeostasis. Recent studies

have shown that disabling methyltransferases activity by siRNA or specific  $\beta$ -cell knockout in mice results in reduced m6A methylation and impairs insulin secretion [35,36,37]. Based on these observations, we can speculate that the increase in the expression of FTO demethylase, as observed in blood cells of T2D patients [39,40] may modulate a set of genes that is also regulated by methyltransferases, finally leading to reduce their methylation and to subsequently impair insulin secretion. Whether m6A methylation is directly modulated by bisantrene and/or knock-down of m6A enzymes, as well as the genes that are differentially methylated and directly or indirectly affected by the inhibition of FTO activity or expression, remains unknown. Indeed, our data in Min6 cells, mouse and human pancreatic islets treated with bisantrene reveal that the kinetic of FTO inhibition is key to improve GSIS, probably without affecting global m6A methylation. A limitation of our study is that the  $\beta$ -cell specific RNAs targeted by m6A demethylases and methyltransferases remain to be identified, as well as the contribution of other islet cell types in the glucose-dependent variations of m6A methylation. In addition, we observed controversial results using knock-down experiments on  $\beta$ -cell marker expression, such as MafA or Ins1. We can hypothesize that compensatory mechanisms or m6A independent effects may explain these discrepancies. In addition, pharmacological inhibition of FTO or its knock-down, though having similar effect on GSIS, may activate different molecular pathways. Further investigations using targeted qRT-PCR based approaches [54] or untargeted m6A sequencing [25,55] are thus required to better understand the molecular mechanisms linking FTO inhibition, m6A methylation and  $\beta$ -cell identity gene expression in mouse and human islets. This future data will probably help us to better understand the discrepancies that we identified in this study.

As circulating free fatty acid levels are increased in patients with T2D, we also studied their effects on RNA methylation. We observe that palmitate, in addition to inducing the expression of ER stress genes and to impairing insulin secretion [45], also increases global levels of m6A methylation of RNAs. Interestingly, this effect was observed upon chronic high glucose treatment, suggesting that glucolipotoxicity might contribute to modulate m6A methylation levels. Based on our results showing a decreased expression of ALKBH5 demethylase in human pancreatic islets treated with palmitate, this suggests that the increased m6A levels upon exposure to palmitate may probably be associated with altered ALKBH5 expression. The prolonged exposure to a combination of saturated fatty acids and high glucose may contribute to  $\beta$ -cell failure [47]. Intriguingly, when compared to the effects observed in vitro in pancreatic islets treated with glucose and palmitate, we observed decreased global levels of m6A methylation of RNAs in pancreatic

islets obtained from mouse models of diabetes or T2D donors (Figure 1). These discrepancies might arise from the glucolipotoxic stress by itself, which is different in vitro (i.e., in culture) versus in vivo (i.e., in the whole body). The time of exposure to glucose and FFAs, the nature and concentration of circulating FFAs, the contribution of multi-organ crosstalk, are potential cues that may contribute to the complex nature of this stress that differentially modulates m6A methylation of RNAs, as observed in this study. The recent identification of mechanisms and pathways responsible for human  $\beta$ -cell failure upon glucolipotoxicity and recovery of  $\beta$ -cell function provides insights into T2D [56] and may help to elucidate the potential contribution of m6A methylation in the regulation of failure and recovery upon glucolipotoxic stress. Although our data concerning the effects of palmitate on m6A methylation need to be confirmed in T2D human islets, as well as the effects of other FFAs, further investigations are warranted to better appreciate the pathophysiological contributions of FFAs to m6A RNA methylation and their specific target RNAs.

Overall, we have demonstrated that the environment, in particular the glucose concentration, modulates m6A methylations and plays a crucial role in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell function, affecting key enzymes involved in the regulation of the epitranscriptome. We have identified that targeting the FTO/m6A axis could significantly improve insulin secretion in non-diabetic mouse and human pancreatic islets, suggesting that targeting FTO signaling by effective inhibitors such as bisantrene could be relevant for T2D therapy. Although we did not measure the metabolic effect of bisantrene in preclinical diabetic models such as Db/Db mice, our results may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in the development of metabolic diseases and identify potential therapeutic targets.

## Supplementary Materials

The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11020291>  
Table S1: Human islets donor information; Table S2: List of siRNA used in this study; Table S3: List of oligonucleotides used in qPCR experiments; Table S4: List of antibodies used for Dot Blot or Immunofluorescence experiments. Supplementary Figure S1: Metabolic phenotyping of CD and HFD fed mice; Supplementary Figure S2: mRNA levels of early glucose responder genes and protein levels of m6A reader and erasers after glucose treatment; Supplementary Figure S3: protein localization of m6A reader and erasers after glucose treatment.

## Author Contributions

F.B. performed most of the experiments of this study. C.P.D., E.C., N.R., C.C., L.R., M.M., X.G., C.B. and E.D. contributed to the in vivo and cellular experiments. P.P., F.P., J.K.-C., P.F., A.B. and F.O. provided reagents (J.K.-C. and F.P. provided human islets) and data and/or discussed the results from the study. J.-S.A. designed the study, supervised the project, contributed to experiments and/or their analysis and the funding of this project. F.B., C.P.D. and J.-S.A. wrote and/or edited the manuscript. J.-S.A. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

This work was supported by I-SITE ULNE (EpiRNAdiab Sustain grant to F.B. and J.-S.A.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) grants « European Genomic Institute for Diabetes » (E.G.I.D, ANR-10-LABX-46) and ANR BETAPLASTICITY (ANR-17-CE14-0034 to J.-S.A.), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, to J.-S.A.), INSERM, CNRS, Institut Pasteur de Lille (CPER CTRL Melodie, to E.C. and J.-S.A.), Association pour la Recherche sur le Diabète (to J.-S.A.), Université de Lille, Fondation pour la Recherche Médicale (to F.B. and J.-S.A., FDT202106013015), Hauts de France Region Council (contract\_20000007) and Métropole Européenne de Lille (contract-2020-ESR-02), F.E.D.E.R. (Fonds Européen de Développement Régional), the French State (contract n°2019-R3-CTRL\_IPL\_Phase3 to E.C. and J.-S.A.) and Société Francophone du Diabète (to J.-S.A.).

## **Institutional Review Board Statement**

In vivo experiments were performed in compliance with the French ethical guidelines for studies on experimental animals (animal house agreement no. 59-350294, authorization for animal experimentation, project approval by our local ethical committee no. APAFIS#2915-201511300923025v4).

**Acknowledgments:** We thank Yasmine Sebti, Bertrand Blondeau, Raphaël Scharfmann and members of the INSERM U1283/CNRS UMR 8199/EGID for helpful discussions and critical reading of our manuscript. Human islets were provided through the JDRF award 31-2008-416 (ECIT Islet for Basic Research program). The authors thank UMS2014-US41 and the Experimental Resources platform from Université de Lille, especially Cyrille Degraeve, Mélanie Besegher and Julien Devassine for animal care.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ndiaye, F.K.; Ortalli, A.; Canouil, M.; Huyvaert, M.; Salazar-Cardozo, C.; Lecoœur, C.; Verbanck, M.; Pawlowski, V.; Boutry, R.; Durand, E.; et al. Expression and Functional Assessment of Candidate Type 2 Diabetes Susceptibility Genes Identify Four New Genes Contributing to Human Insulin Secretion. *Mol. Metab.* 2017, 6, 459–470.
2. Ohn, J.H.; Kwak, S.H.; Cho, Y.M.; Lim, S.; Jang, H.C.; Park, K.S.; Cho, N.H. 10-Year Trajectory of  $\beta$ -Cell Function and Insulin Sensitivity in the Development of Type 2 Diabetes: A Community-Based Prospective Cohort Study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016, 4, 27–34.
3. Weir, G.C.; Bonner-Weir, S. Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction during Progression to Diabetes. *Diabetes* 2004, 53 (Suppl. 3), S16–S21.
4. Levy, J.; Atkinson, A.B.; Bell, P.M.; McCance, D.R.; Hadden, D.R. Beta-Cell Deterioration Determines the Onset and Rate of Progression of Secondary Dietary Failure in Type 2 Diabetes Mellitus: The 10-Year Follow-up of the Belfast Diet Study. *Diabet. Med.* 1998, 15, 290–296.
5. De Jesus, D.F.; Kulkarni, R.N. Epigenetic Modifiers of Islet Function and Mass. *Trends Endocrinol. Metab.* 2014, 25, 628–636.
6. Rodriguez, R.; Miller, K.M. Unravelling the Genomic Targets of Small Molecules Using High-Throughput Sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 2014, 15, 783–796.
7. Mouchiroud, L.; Eichner, L.J.; Shaw, R.J.; Auwerx, J. Transcriptional Coregulators: Fine-Tuning Metabolism. *Cell Metab.* 2014, 20, 26–40.
8. Rabhi, N.; Denechaud, P.-D.; Gromada, X.; Hannou, S.A.; Zhang, H.; Rashid, T.; Salas, E.; Durand, E.; Sand, O.; Bonnefond, A.; et al. KAT2B Is Required for Pancreatic Beta Cell Adaptation to Metabolic Stress by Controlling the Unfolded Protein Response. *Cell Rep.* 2016, 15, 1051–1061.
9. Rabhi, N.; Hannou, S.A.; Froguel, P.; Annicotte, J.-S. Cofactors As Metabolic Sensors Driving Cell Adaptation in Physiology and Disease. *Front. Endocrinol.* 2017, 8, 304.
10. Arnes, L.; Sussel, L. Epigenetic Modifications and Long Noncoding RNAs Influence Pancreas Development and Function. *Trends Genet.* 2015, 31, 290–299.
11. Zhao, B.S.; Roundtree, I.A.; He, C. Post-Transcriptional Gene Regulation by mRNA Modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017, 18, 31–42.
12. Varma Kadumuri, R.; Chandra Janga, S. Epitranscriptomic Code and Its Alterations in Human Disease. *Trends Mol. Med.* 2018, 24, 886–903.
13. Jones, J.D.; Monroe, J.; Koutmou, K.S. A Molecular-Level Perspective on the Frequency, Distribution, and Consequences of Messenger RNA Modifications. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2020, 11, e1586.
14. Slobodin, B.; Han, R.; Calderone, V.; Vrieling, J.A.F.O.; Loayza-Puch, F.; Elkon, R.; Agami, R. Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-Transcriptional N6-Adenosine Methylation. *Cell* 2017, 169, 326–337.e12.
15. Huang, H.; Weng, H.; Zhou, K.; Wu, T.; Zhao, B.S.; Sun, M.; Chen, Z.; Deng, X.; Xiao, G.; Auer, F.; et al. Histone H3 Trimethylation at Lysine 36 Guides M6A RNA Modification Co-Transcriptionally. *Nature* 2019, 567, 414–419.



16. Liu, J.; Yue, Y.; Han, D.; Wang, X.; Fu, Y.; Zhang, L.; Jia, G.; Yu, M.; Lu, Z.; Deng, X.; et al. A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-Adenosine Methylation. *Nat. Chem. Biol.* 2014, 10, 93–95.
17. Ping, X.-L.; Sun, B.-F.; Wang, L.; Xiao, W.; Yang, X.; Wang, W.-J.; Adhikari, S.; Shi, Y.; Lv, Y.; Chen, Y.-S.; et al. Mammalian WTAP Is a Regulatory Subunit of the RNA N6-Methyladenosine Methyltransferase. *Cell Res.* 2014, 24, 177–189.
18. Schwartz, S.; Mumbach, M.R.; Jovanovic, M.; Wang, T.; Maciag, K.; Bushkin, G.G.; Mertins, P.; Ter-Ovanesyan, D.; Habib, N.; Cacchiarelli, D.; et al. Perturbation of M6A Writers Reveals Two Distinct Classes of mRNA Methylation at Internal and 5' Sites. *Cell Rep.* 2014, 8, 284–296.
19. Patil, D.P.; Chen, C.-K.; Pickering, B.F.; Chow, A.; Jackson, C.; Guttman, M.; Jaffrey, S.R. M(6)A RNA Methylation Promotes XIST-Mediated Transcriptional Repression. *Nature* 2016, 537, 369–373.
20. Wen, J.; Lv, R.; Ma, H.; Shen, H.; He, C.; Wang, J.; Jiao, F.; Liu, H.; Yang, P.; Tan, L.; et al. Zc3h13 Regulates Nuclear RNA M6A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Mol. Cell* 2018, 69, 1028–1038.e6.
21. Yue, Y.; Liu, J.; Cui, X.; Cao, J.; Luo, G.; Zhang, Z.; Cheng, T.; Gao, M.; Shu, X.; Ma, H.; et al. VIRMA Mediates Preferential M6A mRNA Methylation in 3'UTR and near Stop Codon and Associates with Alternative Polyadenylation. *Cell Discov.* 2018, 4, 10.
22. Dina, C.; Meyre, D.; Gallina, S.; Durand, E.; Körner, A.; Jacobson, P.; Carlsson, L.M.S.; Kiess, W.; Vatin, V.; Lecoeur, C.; et al. Variation in FTO Contributes to Childhood Obesity and Severe Adult Obesity. *Nat. Genet.* 2007, 39, 724–726.
23. Jia, G.; Fu, Y.; Zhao, X.; Dai, Q.; Zheng, G.; Yang, Y.; Yi, C.; Lindahl, T.; Pan, T.; Yang, Y.-G.; et al. N6-Methyladenosine in Nuclear RNA Is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 885–887.
24. Zheng, G.; Dahl, J.A.; Niu, Y.; Fedorcsak, P.; Huang, C.-M.; Li, C.J.; Vågbo, C.B.; Shi, Y.; Wang, W.-L.; Song, S.-H.; et al. ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase That Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Mol. Cell* 2013, 49, 18–29.
25. Dominissini, D.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Schwartz, S.; Salmon-Divon, M.; Ungar, L.; Osenberg, S.; Cesarkas, K.; Jacob-Hirsch, J.; Amariglio, N.; Kupiec, M.; et al. Topology of the Human and Mouse M6A RNA Methylomes Revealed by M6A-Seq. *Nature* 2012, 485, 201–206.
26. Ke, S.; Alemu, E.A.; Mertens, C.; Gantman, E.C.; Fak, J.J.; Mele, A.; Haripal, B.; Zucker-Scharff, I.; Moore, M.J.; Park, C.Y.; et al. A Majority of M6A Residues Are in the Last Exons, Allowing the Potential for 3' UTR Regulation. *Genes Dev.* 2015, 29, 2037–2053.
27. Meyer, K.D.; Saletore, Y.; Zumbo, P.; Elemento, O.; Mason, C.E.; Jaffrey, S.R. Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons. *Cell* 2012, 149, 1635–1646.
28. Wang, X.; Zhao, B.S.; Roundtree, I.A.; Lu, Z.; Han, D.; Ma, H.; Weng, X.; Chen, K.; Shi, H.; He, C. N(6)-Methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* 2015, 161, 1388–1399.

29. Xiao, W.; Adhikari, S.; Dahal, U.; Chen, Y.-S.; Hao, Y.-J.; Sun, B.-F.; Sun, H.-Y.; Li, A.; Ping, X.-L.; Lai, W.-Y.; et al. Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates MRNA Splicing. *Mol. Cell* 2016, 61, 507–519.
30. Wang, X.; Lu, Z.; Gomez, A.; Hon, G.C.; Yue, Y.; Han, D.; Fu, Y.; Parisien, M.; Dai, Q.; Jia, G.; et al. N6-Methyladenosine-Dependent Regulation of Messenger RNA Stability. *Nature* 2014, 505, 117–120.
31. Liu, N.; Zhou, K.I.; Parisien, M.; Dai, Q.; Diatchenko, L.; Pan, T. N6-Methyladenosine Alters RNA Structure to Regulate Binding of a Low-Complexity Protein. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45, 6051–6063.
32. Roundtree, I.A.; Luo, G.-Z.; Zhang, Z.; Wang, X.; Zhou, T.; Cui, Y.; Sha, J.; Huang, X.; Guerrero, L.; Xie, P.; et al. YTHDC1 Mediates Nuclear Export of N6-Methyladenosine Methylated MRNAs. *Elife* 2017, 6, e31311.
33. Geula, S.; Moshitch-Moshkovitz, S.; Dominissini, D.; Mansour, A.A.; Kol, N.; Salmon-Divon, M.; Hershkovitz, V.; Peer, E.; Mor, N.; Manor, Y.S.; et al. Stem Cells. M6A MRNA Methylation Facilitates Resolution of Naïve Pluripotency toward Differentiation. *Science* 2015, 347, 1002–1006.
34. Fustin, J.-M.; Doi, M.; Yamaguchi, Y.; Hida, H.; Nishimura, S.; Yoshida, M.; Isagawa, T.; Morioka, M.S.; Kakeya, H.; Manabe, I.; et al. RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell* 2013, 155, 793–806.
35. De Jesus, D.F.; Zhang, Z.; Kahraman, S.; Brown, N.K.; Chen, M.; Hu, J.; Gupta, M.K.; He, C.; Kulkarni, R.N. M6A MRNA Methylation Regulates Human  $\beta$ -Cell Biology in Physiological States and in Type 2 Diabetes. *Nat. Metab.* 2019, 1, 765–774.
36. Liu, J.; Luo, G.; Sun, J.; Men, L.; Ye, H.; He, C.; Ren, D. METTL14 Is Essential for  $\beta$ -Cell Survival and Insulin Secretion. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2019, 1865, 2138–2148.
37. Men, L.; Sun, J.; Luo, G.; Ren, D. Acute Deletion of METTL14 in  $\beta$ -Cells of Adult Mice Results in Glucose Intolerance. *Endocrinology* 2019, 160, 2388–2394.
38. Wang, Y.; Sun, J.; Lin, Z.; Zhang, W.; Wang, S.; Wang, W.; Wang, Q.; Ning, G. M6A MRNA Methylation Controls Functional Maturation in Neonatal Murine  $\beta$ -Cells. *Diabetes* 2020, 69, 1708–1722.
39. Shen, F.; Huang, W.; Huang, J.-T.; Xiong, J.; Yang, Y.; Wu, K.; Jia, G.-F.; Chen, J.; Feng, Y.-Q.; Yuan, B.-F.; et al. Decreased N(6)-Methyladenosine in Peripheral Blood RNA from Diabetic Patients Is Associated with FTO Expression Rather than ALKBH5. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015, 100, E148–E154.
40. Yang, Y.; Shen, F.; Huang, W.; Qin, S.; Huang, J.-T.; Sergi, C.; Yuan, B.-F.; Liu, S.-M. Glucose Is Involved in the Dynamic Regulation of M6A in Patients With Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019, 104, 665–673.
41. Kerr-Conte, J.; Vandewalle, B.; Moerman, E.; Lukowiak, B.; Gmyr, V.; Arnalsteen, L.; Caiazza, R.; Sterkers, A.; Hubert, T.; Vantyghem, M.C.; et al. Upgrading Pretransplant Human Islet Culture Technology Requires Human Serum Combined with Media Renewal. *Transplantation* 2010, 89, 1154–1160.
42. Rabhi, N.; Hannou, S.A.; Gromada, X.; Salas, E.; Yao, X.; Oger, F.; Carney, C.; Lopez-Mejia, I.C.; Durand, E.; Rabearivelo, I.; et al. Cdkn2a Deficiency Promotes Adipose Tissue Browning. *Mol. Metab.* 2018, 8, 65–76.

43. Chan, J.Y.; Luzuriaga, J.; Bensellam, M.; Biden, T.J.; Laybutt, D.R. Failure of the Adaptive Unfolded Protein Response in Islets of Obese Mice Is Linked with Abnormalities in  $\beta$ -Cell Gene Expression and Progression to Diabetes. *Diabetes* 2013, 62, 1557–1568.
44. Chehade, J.M.; Gladysz, M.; Mooradian, A.D. Dyslipidemia in Type 2 Diabetes: Prevalence, Pathophysiology, and Management. *Drugs* 2013, 73, 327–339.
45. Watson, M.L.; Macrae, K.; Marley, A.E.; Hundal, H.S. Chronic Effects of Palmitate Overload on Nutrient-Induced Insulin Secretion and Autocrine Signalling in Pancreatic MIN6 Beta Cells. *PLoS ONE* 2011, 6, e25975.
46. Oh, Y.S.; Bae, G.D.; Baek, D.J.; Park, E.-Y.; Jun, H.-S. Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Front. Endocrinol.* 2018, 9, 384.
47. Lytrivi, M.; Castell, A.-L.; Poitout, V.; Cnop, M. Recent Insights Into Mechanisms of  $\beta$ -Cell Lipo- and Glucolipotoxicity in Type 2 Diabetes. *J. Mol. Biol.* 2020, 432, 1514–1534.
48. Karaskov, E.; Scott, C.; Zhang, L.; Teodoro, T.; Ravazzola, M.; Volchuk, A. Chronic Palmitate But Not Oleate Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Which May Contribute to INS-1 Pancreatic  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Endocrinology* 2006, 147, 3398–3407.
49. Su, R.; Dong, L.; Li, Y.; Gao, M.; Han, L.; Wunderlich, M.; Deng, X.; Li, H.; Huang, Y.; Gao, L.; et al. Targeting FTO Suppresses Cancer Stem Cell Maintenance and Immune Evasion. *Cancer Cell* 2020, 38, 79–96.e11.
50. Church, C.; Lee, S.; Bagg, E.A.L.; McTaggart, J.S.; Deacon, R.; Gerken, T.; Lee, A.; Moir, L.; Mecinović, J.; Quwailid, M.M.; et al. A Mouse Model for the Metabolic Effects of the Human Fat Mass and Obesity Associated FTO Gene. *PLoS Genet.* 2009, 5, e1000599.
51. Church, C.; Moir, L.; McMurray, F.; Girard, C.; Banks, G.T.; Teboul, L.; Wells, S.; Bruning, J.C.; Nolan, P.M.; Ashcroft, F.M.; et al. Overexpression of Fto Leads to Increased Food Intake and Results in Obesity. *Nat. Genet.* 2010, 42, 1086–1092.
52. Karra, E.; O'Daly, O.G.; Choudhury, A.I.; Yousseif, A.; Millership, S.; Neary, M.T.; Scott, W.R.; Chandarana, K.; Manning, S.; Hess, M.E.; et al. A Link between FTO, Ghrelin, and Impaired Brain Food-Cue Responsivity. *J. Clin. Invest.* 2013, 123, 3539–3551.
53. Ke, S.; Pandya-Jones, A.; Saito, Y.; Fak, J.J.; Vågbø, C.B.; Geula, S.; Hanna, J.H.; Black, D.L.; Darnell, J.E.; Darnell, R.B. M6A mRNA Modifications Are Deposited in Nascent Pre-mRNA and Are Not Required for Splicing but Do Specify Cytoplasmic Turnover. *Genes Dev.* 2017, 31, 990–1006.
54. Castellanos-Rubio, A.; Santin, I.; Olazagoitia-Garmendia, A.; Romero-Garmendia, I.; Jauregi-Miguel, A.; Legarda, M.; Bilbao, J.R. A Novel RT-QPCR-Based Assay for the Relative Quantification of Residue Specific M6A RNA Methylation. *Sci. Rep.* 2019, 9, 4220.
55. Linder, B.; Grozhik, A.V.; Olarerin-George, A.O.; Meydan, C.; Mason, C.E.; Jaffrey, S.R. Single-Nucleotide-Resolution Mapping of M6A and M6Am throughout the Transcriptome. *Nat. Methods* 2015, 12, 767–772.

56. Marselli, L.; Piron, A.; Suleiman, M.; Colli, M.L.; Yi, X.; Khamis, A.; Carrat, G.R.; Rutter, G.A.; Bugliani, M.; Giusti, L.; et al. Persistent or Transient Human  $\beta$  Cell Dysfunction Induced by Metabolic Stress: Specific Signatures and Shared Gene Expression with Type 2 Diabetes. *Cell Rep.* 2020, 33, 108466.

## Legends to figures

### Figure 1. m<sup>6</sup>A RNA methylation in human and murine diabetic islets.

(A,B) ELISA quantification of m<sup>6</sup>A levels in total RNA from (A) pancreatic islets isolated from mice fed with chow diet (n = 5) or high fat diet during 12 weeks (n = 4) and (B) human control islets (n = 10) vs. human islets from donors with T2D (n = 5). Data were analyzed by Mann–Whitney test. \*\* p < 0.01. (C) Representative immunofluorescent staining of m<sup>6</sup>A levels (in green), insulin (in red) and glucagon (in white) in pancreatic sections from 15-week-old wild C57Bl6J mice fed with chow (CD), high fat (HFD) diets or from 15-week-old db/db mice. Nuclei were stained with Dapi (in blue). Scale bar represents 22  $\mu$ m.

### Figure 2. Effect of glucose on m<sup>6</sup>A RNA methylation in Min6 cells and non-diabetic human islets.

(A,B) m<sup>6</sup>A methylation was quantified by dot blot in total RNA of Min6 cells (n = 3) after 3 h of treatment with 2.8 or 20 mM glucose. Quantification of m<sup>6</sup>A labeling in B was obtained from nylon membranes ((A), right membrane) and normalized by total RNA ((A), left membrane). (C,D) Immunofluorescence of Min6 cells (n = 5) after glucose treatment (C) and its quantification (D). (E,F) m<sup>6</sup>A methylation was quantified by dot blot in total RNA of non-diabetic human islets from 3 donors (H1028, H1032, H1033) after 1 h of 2.8 or 20 mM glucose treatment (n = 3 or 4). Quantification of m<sup>6</sup>A labeling obtained in nylon membrane ((E), right membrane) and normalized by total RNA (E, left, blue membrane). Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons (B) or Mann–Whitney tests (D,F). \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001.

### Figure 3. mRNA expression and protein localization of m<sup>6</sup>A reader and erasers after glucose treatment.

mRNA expression and protein localization of m<sup>6</sup>A reader and erasers after glucose treatment. (A–C) mRNA expression of Alkbh5 (A), Fto (B) and Mettl3 (C) were quantified in Min6 cells by RT-qPCR after 1, 2 or 3 h of 2.8 or 20 mM glucose treatment (n = 3). Immunofluorescence of ALKBH5 in Min6 cells after 3 h of 2.8 or 20 mM glucose treatment (D) and its quantification using ImageJ ((E), n = 3). Immunofluorescence of METTL3 in Min6 cells after a 3 h treatment with 2.8 or 20 mM glucose treatment (F) and its quantification ((G), n = 3). Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons multiple t-tests (A–C) or multiple unpaired t-tests (E,G). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

**Figure 4. Effects of a chronic high glucose and palmitate treatment on m6A RNA methylation and m6A enzyme expression in Min6 cells and non-diabetic human islets.**

(A,B) Glucose-stimulated insulin secretion was quantified by ELISA ((A), n = 4) and quantification of mRNA expression levels of some ER stress genes by RT-qPCR ((B), n = 4) after 20 mM glucose with or without 1 mM palmitate during 72 h. (C,D) Immunofluorescence of m6A methylation in Min6 cells after after 72 h of 20 mM glucose with or without 1 mM palmitate (C) and its quantification (n ≥ 4, (D)). (E) Quantification of m6A enzyme expression by RT-qPCR in Min6 cells treated with 20 mM glucose with or without 1 mM palmitate ((E), n = 4). (F,G) Western blot (F) and its quantification (G) showing METTL3 and ALKBH5 protein levels in Min6 cells treated with 5.6 or 20 mM glucose, with or without 1 mM palmitate, for 72 h. (H) Quantification of m6A enzyme expression by RT-qPCR in pancreatic human islets (H1099) treated with 0.5 mM palmitate (n = 4). Data were analyzed by two-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons (A) or Mann–Whitney tests (B,D,E,H). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

**Figure 5. Effects of a chronic low glucose and palmitate treatment on m6A RNA methylation and m6A enzyme expression in Min6 cells and non-diabetic human islets.**

(A,B) Glucose-stimulated insulin secretion was quantified by ELISA ((A), n = 4) and quantification of mRNA expression levels of some ER stress genes by RT-qPCR ((B), n = 4) after 5.6 mM glucose and 1 mM palmitate cotreatment during 72 h. (C) m6A methylation levels in Min6 cells after 72 h of 5.6 mM glucose and 1 mM palmitate ((C), n = 4). (D) Quantification of m6A enzyme expression by RT-qPCR in Min6 cells treated with 5.6 mM glucose and 1 mM palmitate (n = 4). (E) Glucose-stimulated insulin secretion of human islets treated with 5.6 mM glucose and 0.5 mM palmitate was quantified by ELISA. (F) Quantification of m6A enzyme expression by RT-qPCR in pancreatic human islets (H1099) treated with 0.5 mM palmitate (n = 4). Data were analyzed by two-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons (A,E) or Mann–Whitney tests (B–D,F). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

**Figure 6. Knock-down of m6A enzymes through siRNA affects the expression of genes involved in beta-cell identity and function.**

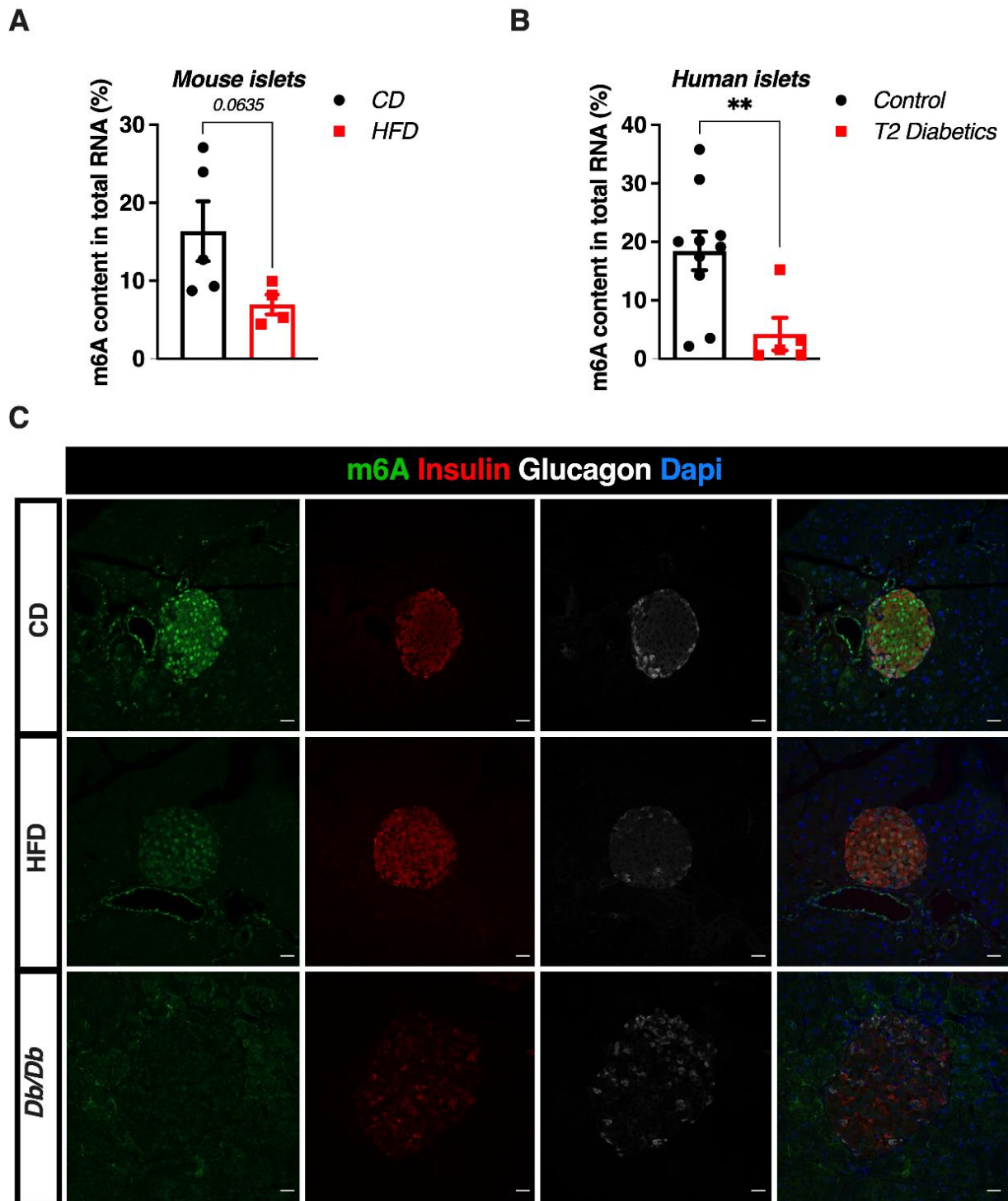
Cells were treated during 24 h with a non targeting siRNA (siControl), siAlkbh5, siFto and siMettl3 and lysed 48 h later to study mRNA expression. Quantification of m6A enzyme

expression by RT-qPCR after siRNA transfection against Alkbh5 (A), Fto (D) or Mettl3 (G) (n = 4). mRNA expression of genes involved in  $\beta$ -cell identity (B,E,H) and function (C,F,I) (n = 4) is represented. Data were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons (A,D,G) and multiple t-tests (B,C,E,F,H,I). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001.

**Figure 7. Effects of genetic or pharmacological FTO inhibition on glucose-stimulated insulin secretion in Min6 cells, mouse and human pancreatic islets.**

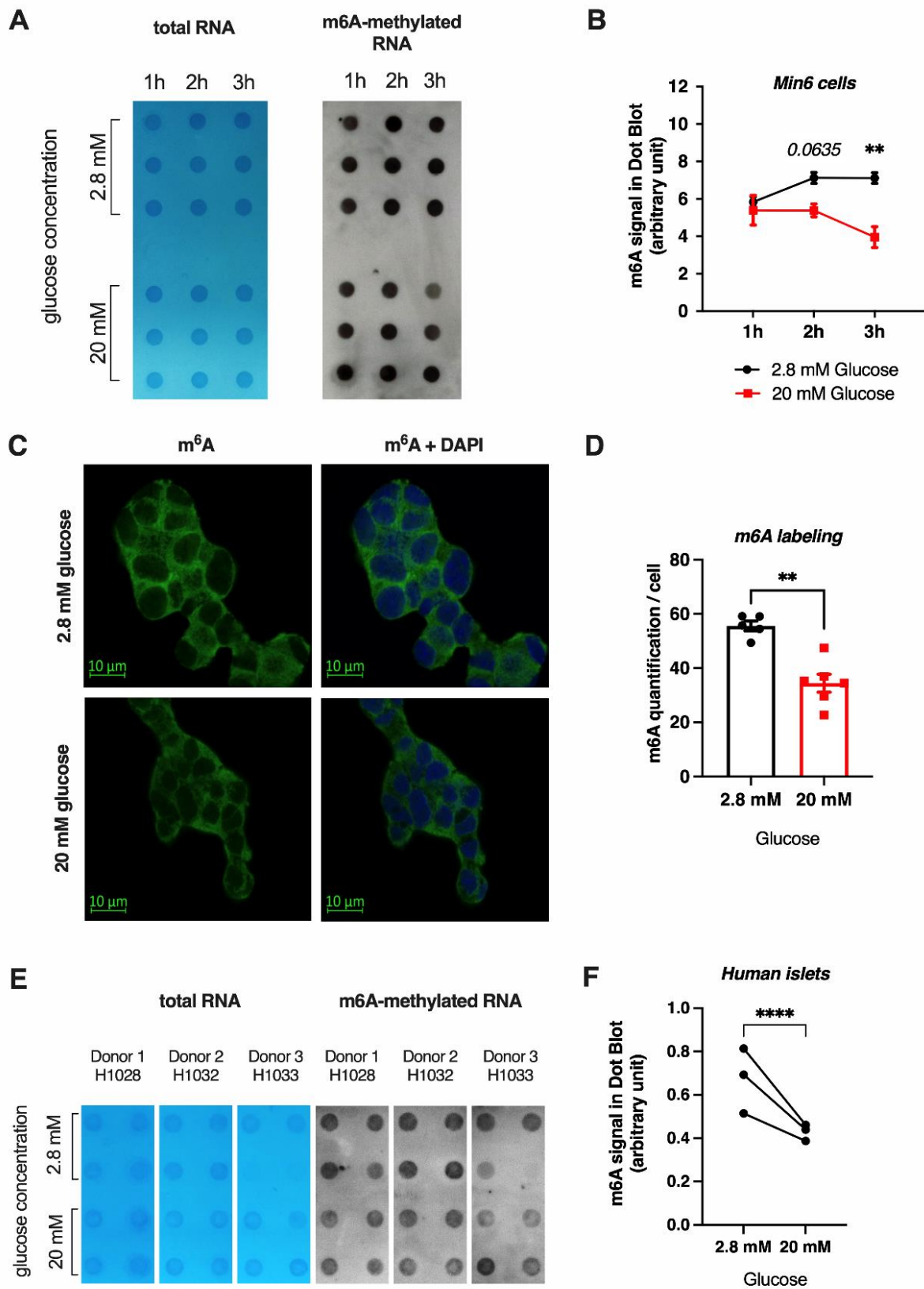
(A) GSIS after siRNA mediated Fto knockdown in Min6 cells (n = 16). (B,C) GSIS after treatment of Min6 cells ((B), n = 4) and primary mouse pancreatic islets ((C), n = 6) with 100 nM bisantrene for 8 and 2 h, respectively. (D–F) Human pancreatic islets were untreated or treated with 100 nM bisantrene for 1 h (D), 4 h (E) and 24 h (F) and global m6A RNA methylation was quantified by ELISA. (G) GSIS of pancreatic human islets untreated or treated with 100 nM bisantrene for 1, 4 and 24 h. Stimulation index represents the fold of 20 mM glucose-stimulated insulin secretion over 2.8 mM glucose-stimulated insulin secretion. Data were analyzed by two-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons (A–C), Mann–Whitney tests (D–F) or one-way ANOVA with Dunnett's correction for multiple comparisons (G). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

Figure 1

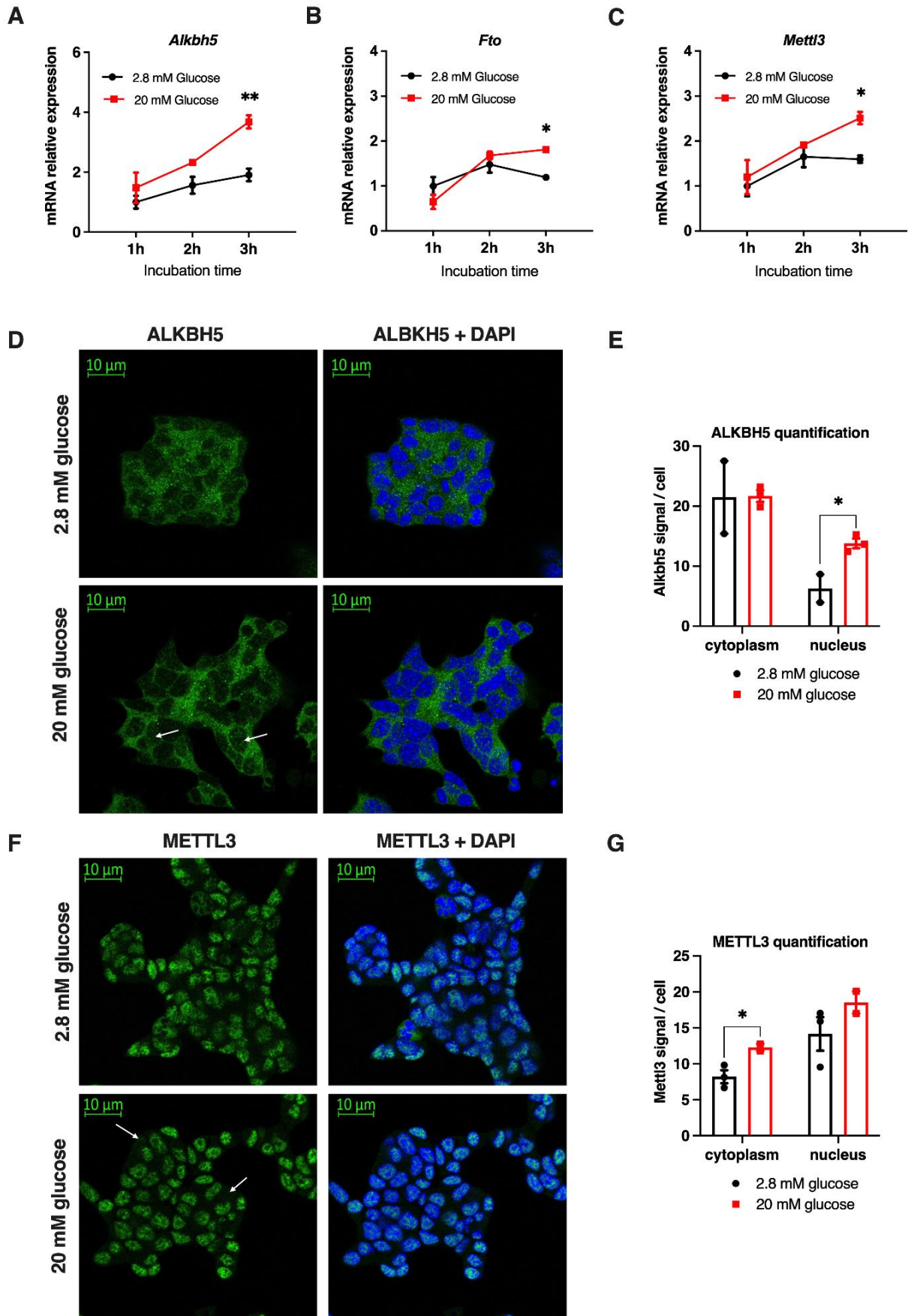




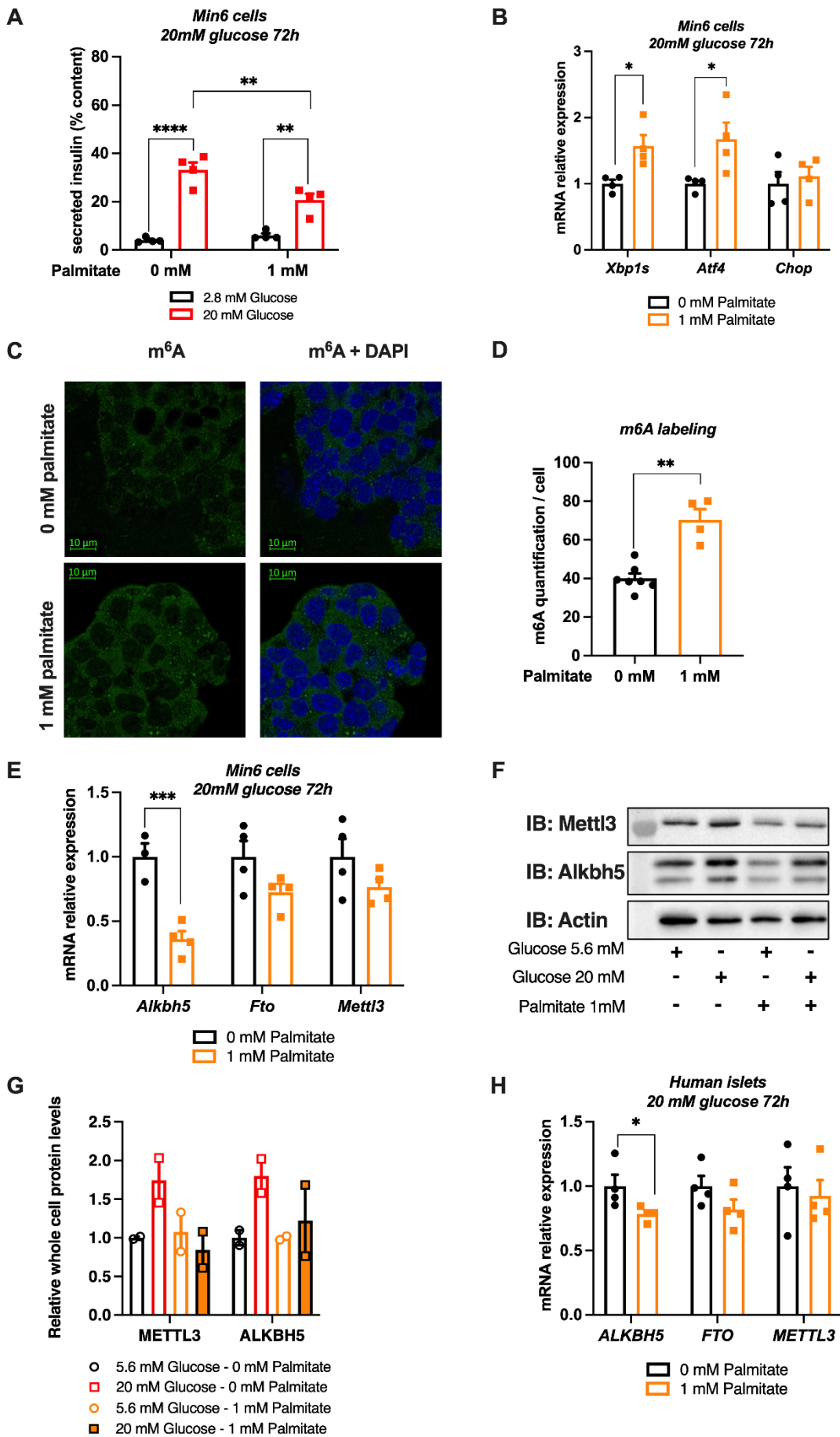
**Figure 2**



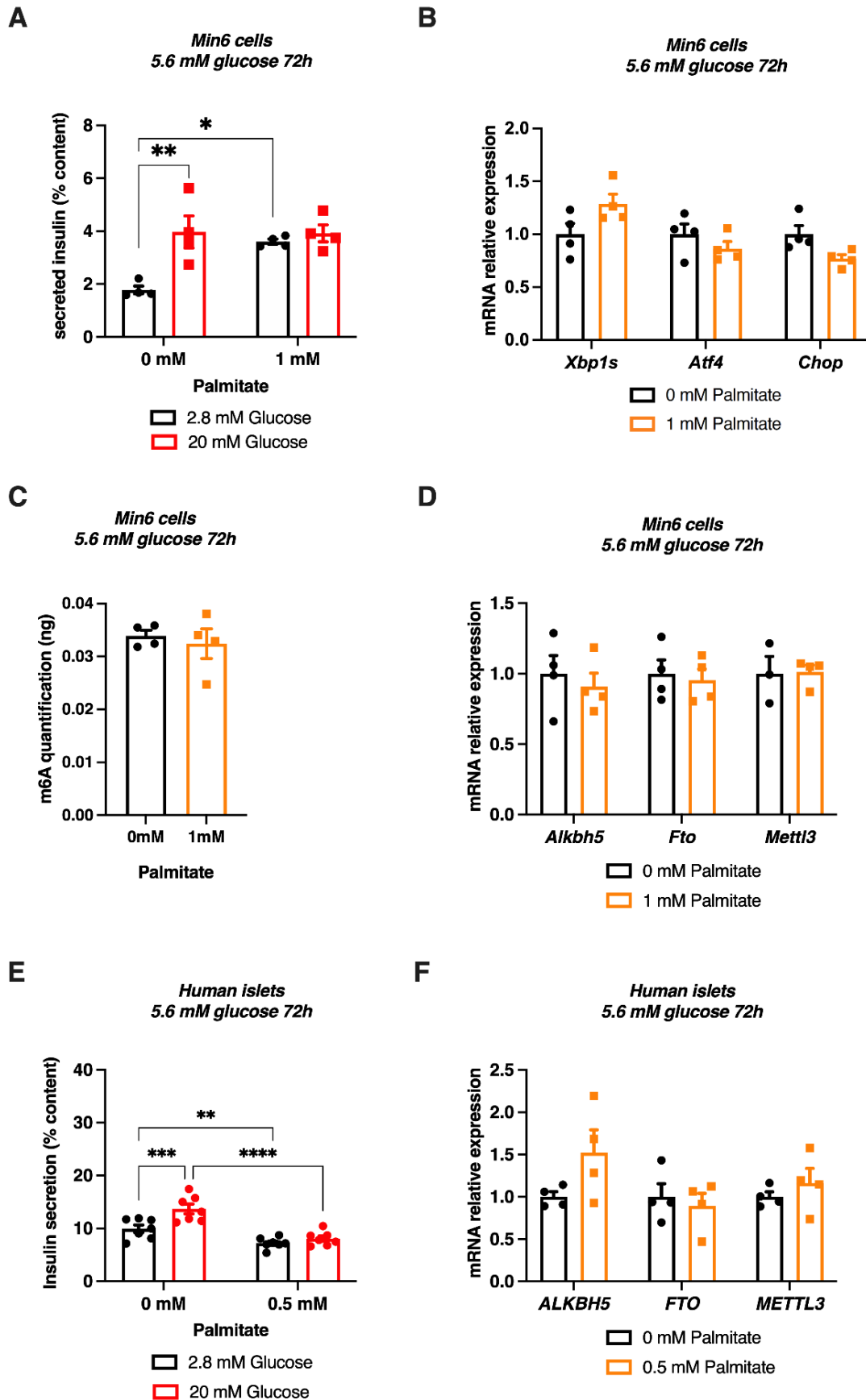
**Figure 3**



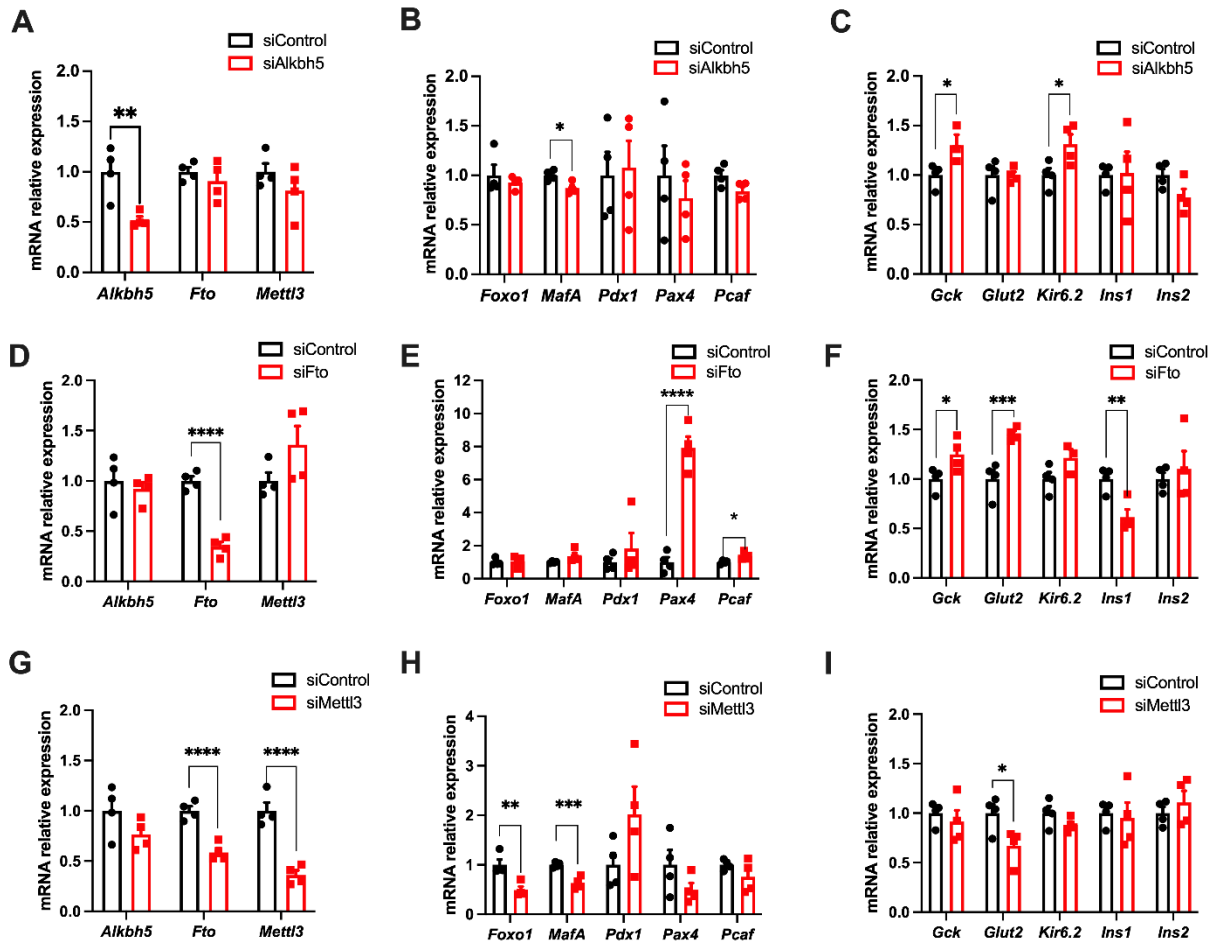
**Figure 4**



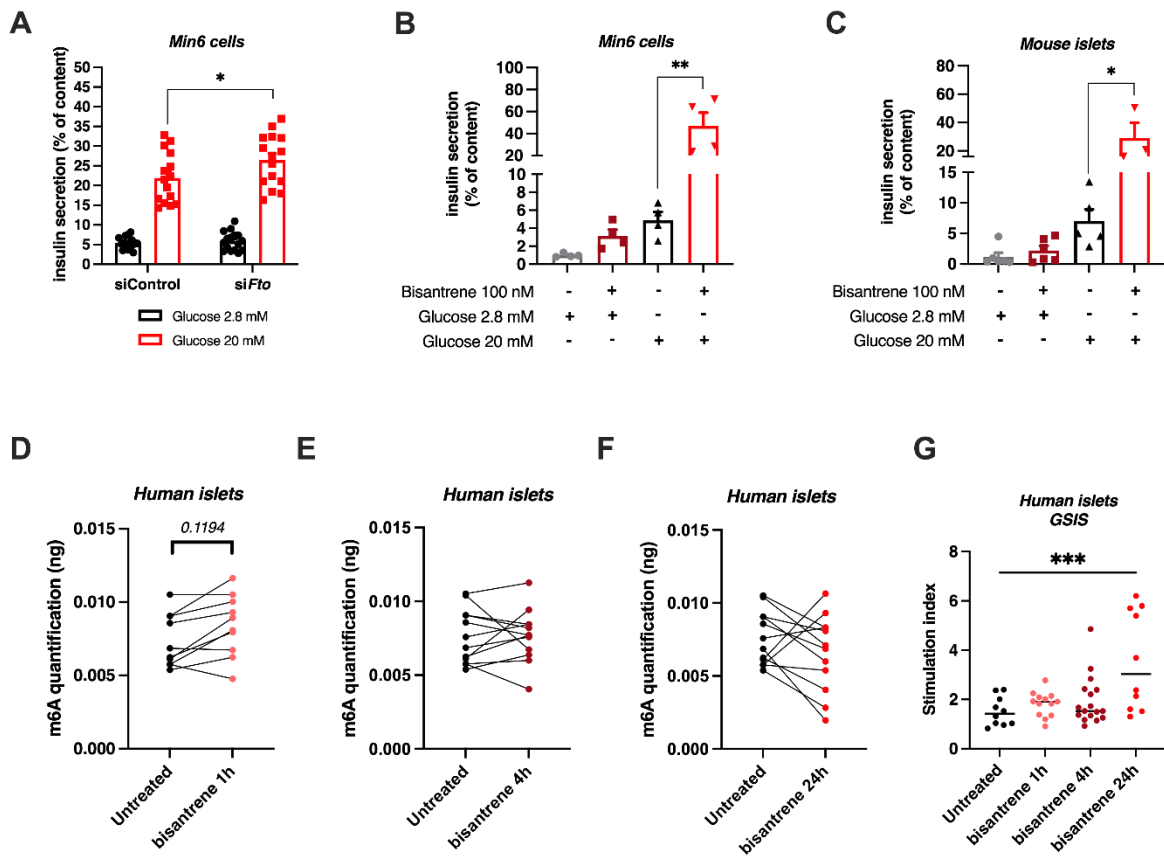
**Figure 5**



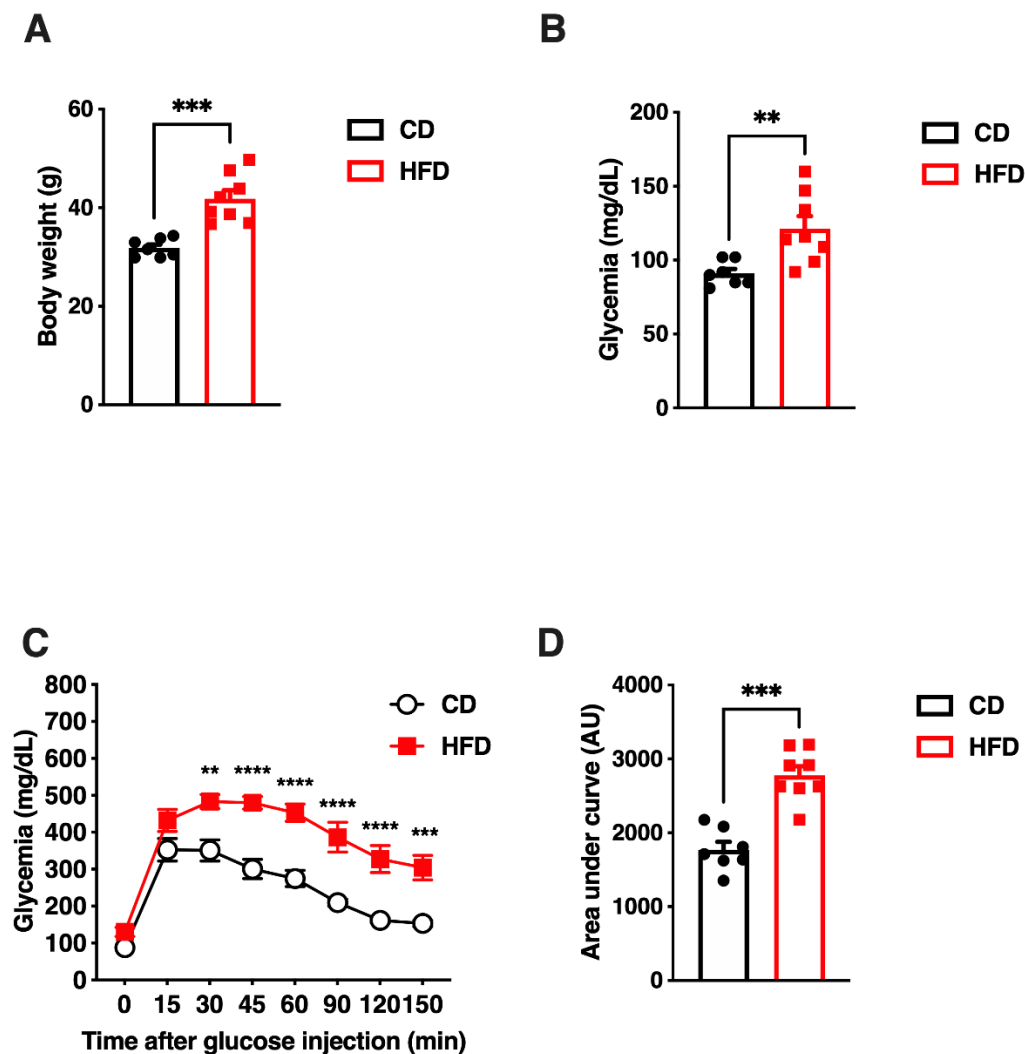
**Figure 6**



**Figure 7**



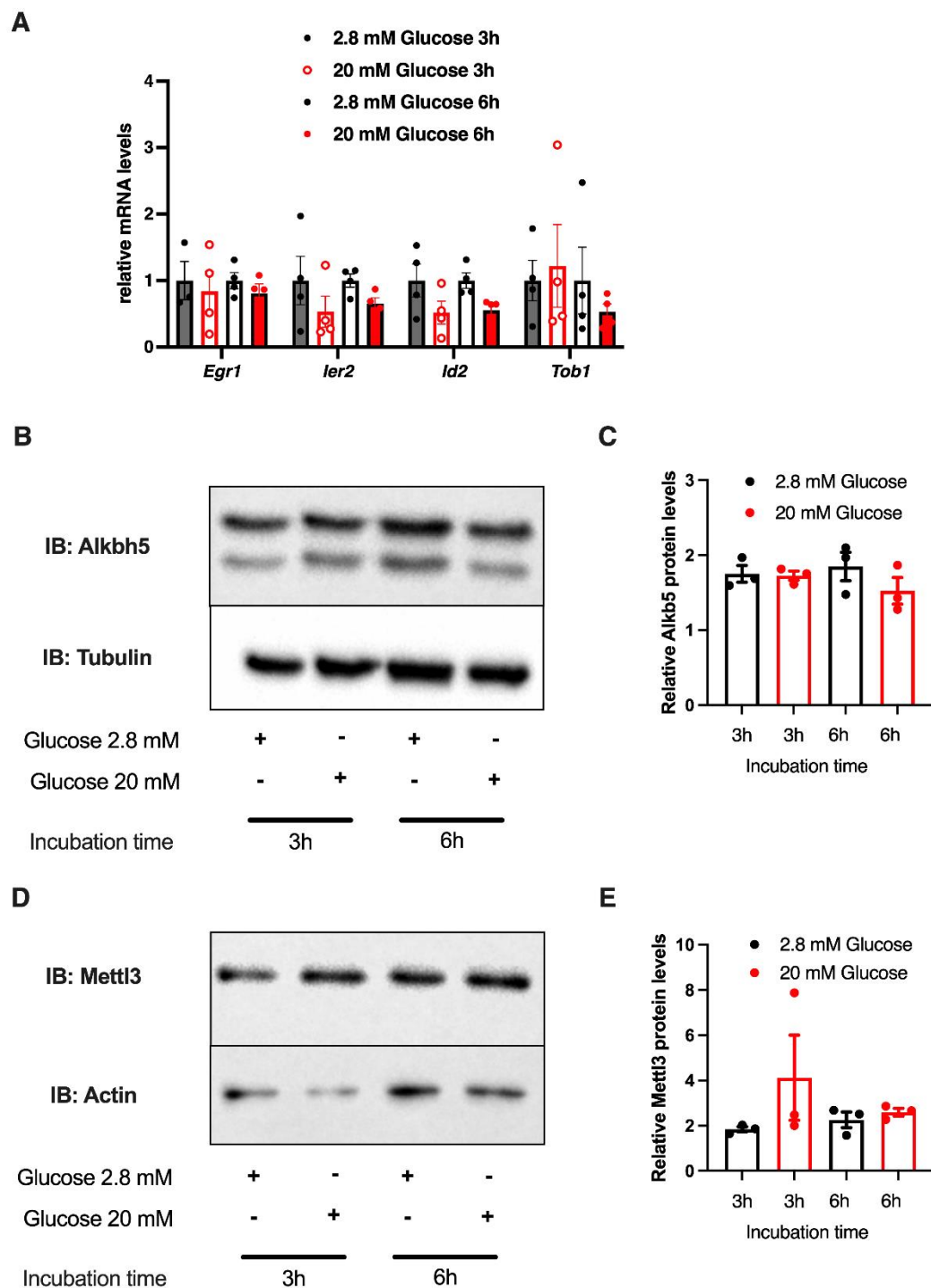
**Figure S1**



**Supplementary Figure S1: Metabolic phenotyping of CD and HFD fed mice.**

(A) Body weight of C57Bl6J mice fed a regular chow (CD, n=7) or high fat diet (HFD, n=8). (B) Fasting blood glucose levels of C57Bl6J mice fed a regular chow (CD, n=7) or high fat diet (HFD, n=8). (C, D) Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT, C) and the corresponding area under the curve of ipGTT (D) was performed after 16h fasting and glucose was administrated by intraperitoneal injection (2g/kg) in C57Bl6J mice fed a regular chow (CD, n=7) or high fat diet (HFD, n=8). Data were analyzed by Mann-Whitney tests (A, B, D) or 2way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons (C). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

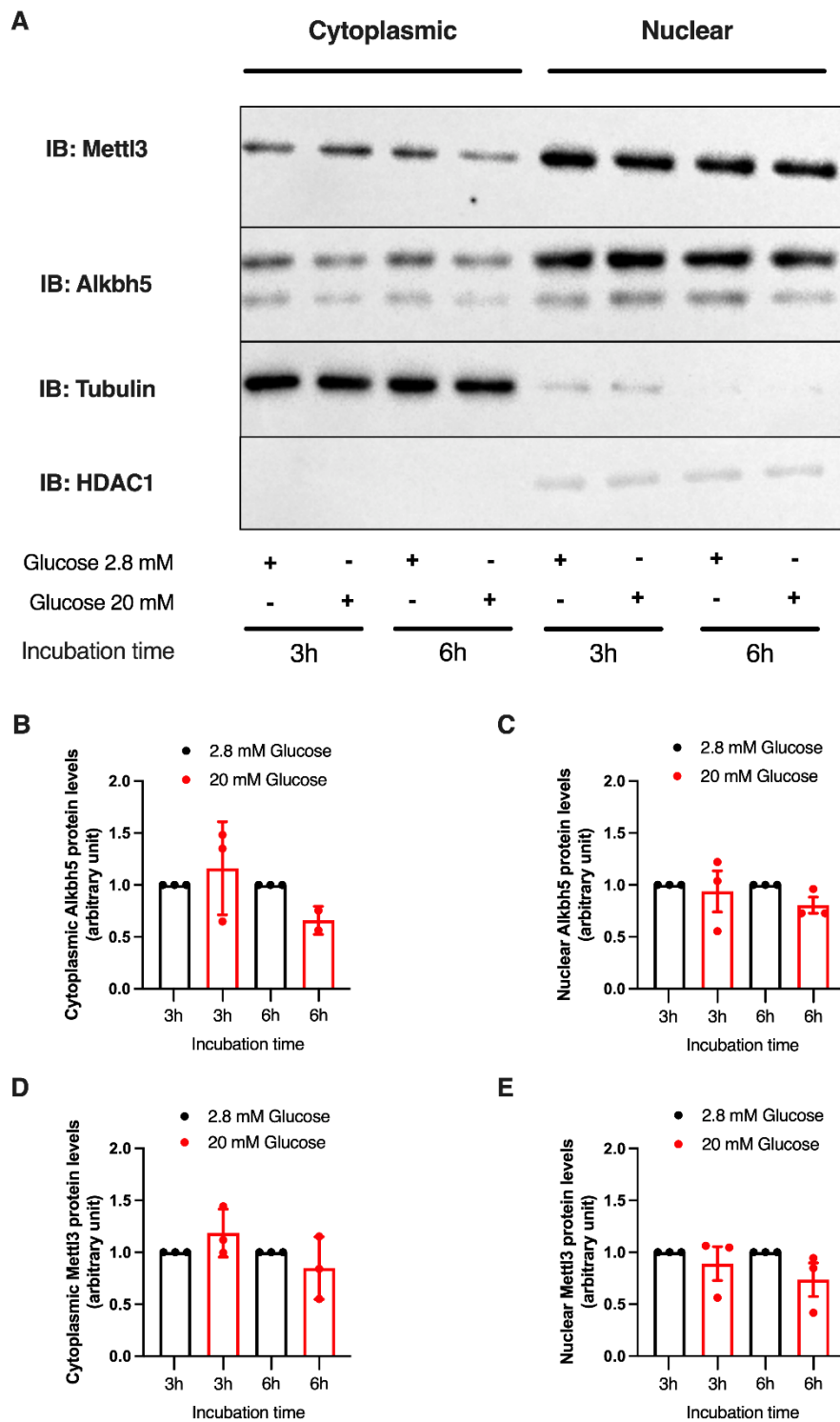
## Figure S2



**Supplementary Figure S2: mRNA levels of early glucose responder genes and protein levels of m6A reader and erasers after glucose treatment.** (A) qPCR analysis of *Egr1*, *ler2*, *Id2* and *Tob1* in Min6 cells treated for 3 and 6 hours with 2.8 mM and 20 mM of glucose. Individual values are presented (n=4). (B to E) Western blot assay (B, D) and its quantification (C, E) of ALKBH5 (B, C) and METTL3 (D, E) in Min6 cells exposed to 2.8 mM or 20 mM of glucose for 3 or 6 hours. Tubulin or actin were used as loading controls. Results in A, C and E are presented as mean $\pm$  SEM.



**Figure S3**



**Supplementary Figure S3: protein localization of m6A reader and erasers after glucose treatment.**

Western blot assay (A) and its quantification (B to E) showing the nuclear and cytoplasmic localization of ALKBH5 and METTL3 in Min6 cells exposed to 2.8 mM or 20 mM of glucose for 3 or 6 hours. Tubulin or HDAC1 were used as loading controls for cytoplasmic and nuclear fractionation, respectively.

## Supplementary Table

**Table S1.** Healthy Islets Donor Informations (Part. 1).

Islet preparation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>MANDATORY INFORMATION</b>														
Unique identifier	H596	H731	H785	H818	H834	H873	H879	H893	H900	H901	H1028	H1032	H1033	H1099
Donor age (years)	48	19	62	23	58	24	16	58	65	20	57	35	39	54
Donor sex (M/F)	H	F	H	H	F	F	F	H	F	H	F	M	M	F
Donor BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.2	20.8	23.2	24.9	20.8	19.4	21.8	24.7	23.3	21.6	18.4	35.2	24.3	24
Donor HbA <sub>1c</sub> or other measure of blood glucose control	5.6	5.6	5.4	5.4	5.6	5.9	5.1	5.2	5.6	5.6	6.1	5.4	5.6	5.8
Islet isolation centre	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE
Donor history of diabetes? Please select yes/no from drop down list	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Diabetes duration (years)														
<b>RECOMMENDED INFORMATION</b>														
Donor cause of death	Traumatisme Non AVP	AVP	Traumatisme Non AVP	Traumatisme Non AVP	AVC	AVP	AVC	Anevrisme	AVC	AVP	AVC	AVC	Anoxia	Stroke
Cold ischaemia time (h)	5H35	3H24	5H59	9H51	6H55	3H58	6H31	3H05	10H33	4H00	4.22	4.57	3.07	7.03
Estimated purity (%)	70	80	60	80	90	80	80	55	90	50	90	80	80	90
Estimated viability (%)	95.8	96.3	90	95,2	97.6	98	93.4	98.7	93.5	87.5	86.9	95	96.2	96.2
Total culture time (h) <sup>d</sup>	12	19	43	20	18	18	21	20	21	20	16	18	18	60

Glucose-stimulated insulin secretion or other functional measurement <sup>e</sup>	Static : 1.82	Static : 1.37	Static : 0.78	Static : 0.96	Static : 1.06	Static : 1.69	Static : 0.93	Static : 1.14	Static : 1.17	Static : 1.51	Perifusion : 1.92	Perifusion : 7.19	Perifusion : 3.26	Perifusion : 4.74
Handpicked to purity? Please select yes/no from drop down list	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

**Table S1.** Diabetic Islets Donor Informations (Part. 2)

Islet preparation	15	16	17	18	19	20								
<b>MANDATORY INFORMATION</b>														
Unique identifier	H354	H504	H767	H774	H853	H894								
Donor age (years)	64	57	54	67	56	68								
Donor sex (M/F)	H	F	H	H	H	H								
Donor BMI (kg/m <sup>2</sup> )	39.2	18.9	21.8	27.8	24.3	20.8								
Donor HbA <sub>1c</sub> or other measure of blood glucose control	NA	NA	5.9	6.2	5.1	6.9								
Islet isolation centre	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE	LILLE								
Donor history of diabetes? Please select yes/no from drop down list	NA	NA	NA	T2DII	NA	DII								
Diabetes duration (years)	NA	NA	NA	NA	NA	28								
<b>RECOMMENDED INFORMATION</b>														
Donor cause of death	Hémorragie Méningée	Anévrisme	AVC	Hématome Cérébral	AVC	Anoxie								
Cold ischaemia time (h)	4H00	15H12	5H58	6H56	3H35	5H20								
Estimated purity (%)	80	90	80	85	85	50								
Estimated viability (%)	75.8	96	90	97.4	88.5	NA								
Total culture time (h) <sup>d</sup>	18	23	20	18	18	22								

Glucose-stimulated insulin secretion or other functional measurement <sup>e</sup>	Static : 1.22	Static : 2.62	Static : 0.87	Static : 2.32	Static : 1.12	NA								
Handpicked to purity? Please select yes/no from drop down list	No	No	No	No	No	No								

Target Gene	Species	Product name	Product Reference	Provider	Sequence
siRNA Control	Mouse	ON-TARGETplus Non-targeting Pool	D-001810-10-20	Dharmacon	UGGUUUACAUGUCGACUAA
					UGGUUUACAUGUUGUGUGA
					UGGUUUACAUGUUUUCUGA
					UGGUUUACAUGUUUCCUA
siAlkbh5	Mouse	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA Alkbh5	L-058321-01-0010, 268420, J-058321-09	Dharmacon	GAUUAGAUGCACCGCGAUU
			L-058321-01-0010, 268420, J-058321-10		GUUCAAGUUUGCUGCGUAU
			L-058321-01-0010, 268420, J-058321-11		GUUCAAGUUUGCUGCGUAU
			L-058321-01-0010, 268420, J-058321-12		GUUCAAGUUUGCUGCGUAU
siFto	Mouse	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA Fto	L-062238-01-0010, 26383, J-062238-09	Dharmacon	CAACCUAAGUAACGGUAUA
			L-062238-01-0010, 26383, J-062238-10		CUGAAGUGUUGAAACGUUA
			L-062238-01-0010, 26383, J-062238-11		GUAGAAAGCAGUAGCGUUG
			L-062238-01-0010, 26383, J-062238-12		CGUCCGGACUUUACCAGUA
siMettl3	Mouse	ON-TARGETplus SMARTpool siRNA Mettl3	L-049446-01-0010, 56335, J-049446-09	Dharmacon	CAGCUAAGGAGCCGGCUAA
			L-049446-01-0010, 56335, J-049446-10		GAGGACUGUUUACGCAAUA
			L-049446-01-0010, 56335, J-049446-11		CUAAGAAUUUUAJAGACGCA
			L-049446-01-0010, 56335, J-049446-12		AAGCUGCACUUCAGACGAA

**Table S2.** List of siRNA used for Min6 cells transfection.

**Table S3.** List of oligonucleotides used in qPCR experiments

Official symbol	Species	Sequence	Forward / Reverse
CYPA (Cyclo)	Mouse	ATGGCACTGGCGGCAGGTCC	Forward
		TTGCCATTCTGGACCCAAA	Reverse
	Human	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	Forward
		TTGCCATTCTGGACCCAAA	Reverse
Alkbh5	Mouse	GCGCGGTCATCAACGACTA	Forward
		ATCAGCAGCATACCCACTGAG	Reverse
	Human	TGCAAGTTCCAGTTCAAGCC	Forward
		CTTGATGTCCTGAGGCCGTA	Reverse
METTL3	Mouse	CTGGGCACTTGGATTTAAGGAA	Forward
		TGAGAGGTGGTGTAGCAACTT	Reverse
	Human	ACAAGAAGCAGCTGGACTCT	Forward
		CAATGCTGCCTCTGGATTCC	Reverse
FTO	Mouse	TTCATGCTGGATGACCTCAATG	Forward
		GCCAACTGACAGCGTTCTAAG	Reverse
	Human	TTGGCTCCCTTATCTGACCC	Forward
		ACCAGGTCCCGAAATAAGCA	Reverse
Chop	Mouse	CTGCCTTTCACCTTGAGAC	Forward
		CGTTTCCTGGGGATGAGATA	Reverse
	Human	GGAACAGAGTGGTCATTCCC	Forward
		CTGCTTGAGCCGTTCAATCTC	Reverse
Xbp1s	Mouse	GAGTCCGCAGCAGGTG	Forward
		GTGTCAGAGTCCATGGGA	Reverse
	Human	CCGCAGCAGGTGCAGG	Forward
		GGGGCTTGGTATATATGTGG	Reverse
Atf4	Mouse	ATGGCCGGCTATGGATGAT	Forward
		CGAAGTCAAACCTTTTCAGATCCATT	Reverse
	Human	ATGACCGAAATGAGCTTCCTG	Forward
		GCTGGAGAACCCATGAGGT	Reverse
Atf6	Mouse	CATGTGGTGAATGTGCTGCC	Forward
		CACAGCGATATCCGAACCCA	Reverse
	Human	AGCAGCACCCAAGACTCAAAC	Forward
		GCATAAGCGTTGGTACTGTCTGA	Reverse
Pdx1	Mouse	ATTGTGCGGTGACCTCGGGC	Forward
		GATGCTGGAGGGCTGTGGCG	Reverse

Pax4	Mouse	GTGTACCCTCAGCTGCCTTG	Forward
		ATAGGCCTGGGATGAGGTGT	Reverse
MafA	Mouse	TCCGACTGAAACAGAAGCGG	Forward
		CTCTGGAGCTGGCACTTCTC	Reverse
Foxo1	Mouse	TGCCAACCAAAGCTTCCCACA	Forward
		TGGACTGCTCCTCAGTTCCTGCT	Reverse
Gck	Mouse	GCTCAGTGAACCCCGGTCAGC	Forward
		TGTGCGCAGCTGCTCTGAGG	Reverse
Glut2	Mouse	AACCGGGATGATTGGCATGT	Forward
		GGCGAATTTATCCAGCAGCA	Reverse
Kir6.2	Mouse	CACAAGCTGGGTTGGGGGCTC	Forward
		TGCCCCTCAGCTGGGTTCTGC	Reverse
Ins1	Mouse	GCCAAACAGCAAAGTCCAGG	Forward
		GTTGAAACAATGACCTGCTTGC	Reverse
Ins2	Mouse	CAGCAAGCAGGAAGCCTATCT	Forward
		CAGGTGGGAACCACAAAGGT	Reverse



**Table S4.** List of antibodies used for Dot Blot or Immunofluorescence experiments.

	<b>Product Name</b>	<b>Species</b>	<b>Provider</b>	<b>Product Reference</b>	<b>Dilution</b>
Primary Antibodies	Anti-Alkbh5 antibody	Rabbit	Abcam	ab195377	IF : 1/250 WB : 1/1000
	Anti-Mettl3 antibody	Rabbit	Abcam	ab195352	IF : 1/500 WB : 1/1000
	Anti-m6A antibody	Rabbit	Abcam	ab151230	Dot Blot : 1/500 IF : 1/100 (tissue) IF : 1/250 (Min6)
	Anti-insulin antibody	Guinea-pig	Agilent technologies	A0564	IF : 1/500
	Anti-glucagon antibody	Mouse	Sigma	G2654	IF : 1/500
	Anti- $\alpha$ Tubulin antibody	Mouse	Abcam	ab7291	WB : 1/1000
	Anti- $\beta$ Actin antibody	Mouse	Sigma	A5441	WB : 1/1000
	Anti-HDAC1 antibody	Rabbit	Abcam	Ab7028	WB : 1/1000
Secondary Antibody	Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit antibody	Donkey	Invitrogen	A21206	1/200
	Alexa Fluor 564 Anti-Guinea Pig antibody	Goat	Invitrogen	A11075	1/200
	Alexa Fluor 647 Anti-Mouse antibody	Donkey	Invitrogen	A31571	1/200
	Anti-Mouse HRP antibody	Rabbit	Sigma	A9044	1/8000
	Anti-Rabbit HRP antibody	Goat	Sigma	A9169	1/8000

**Table S5.** List of oligonucleotides used for qPCR after m<sup>6</sup>A-immunoprecipitation.

Official symbol	Species	Sequence	Forward / Reverse
C. Luc (Ctrl -)	Cypridina Luciferase	GCTTCAACATCACCGTCATTG	Forward
		CACAGAGGCCAGAGATCATTG	Reverse
G. Luc (Ctrl +)	Gaussia Luciferase	CGACATTCTGAGATTCTGG	Forward
		TTGAGCAGGTCAGAACACTG	Reverse
Ins1 Pair 1	Mouse	GACTCCAGCGACTTTAGGGAG	Forward
		AACGCCAAGGTCTGAAGGTC	Reverse
Ins1 Pair 2	Mouse	CCCCACCTGGAGACCTTAAT	Forward
		TAGGAAGTGCACCAACAGGG	Reverse
Ins1 Pair 3	Mouse	AATGGGCCAAACAGCAAAGTC	Forward
		TCACTAAGGGCTGGGGGTTA	Reverse
Ins1 Pair 4	Mouse	ACCATCAGCAAGCAGGTCATT	Forward
		TACCAGGTGGGGACCACAAA	Reverse
Ins2 Pair 1	Mouse	CATGTCCC GCCGTGAAGT	Forward
		ATGTCCAAGTGTGAAGAAAACC	Reverse
Ins2 Pair 2	Mouse	ATCAGCAAGCAGGAAGGTA CT	Forward
		AGAAAACCAGGGTAGTTAGCACT	Reverse
Ins2 Pair 3	Mouse	AACTACCCTGGTTTTCTTCACT	Forward
		ATGGGCCTCTAAAGCCTACTC	Reverse
Ins2 Pair 4	Mouse	GCCTCCTCTTTACGTGAAACT	Forward
		CCTCCACACCTAGGACACAATTTA	Reverse
MafA Pair 1	Mouse	TGGCCATCGAGTACGTCAAC	Forward
		GTCCGAGGACAGCGAGCC	Reverse
MafA Pair 2	Mouse	TCCTCGACGCCCTCAG	Forward
		GTACAGATCCTCCAGCACCG	Reverse
MafA Pair 3	Mouse	GCACATTCTGGAGAGCGAGA	Forward
		CCCGCCAATTCTCGTATTT	Reverse
MafA Pair 4	Mouse	AAATACGAGAAGTTGGCGGG	Forward
		CACAGAAAGAAGTCGGGTGC	Reverse
GAPDH	Mouse	GTGCAGTGCCAGCCTCGTCC	Forward
		CAGGCGCCCAATACGGCCAA	Reverse